

**Joana Filipa de Sousa Pereira**

Licenciada em Biologia Celular e Molecular



**Estudo do gene *FOXE1* e identificação de novos genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Doutora Branca Cavaco, Investigadora Principal,  
Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Paula Maria Theriaga Mendes Bernardo Gonçalves

Arguente: Prof. Doutora Jacinta de Fátima Rosário Serpa

# **Estudo do gene *FOXE1* e identificação de novos genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar**

Copyright Joana Filipa de Sousa Pereira, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **AGRADECIMENTOS**

Na conclusão deste trabalho, quero agradecer a todas as pessoas que permitiram a sua concretização e sem as quais teria sido impossível chegar até aqui.

À minha orientadora, Doutora Branca Cavaco, e ao Doutor Valeriano Leite por me terem concedido a oportunidade de trabalhar no grupo de Endocrinologia Molecular do IPO-Lisboa, num projecto aliciante e que me permitiu desenvolver um maior gosto pela ciência. Quero dirigir uma palavra de agradecimento especial à Doutora Branca Cavaco, pelo seu constante apoio, incentivo e motivação neste projecto e pelo seu rigor e metodologia de trabalho que me fez aprender muito.

À Professora Doutora Alexandra Fernandes por ter aceite ser minha orientadora interna. E ao Professor Doutor José Sampaio pela sua disponibilidade.

Aos meus colegas de grupo Ana Luísa Silva, Inês Figueiredo, Jaime Pita, Margarida Moura, Rita Domingues e Rute Tomaz, pelo companheirismo, disponibilidade, ajuda e por tudo o que me foram ensinando durante este ano. E foi muito, acreditem!

Aos restantes elementos do CIPM, que de uma forma directa ou indirecta foram colaborando neste trabalho. Em especial, à Inês Matias e também à Ana Magalhães e ao Francisco pela minha pequena incursão no vosso “mundo” de trabalho. E a todos que contribuíram para que as horas de almoço fossem momentos divertidos e descontraídos.

Ao Doutor António Pinto pelo apoio na citometria de fluxo.

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

Aos amigos que conheci na Faculdade, tanto da licenciatura como de mestrado, pelo apoio, carinho, amizade e pela partilha de ideias.

Às meninas do nº58 e aos convidados daquela casa, que fizeram deste ano um ano cheio de vida. Aos meus colegas de casa que aturaram as minhas últimas inseguranças.

Aos meus familiares, também os “adoptados” pelo coração. São vocês que me permitem sentir o significado de FAMÍLIA.

Aos meus amigos de outros tempos que continuam a caminhar ao meu lado e que me continuam a ouvir, apoiando as minhas loucuras e confiando nas minhas escolhas. Em especial à Sofia, à Inês e à Fábria. À Isabel. À Nadina e ao Tiago. Ao Ricardo. A vossa constante amizade faz de mim uma pessoa muito feliz!

E finalmente, aos meus pais, as pessoas que permitiram que chegasse até aqui, que me apoiam incondicionalmente, que me ouvem quando preciso e que estão sempre presentes mesmo estando a alguns kms de distância. Agradeço, principalmente, por todos os valores que me transmitiram, por me fazerem acreditar sempre que o amanhã será melhor e por não só não me deixarem parar de sonhar, como por sonharem comigo.

Quero dedicar esta tese aos meus pais. Quero também dedicar aos meus avós, porque tenho a certeza que mesmo não percebendo o significado deste trabalho, iriam estar muito orgulhosos de mim.



## RESUMO

As formas familiares de carcinomas não-medulares da tiróide (FNMTC) representam 5% das neoplasias da tiróide. Foram já mapeados 8 *loci* de susceptibilidade para o FNMTC, no entanto, até à data, apenas o gene *DICER1* foi identificado. O envolvimento de diferentes *loci* sugere a existência de heterogeneidade genética para o FNMTC, contudo, a sua base molecular, é essencialmente desconhecida.

Os factores de transcrição NKX2-1, FOXE1, PAX8 e HHEX estão envolvidos na morfogénese e diferenciação da tiróide. Estudos recentes levaram à identificação de mutações germinais no gene *NKX2-1* em famílias com FNMTC. No entanto, continua por esclarecer o papel destes factores de transcrição na etiologia do FNMTC.

A nova tecnologia de sequenciação global do exoma (WES) tem facilitado a identificação de genes de susceptibilidade para diferentes doenças hereditárias.

Este projecto teve como objectivos o estudo do papel do gene *FOXE1* em FNMTC e a identificação de novos genes de susceptibilidade para esta doença, utilizando a WES.

Desenvolveram-se estudos funcionais para a variante p.A248G do gene *FOXE1*, identificada numa família com FNMTC, usando como modelos células de tiróide normal (PCCL3) e uma linha celular de carcinoma papilar da tiróide (TPC-1). Nestes ensaios, observou-se que a variante p.A248G promovia a proliferação e migração celular, sugerindo que esta variante poderá contribuir para a tumorigénese na tiróide.

Por WES, identificou-se uma nova variante (p.T221) no gene *C8orf48*. Esta variante segregava com a doença na família. O gene *C8orf48* interage com proteínas da via de sinalização WNT. Em estudos preliminares de expressão génica, identificaram-se alguns genes-alvo desta via (*CCND1* e *MYC*) que apresentavam sobre-expressão no tumor da tiróide relativamente à tiróide normal no probando. Estudos funcionais poderão esclarecer o papel desta variante na tumorigénese.

Neste trabalho, foram identificadas variantes genéticas, potencialmente patogénicas nos genes *FOXE1* e *C8orf48*, que constituem a primeira evidência do seu envolvimento em FNMTC.

**Palavras-Chave:** tiróide, cancro, FNMTC, WES, FOXE1, C8orf48, variante.



## ABSTRACT

The familial forms of non-medullary thyroid carcinoma represent 5% of thyroid neoplasms. Eight susceptibility *loci* have already been mapped, however, to date, only the *DICER1* susceptibility gene was identified. The involvement of distinct *loci* suggests the existence of genetic heterogeneity for FNMTTC, however, its molecular basis remains essentially unknown.

The transcription factors NKX2-1, FOXE1, PAX8 and HHEX are involved in morphogenesis and differentiation of the thyroid. Recent studies have identified germline mutations in the *NKX2-1* gene in families with FNMTTC. However, the role of these transcription factors in FNMTTC etiology remains unclear.

The new technology of Whole-Exome Sequencing (WES) has facilitated the identification of susceptibility genes for several inherited diseases.

The aims of this project were to study the role of the *FOXE1* gene in FNMTTC, and the identification of new susceptibility genes for this disease using WES.

Functional studies for a *FOXE1* variant (p.A248G), which was identified in a FNMTTC family, were developed, using normal thyroid cells (PCCL3) and a papillary thyroid carcinoma cell line (TPC-1), as models. In these experiments, we observed that variant p.A248G promoted cell proliferation and migration, suggesting that this variant may be involved in thyroid tumourigenesis.

By WES, a novel variant (p.T221I) was identified in the *C8orf48* gene. This variant segregated with the disease in the family. The *C8orf48* gene interacts with proteins of the WNT signalling pathway. Preliminary studies of gene expression, identified target genes of this pathway (*CCND1* and *MYC*) which were over-expressed in the proband's thyroid tumour, relatively to normal thyroid. Functional studies will clarify the role of this variant in the tumourigenesis.

In this study, we identified potentially pathogenic variants in the *FOXE1* and *C8orf48* genes, which may represent the first evidence of their involvement in FNMTTC.

**Key Words:** thyroid, cancer, FNMTTC, WES, FOXE1, C8orf48, variant.



## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO .....	iii
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS .....	xiii
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E CONVENÇÕES .....	xv
I. INTRODUÇÃO .....	1
1. Tumorigénese.....	1
2. Glândula tiroideia.....	4
3. Neoplasias da tiróide .....	4
3.1 Adenoma Folicular.....	5
3.2 Carcinoma medular da tiróide .....	5
3.3 Carcinoma não-medular da tiróide .....	6
3.3.1 Carcinoma Papilar.....	6
3.3.2 Carcinoma Folicular .....	7
3.2.4 Carcinoma Pouco Diferenciado .....	7
3.2.5 Carcinoma anaplásico.....	7
4. Hiperplasias da tiróide .....	8
5. Formas familiares de cancro da tiróide .....	9
5.1 Aspectos clínicos do FNMTTC .....	9
5.2 Aspectos genético-moleculares do FNMTTC.....	9
6. Genes candidatos para o FNMTTC.....	11
6.1 Factores de transcrição .....	11
6.1.1 Factores de transcrição NKX2-1 e PAX8 .....	12
6.1.2 Factor de transcrição FOXE1 .....	13
6.1.3 Factor de transcrição HHEX.....	14
6.1.4 Interação dos factores de transcrição.....	15
7. Novas tecnologias na detecção de genes de susceptibilidade .....	16
7.1 Sequenciação global do exoma .....	16
8. Identificação de genes de susceptibilidade para o FNMTTC .....	17

9.	Objectivos .....	18
II.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
1.	Amostras biológicas .....	19
2.	Extracção de DNA .....	20
2.1	Extracção de DNA a partir de sangue periférico .....	20
2.2	Extracção de DNA a partir de tecido conservado em azoto líquido .....	20
2.3	Extracção de DNA a partir de blocos de parafina .....	21
3.	Extracção de RNA .....	22
3.1	Extracção de RNA a partir de tecidos congelados em azoto líquido .....	22
3.2	Extracção de RNA de células da linha celular de carcinoma papilar da tiróide (TPC-1). 23	
4.	Quantificação espectrofotométrica do DNA e RNA .....	23
5.	Síntese de cDNA por transcrição reversa do RNA .....	23
6.	Amplificação de DNA/cDNA por PCR .....	24
6.1	Optimização das condições de PCR .....	24
6.2	<i>Nested</i> PCR .....	25
7.	Electroforese dos produtos de PCR em gel de agarose .....	25
8.	Sequenciação automática .....	26
8.1	Purificação dos produtos de PCR .....	26
8.2	Reacções de Sequenciação .....	27
8.3	Precipitação dos produtos de sequenciação .....	27
8.4	Análise dos produtos de sequenciação por electroforese capilar .....	28
9.	PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) .....	28
10.	Hidrólise enzimática de produtos de PCR .....	29
11.	Vectores recombinantes .....	30
11.1	Preparação do plasmídeo pcDNA3-FOX E1-16Ala e -16Ala-A248G .....	30
12.	Cultura de células .....	30
12.1	Propagação e expansão de células .....	31
12.2	Contagem de células .....	31
12.3	Criopreservação de células .....	32
12.4	Transfecção de células TPC-1 com construções derivadas do plasmídeo PCDNA3. 32	
12.5	Estabelecimento de <i>pools</i> de células TPC-1 com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3 .....	32

12.6	Estabelecimento de clones de células PCCL3 com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3 .....	32
13.	Ensaio de migração celular .....	33
14.	Ensaio de proliferação celular .....	33
14.1	Contagem directa em hemocitómetro .....	33
14.2	Citometria de fluxo.....	34
15.	Ensaio de viabilidade celular .....	34
16.	<i>Western blot</i> .....	35
16.1	Exacção de proteínas.....	35
16.2	Separação electroforética das proteínas.....	36
16.3	Transferência para a membrana e bloqueio .....	36
16.4	Incubação com os anticorpos e detecção .....	36
17.	Sequenciação global do exoma .....	37
18.	Análise estatística.....	38
III.	RESULTADOS.....	39
1.	Estudo funcional da variante p.A248G do gene <i>FOXE1</i> .....	39
1.1	Estudos funcionais da variante p.A248G do gene <i>FOXE1</i> em células PCCL3 .....	39
1.1.1	Ensaio de proliferação celular com clones de células PCCL3.....	40
1.1.2	Ensaio de migração celular com clones de células PCCL3.....	41
1.2	Estudos funcionais da variante p.A248G do gene <i>FOXE1</i> em células TPC-1 .....	42
1.2.1	Preparação de pools de células TPC-1 com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3.....	42
1.2.2	Ensaio de proliferação celular com <i>pools</i> de células TPC-1 .....	43
1.2.2.1	Estudo da proliferação celular por contagem directa de células em hemocitómetro ...	43
1.2.2.2	Estudo da proliferação celular por citometria de fluxo .....	44
1.2.3	Ensaio de migração celular com células TPC-1.....	44
1.2.3.1	Estudo da migração celular em células TPC-1 utilizando transfecções transitórias....	45
1.2.3.2	Estudo da migração celular em células TPC-1 utilizando transfecções estáveis ( <i>pools</i> ) .....	45
1.2.4	Ensaio de viabilidade celular com <i>pools</i> de células TPC-1.....	46
1.2.5	Estudo do nível de expressão do gene <i>WNT5A</i> nas <i>pools</i> de células TPC-1 com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo PCDNA3.....	47

1.2.6	Análise de alterações somáticas em genes da via <i>MAPK</i> nos tumores das famílias 25 e 25A .....	48
2.	Estudo de genes candidatos através da sequenciação global do exoma .....	49
2.1	Estudo da variante p.S334G no gene <i>PSD3</i> na família 1 .....	50
2.2	Estudo da variante p.T22I no <i>C8orf48</i> .....	50
2.2.1	Estudo da segregação da variante p.T22I do gene <i>C8orf48</i> na família 1 .....	50
2.2.2	Estudo da expressão de genes-alvo da via <i>WNT</i> no probando da família 1 .....	51
IV.	DISCUSSÃO .....	53
	Identificação de genes de susceptibilidade para o FNMTTC através do estudo de genes candidatos envolvidos na diferenciação tiroideia .....	53
	Estudo do papel da variante p.A248G do gene <i>FOXE1</i> na proliferação, migração e viabilidade celular .....	54
	Estudo do papel da variante p.A248G do gene <i>FOXE1</i> na EMT .....	56
	Efeito da variante p.A248G do gene <i>FOXE1</i> na diferenciação celular .....	57
	Efeito da variante p.A248G do gene <i>FOXE1</i> na expressão do gene <i>WNT5A</i> .....	57
	Alterações somáticas em genes da via <i>MAPK</i> nos tumores das famílias 25 e 25A .....	58
	Génese e progressão tumoral nas famílias 25 e 25A .....	59
	Identificação de variantes genéticas através da sequenciação global do exoma na família 1 .....	59
	Gene <i>PSD3</i> .....	60
	Gene <i>C8orf48</i> .....	60
	Alterações somáticas em genes da via <i>MAPK</i> nos tumores da família 1 .....	62
	Conclusões .....	62
V.	BIBLIOGRAFIA .....	65
	ANEXOS .....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1 – Diagrama esquemático das capacidades necessárias para a progressão tumoral .....	1
Figura I.2 - Diagrama esquemático das novas capacidades para a progressão tumoral.....	2
Figura I.3 – Representação esquemática da hipótese <i>two-hit</i> formulada por Knudson .....	3
Figura I.4 – A glândula tiroideia e a sua localização anatómica .....	4
Figura I.5 – Classificação dos tumores da glândula tiróideia.....	5
Figura I.6 – Modelo de progressão dos carcinomas derivados do epitélio folicular e taxa de mortalidade associada a cada tipo de tumor .....	8
Figura I.7 – Imagem representativa da síntese das hormonas tiroideias T3 e T4.....	11
Figura I.8 - Diagrama esquemático da interação entre os factores de transcrição <i>HHEX</i> , <i>NKX2-1</i> , <i>PAX8</i> e <i>FOXE1</i> .....	15
Figura II.1 – Esquema representativo do procedimento experimental de extracção de DNA .....	20
Figura II.2 – Representação esquemática do sistema Taqman.....	28
Figura II.3 – Representação de um hemocitómetro.....	31
Figura II.4 – Representação esquemática da placa usada para o ensaio de <i>wound-healing</i> .....	33
Figura II.5 – Resumo esquemático dos passos principais da técnica de <i>Western blot</i> .....	35
Figura III.1 - Níveis de expressão relativos do gene <i>FOXE1</i> humano .....	40
Figura III.2 - Efeito da variante p.A248G no gene <i>FOXE1</i> na proliferação celular .....	40
Figura III.3 – Efeito da variante p.A248G no gene <i>FOXE1</i> na migração celular .....	41
Figura III.4 - Sequenciação do gene <i>FOXE1</i> na pool de células 16 WT. ....	42
Figura III.5 - Sequenciação do gene <i>FOXE1</i> na pool de células 16 MUT .....	42
Figura III.6 - Efeito da variante p.A248G no gene <i>FOXE1</i> na proliferação celular .....	43
Figura III.7 - Efeito da variante p.A248G no gene <i>FOXE1</i> no ciclo celular .....	44
Figura III.8 - Efeito da variante p.A248G no gene <i>FOXE1</i> na migração celular em células TPC-1 .....	45
Figura III.9 - Efeito da variante p.A248G no gene <i>FOXE1</i> na migração celular em <i>pools</i> TPC-1 .....	46
Figura III.10 - Efeito da variante p.A248G no gene <i>FOXE1</i> na viabilidade celular .....	47
Figura III.11 - Níveis de expressão relativos do gene <i>WNT5A</i> humano nas <i>pools</i> de células TPC-1..	48
Figura III.12 - Sequenciação do gene <i>BRAF</i> no indivíduo III.15 da família 25 .....	49
Figura III.13 - Árvore genealógica da família 1. ....	49
Figura III.14 - Sequenciação do gene <i>PSD3</i> .....	50
Figura III.15 - Sequenciação do <i>C8orf48</i> .....	51
Figura III.16 - Árvore genealógica da família 1 com os portadores da variante p.T22I no <i>C8orf48</i> assinalados . ....	51
Figura IV.1 – Diagrama esquemático da hipótese para a génese e progressão tumoral da tiróide nas famílias 25 e 25A com FNMTC.....	59
Figura 1 - Árvore genealógica da família 25. ....	75
Figura 2 – Árvore genealógica da família 25A. ....	75
Figura 3 - Árvore genealógica da família 1. ....	76



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I.I – Regiões de susceptibilidade para o FNMTTC mapeadas até à data.....	10
Tabela III.I – Análise de alterações somáticas nos genes <i>BRAF</i> e <i>RAS</i> em tumores das famílias 25 e 25A. ....	48
Tabela III.II – Expressão diferencial dos genes-alvo da $\beta$ -catenina no tumor do probando da família 1 e diferentes amostras de tiróide normal.....	52
Tabela I - Sequências dos <i>primers</i> e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do <i>locus FOXE1</i> . ....	76
Tabela II - Sequências dos <i>primers</i> e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do <i>locus HRAS</i> . ....	76
Tabela III - Sequências dos <i>primers</i> e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do <i>locus NRAS</i> . ....	76
Tabela IV - Sequências dos <i>primers</i> e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do <i>locus KRAS</i> . ....	77
Tabela V - Sequências dos <i>primers</i> e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do <i>locus BRAF</i> . ....	77
Tabela VI - Sequências dos <i>primers</i> e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do <i>locus C8orf48</i> . ....	77
Tabela VII - Sequências dos <i>primers</i> e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do <i>locus PSD3</i> . ....	77



## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E CONVENÇÕES

<b>A</b>	Resíduo de nucleótido contendo como base a adenina
<b>ANOVA</b>	Análise de variância ( <i>Analysis of Variance</i> )
<b>Arg</b>	Resíduo de aminoácido arginina
<b>ATC</b>	Carcinoma anaplásico da tiróide ( <i>Anaplastic Thyroid Carcinoma</i> )
<b>bp</b>	Número de pares de resíduos de nucleótidos ( <i>base pairs</i> )
<b>BRAF</b>	<i>Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1</i>
<b>BrdU</b>	5-bromo-2'-desoxiuridina
<b>C</b>	Resíduo de nucleótido contendo como base a citosina
<b>C8orf48</b>	<i>chromosome 8 open reading frame 48</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar (do mRNA) ( <i>complementary DNA</i> )
<b>CH</b>	Hipotiroidismo congénito ( <i>Congenital hypothyroidism</i> )
<b>cM</b>	Centimorgan
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>cPTC</b>	Carcinoma papilar da tiróide clássico ( <i>classic Papillary Thyroid Carcinoma</i> )
<b>Ct</b>	Ciclo de <i>threshold</i> ( <i>threshold cycle</i> )
<b>ddNTP</b>	Didesoxinucleótidos ( <i>dideoxynucleotide</i> )
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato ( <i>diethylpyrocarbonate</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido ( <i>Dimethyl sulfoxide</i> )
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>dNTP</b>	Trifosfato de desoxinucleótido ( <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i> )
<b>DTT</b>	Ditiotreitól ( <i>Dithiothreitol</i> )
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>EMT</b>	Transição epitélio-mesenquimatosa ( <i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i> )
<b>FACS</b>	Citometria de fluxo ( <i>Fluorescence-activated cell sorting</i> )
<b>FAM</b>	6-carboxi-fluoresceína
<b>FBS</b>	Soro fetal bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
<b>FNMTC</b>	Formas familiares de NMTC ( <i>Familial Nonmedullary Thyroid Carcinoma</i> )
<b>FTA</b>	Adenoma folicular da tiróide ( <i>Follicular Thyroid Adenoma</i> )
<b>FTC</b>	Carcinoma folicular da tiróide ( <i>Follicular Thyroid Carcinoma</i> )
<b>FTEN</b>	Neoplasias do epitélio folicular da tiróide ( <i>Familial Thyroid Epithelial Neoplasia</i> )
<b>FOXE1</b>	<i>Forkhead box E1</i>
<b>fvPTC</b>	Carcinoma papilar da tiróide de variante folicular ( <i>follicular variant of Papillary Thyroid Carcinoma</i> )
<b>g</b>	Gram
<b>G</b>	Resíduo de nucleótido contendo como base a guanina
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente ( <i>Green fluorescent protein</i> )
<b>Gly</b>	Resíduo de aminoácido glicina
<b>GWAS</b>	Estudos de associação que abrangem todo o genoma ( <i>Genome-wide association studies</i> )

<b>h</b>	Hora
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>HHEX</b>	Hematopoietically Expressed Homeobox
<b>Leu</b>	Resíduo de aminoácido leucina
<b>m-</b>	Mili
<b>M</b>	Molar
<b>MAPK</b>	Cascata mitogénica activada por proteínas cinase ( <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> )
<b>MEN</b>	Neoplasia endócrina múltipla ( <i>Multiple Endocrine Neoplasia</i> )
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>min</b>	Minuto
<b>MNG</b>	Bócio multinodular ( <i>Multinodular Goiter</i> )
<b>mPTC</b>	Carcinoma papilar da tiróide misto ( <i>mixed Papillary Thyroid Carcinoma</i> )
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro ( <i>messenger RNA</i> )
<b>MTC</b>	Carcinoma medular da tiróide ( <i>Medullary Thyroid Carcinoma</i> )
<b>n-</b>	Nano
<b>NGS</b>	Sequenciação da próxima geração ( <i>next-generation sequencing</i> )
<b>NKX2-1</b>	<i>NKX homeobox 1</i>
<b>NMTC</b>	Carcinoma não-medular da tiróide ( <i>Non-medullary Thyroid Carcinoma</i> )
<b>NTC</b>	Controlo negativo, sem cDNA ( <i>Non-template control</i> )
<b>onc</b>	Variante oncocítica
<b>OPTI-MEM</b>	Meio de cultura ( <i>OPTI Modified Eagle's Minimum Essential Medium</i> )
<b>OR</b>	Razão de probabilidades ( <i>Odds Ratio</i> )
<b>p</b>	Braço curto do cromossoma
<b>PAX8</b>	Paired box gene 8
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PCR</b>	Reacção em cadeia catalisada pela enzima polimerase ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
<b>PDTC</b>	Carcinoma pouco diferenciado da tiróide ( <i>Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma</i> )
<b>PK</b>	Proteinase K ( <i>Proteinase K</i> )
<b>pmol</b>	Picomol
<b>PSD3</b>	<i>Pleckstrin and Sec7 Domain containing 3</i>
<b>PTC</b>	Carcinoma papilar da tiróide ( <i>Papillary Thyroid Carcinoma</i> )
<b>q</b>	Braço longo do cromossoma
<b>RAS</b>	Rat sarcoma vírus homolog
<b>RB1</b>	Retinoblastoma 1
<b>RET</b>	Rearranged during transfection
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico ( <i>ribonucleic acid</i> )
<b>RNase</b>	Ribonuclease
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RT-PCR</b>	Reacção em cadeia catalisada pela enzima polimerase após transcrição reversa ( <i>Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction</i> )

<b>Ser</b>	Resíduo de aminoácido Serina
<b>SNP</b>	Polimorfismo de nucleótido simples ( <i>Single Nucleotide Polimorphism</i> )
<b>T</b>	Resíduo de nucleótido contendo como base a timina
<b>T3</b>	Triiodotironina
<b>T4</b>	Tetraiodotironina
<b>TAMRA</b>	6-carboxitetrametil-rodamina
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Tris-borato-EDTA
<b>TCO</b>	Tumores da tiróide com células oxifílicas ( <i>Thyroid Tumors with Oxyphilia</i> )
<b>tcPTC</b>	Carcinoma papilar da tiróide, variante de células altas ( <i>tall cell variant of Papillary Thyroid Carcinoma</i> )
<b>TD</b>	Disgénese da tiróide ( <i>Thyroid dysgenesis</i> )
<b>TET</b>	Tetracloro-6-carboxi-fluoresceína
<b>TG</b>	Tiroglobulina ( <i>Thyroglobulin</i> )
<b>TP53</b>	<i>Tumor protein 53</i>
<b>TPO</b>	Tiroperoxidase ( <i>Thyropoxidase</i> )
<b>TSH</b>	Tirotropina ou hormona estimuladora da tiróide ( <i>Thyroid-stimulating hormone</i> )
<b>U</b>	Unidade de actividade enzimática
<b>UTR</b>	Região não traduzida ( <i>Untranslated Region</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>WDTC</b>	Carcinoma da tiróide bem diferenciado ( <i>Well Differentiated Thyroid Carcinoma</i> )
<b>WES</b>	Sequenciação global do exoma ( <i>whole-exome sequencing</i> )
<b>WNT5A</b>	<i>wingless-type MMTV integration site family, member 5A</i>
<b>WT</b>	Forma não mutada de um gene ou proteína ( <i>wild type</i> )
<b>% (v/v)</b>	Percentagem expressa em volume por volume
<b>% (p/v)</b>	Percentagem expressa em peso por volume
<b>°C</b>	Grau centígrado
<b>μ-</b>	Micro



## I. INTRODUÇÃO

### 1. Tumorigénese

A tumorigénese resulta da desregulação de funções biológicas importantes para a homeostasia celular, tais como a proliferação, a diferenciação e a morte celular. Processos multifásicos e complexos, que dependem da acumulação de alterações genéticas, alteram as referidas funções biológicas e levam à transformação de células normais em células tumorais.

As células tumorais, por definição, têm a capacidade de proliferar, de invadir e de colonizar tecidos distantes, alterando o funcionamento normal dos tecidos.

Hanahan e Weinberg sugeriram que existem seis características comuns à maioria dos tumores (Figura I.1) (Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011):

- Sinalização proliferativa permanente: As células normais necessitam de sinais de crescimento para iniciar a proliferação, garantindo assim a homeostasia celular e a manutenção da estrutura dos tecidos, sendo, portanto, um processo muito controlado. No entanto, as células tumorais têm a capacidade de gerar muitos dos seus próprios sinais, tornando-se independentes do micro-ambiente que as rodeia e adquirindo, assim, a capacidade de proliferar permanentemente. Este processo deve-se sobretudo à sobre-expressão de factores de crescimento que passam a activar permanentemente os receptores membranares.

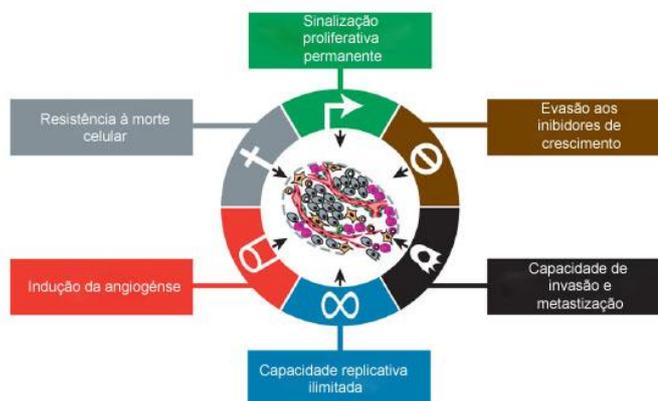


Figura I.1 – Diagrama esquemático das capacidades necessárias para a progressão tumoral (adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011)

- Evasão aos inibidores de crescimento: As células tumorais desenvolvem, também, mecanismos envolvidos na capacidade de evasão a sinais anti-proliferativos, que nas células normais actuam como sinais de *feedback* negativo para manter a homeostasia.

- Resistência à morte celular programada (apoptose): A capacidade de expansão das células tumorais depende da razão entre a taxa de proliferação e a taxa de apoptose. Assim sendo, as células tumorais não adquirem apenas uma maior capacidade proliferativa, mas adquirem também uma resistência intrínseca à morte celular.

- Capacidade replicativa ilimitada: As células de linhagens celulares normais do organismo têm uma capacidade replicativa definida e controlada. Neste sentido, é necessário que sejam inactivados mecanismos intrínsecos das células, para que as células tumorais tenham a capacidade de se multiplicar indefinidamente, levando à expansão macroscópica do tumor. Este processo é designado de imortalização das células tumorais.

- Indução da angiogénese: Para haver uma expansão tumoral é necessário que haja uma rede de vasos sanguíneos que assegure as necessidades metabólicas destas células. As células tumorais

adquirem a capacidade de induzir a formação de vasos sanguíneos (processo designado por angiogénese), de forma a sobreviverem.

• Capacidade de invasão dos tecidos e metastização: No desenvolvimento da maioria dos cancros, as células do tumor primário adquirem a capacidade de invadir outros tecidos. A invasão deve-se, em parte, à activação constitutiva ou transitória de um programa celular designado por transição epitélio-mesenquimatosa (EMT - *Epithelial-Mesenchymal Transition*), no qual células epiteliais se transformam progressivamente em células mesenquimatosas. Durante a EMT ocorre a supressão da expressão da E-caderina e o aumento da expressão de proteínas, como a vimentina e a miosina. Deste modo, este mecanismo está envolvido na aquisição de motilidade e de propriedades invasivas e metastáticas. No processo de metastização, as células tumorais disseminam-se para locais mais afastados, onde não há factores limitantes que condicionem a sua expansão

Para além destas características comuns e amplamente aceites, têm sido propostas novas características envolvidas na transformação de uma célula normal numa célula tumoral, tais como: evasão ao sistema imune e desregulação do metabolismo celular (Figura I.2) (Hanahan e Weinberg, 2011).



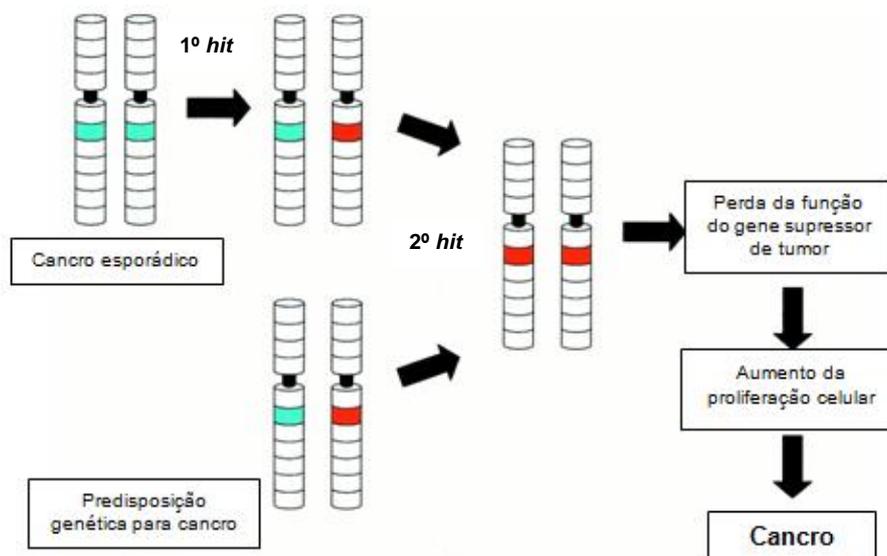
**Figura I.2** - Diagrama esquemático das novas capacidades para a progressão tumoral (adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011)

Num processo normal, o sistema imunitário é responsável pela monitorização e vigilância dos tecidos, desempenhando funções que permitem a resistência e erradicação de grande parte das células tumorais, designada de imunidade anti-tumoral. O que significa que um tumor para se propagar necessita de mecanismos de resistência a esta imunidade, como por exemplo, adquirir a capacidade de desactivar componentes do sistema imunológico. Um modelo proposto recentemente sugere que esta evasão ao sistema imune resulta da selecção de variantes tumorais que são resistentes à sua acção (Dunn *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Hanahan e Weinberg, 2011).

Por outro lado, para sustentar a elevada proliferação, as células tumorais têm de aumentar a taxa de reacções metabólicas (Tennant *et al.*, 2010; Levine e Puzio-Kuter, 2010). É portanto necessário que se dê uma mudança no metabolismo das células tumorais, para que adquiram vantagem sobre as restantes células do organismo. Este fenótipo permite-lhes uma menor dependência da respiração aeróbia, uma vez que passam a ter uma maior capacidade de produzir energia através da glicólise. Esta alteração do metabolismo deve-se, principalmente, ao aumento da expressão de proteínas da via da glicólise e de inibidores do metabolismo mitocondrial (Hsu e Sabatini, 2008; Tennant *et al.*, 2010).

A instabilidade genómica, que pode gerar mutações aleatórias e rearranjos cromossómicos, é um processo fulcral para a tumorigénese. Estas alterações genómicas acontecem principalmente em oncogenes e genes supressores de tumor (Berdasco e Esteller, 2010), que podem potenciar (de forma anómala) ou perder a sua função, respectivamente, resultando na desregulação, em termos quantitativos e/ou funcionais do seu produto.

Os genes supressores de tumor funcionam de forma a inibir o crescimento e proliferação anormal das células e uma vez alterados deixam de regular o ciclo celular, o que se traduz numa proliferação celular não controlada, conduzindo à tumorigénese (Weinberg, 1994; Loh, 1997). Knudson, em 1971, formulou a hipótese *two-hit* para a inactivação destes genes (Figura 1.3). De acordo com esta hipótese, em indivíduos que herdassem uma cópia mutada do gene (o primeiro *hit* presente nas células germinais e, conseqüentemente, 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 por inactivação de um gene supressor de tumor. Em tumores esporádicos, para que ocorra a inactivação de um gene supressor de tumor, é necessário que ocorram duas mutações somáticas (Knudson, 1971).



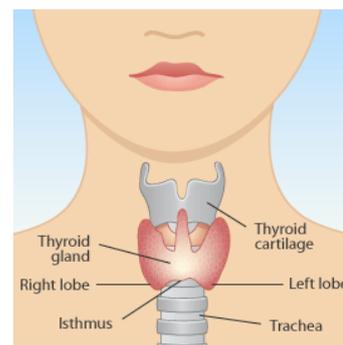
**Figura 1.3** – Representação esquemática da hipótese *two-hit* formulada por Knudson (adaptado de Gutmann, 2001)

No processo tumoral, estão também envolvidos com frequência os oncogenes, que são activados a partir dos proto-oncogenes. Os proto-oncogenes codificam proteínas que permitem às células responderem a factores de crescimento. O oncogene codifica, portanto, uma proteína com as funções constitutivamente activas, que mimetiza os sinais de crescimento normal, promovendo a transformação celular e contribuindo para o desenvolvimento tumoral (Weinberg, 1994; Hanahan e Weinberg, 2000). Enquanto que, a inativação dos genes supressores de tumor requer a inativação de ambos os alelos (por mutação ou outros mecanismos), tratando-se de genes recessivos a nível celular, a activação dos oncogenes apenas requer a mutação de um dos alelos, uma vez que estes são genes dominantes.

Estas características moleculares das células tumorais vão sendo adquiridas, ao longo do tempo, por mecanismos diversos, dependendo do tipo de tumor.

## 2. Glândula tiroideia

A tiróide, localizada na região cervical junto à traqueia, é uma glândula endócrina composta por dois lobos unidos por um istmo (Figura I.4). O tamanho e a aparência desta glândula no adulto variam de acordo com o sexo, com a sua actividade funcional, com o seu estado hormonal e com a incorporação de iodo (Muro-Cacho e Ku, 2000a). Esta glândula é responsável pela síntese das hormonas triiodotironina (T3) e tiroxina ou tetraiodotironina (T4). Estas hormonas são essenciais para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência dos vertebrados, uma vez que regulam funções vitais do organismo, tais como a temperatura corporal, a frequência cardíaca, a pressão arterial e a função intestinal (Nitsch *et al.*, 2010; Fagman e Nilsson, 2011).



**Figura I.4** – A glândula tiroideia e a sua localização anatómica (adaptado de [www.abc.net.au/health/library/stories/2005/06/16/1831822.htm](http://www.abc.net.au/health/library/stories/2005/06/16/1831822.htm))

Na fase inicial da embriogénese, a tiróide desenvolve-se a partir de células da faringe primitiva, que expressam factores de transcrição específicos, migrando até à sua localização anatómica final. Só posteriormente se formam os lobos tiroideus, localizados em ambos os lados da traqueia (Lazzaro *et al.*, 1991; Fagman e Nilsson, 2011).

A tiróide é constituída por muitos tipos celulares que derivam das três camadas germinais (Damante e DiLauro, 1994). No entanto, existem duas populações de células com maior importância: as células C (ou parafoliculares) e as células foliculares. As células C produzem a calcitonina (Muro-Cacho e Ku, 2000a), enquanto que as células foliculares, que são o tipo celular mais abundante e as únicas que derivam da endoderme, são responsáveis pela formação de estruturas esféricas, preenchidas com colóide, onde é armazenado o iodo (Damante e DiLauro, 1994; Muro-Cacho e Ku, 2000a).

## 3. Neoplasias da tiróide

Os tumores da tiróide correspondem a cerca de 1% de todas as ocorrências mundiais de cancro, sendo as neoplasias mais frequentes do sistema endócrino. Apresentam maior incidência em mulheres (numa razão de aproximadamente 3:1) e ocorrem principalmente em adultos, sendo raros em crianças (DeLellis *et al.*, 2004; Vriens, 2009).

O desenvolvimento dos carcinomas da tiróide pode ser influenciado por factores ambientais, hormonais ou genéticos e pela interacção entre eles (DeLellis *et al.*, 2004; Kondo *et al.*, 2006). A influência dos factores ambientais tem uma grande relevância, uma vez que a função da tiróide depende do iodo disponível no ambiente. Estes factores podem ser separados em efeitos genotóxicos, causados pelo iodo radioactivo, levando a danos no DNA, e não-genotóxicos resultantes da deficiência em iodo (DeLellis *et al.*, 2004). Como já foi referido, existe uma maior prevalência de cancro da tiróide nas mulheres em relação aos homens, sendo esta diferença menor em crianças e idosos, o que sugere o envolvimento de factores hormonais (DeLellis *et al.*, 2004; Farid, 2004). Os factores genéticos envolvidos no cancro da tiróide serão abordados nas próximas secções.

Estima-se que em 2011 surgiram cerca de 48000 novos casos de cancro da tiróide nos Estados Unidos da América (Siegel *et al.*, 2011), havendo um notório aumento do número de casos reportados. A causa deste aumento poderá ser explicada pelo aumento da radiação ou pelo facto de haver uma deteção cada vez mais precoce, que permite a identificação de tumores de menores dimensões (DeLellis *et al.*, 2004). No entanto, a taxa de mortalidade associada a estas neoplasias não acompanha a tendência observada para o número de casos, uma vez que tem vindo a diminuir, principalmente devido ao uso de métodos de diagnóstico mais sensíveis e eficazes (DeLellis *et al.*, 2004). As neoplasias da tiróide, de uma forma geral, têm um bom prognóstico, o que pode, em parte, ser explicado pela baixa taxa de proliferação celular (Biersack e Grünwald, 2005).

As neoplasias da tiróide podem ser divididas em benignas e malignas. As benignas são designadas por adenomas (e.g. adenoma folicular; *Follicular Thyroid Adenoma* - FTA) e as malignas são designadas por carcinomas (Muro-Cacho e Ku, 2000a). Os carcinomas podem ter origem nas células parafoliculares (células C) ou nas células foliculares (Figura I.5). 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) (Muro-Cacho e Ku, 2000a; Vriens, 2009). Os NMTC englobam os carcinomas papilares (PTC), os carcinomas foliculares (FTC), os carcinomas pouco diferenciados (PDTC) e os carcinomas anaplásicos (ATC) (Figura I.5).

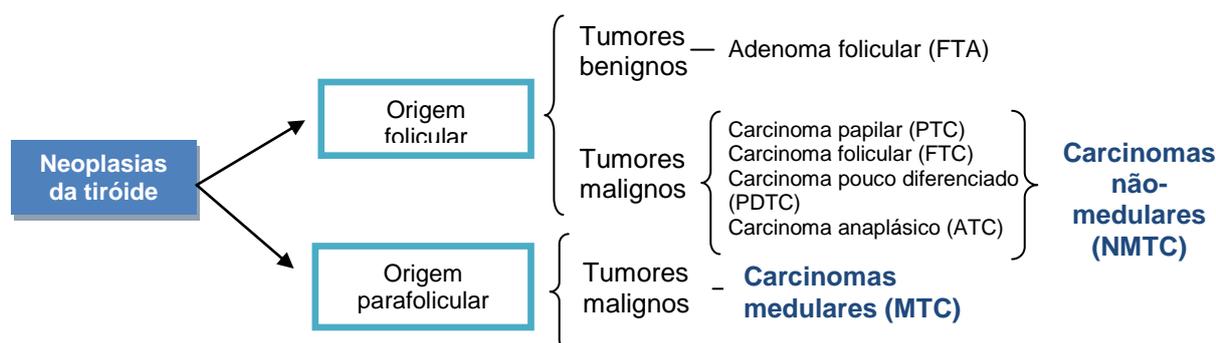


Figura I.5 – Classificação dos tumores da glândula tireoideia (adaptado de Muro-Cacho e Ku, 2000a)

### 3.1 Adenoma Folicular

O FTA é um tumor benigno e encapsulado, com evidência de diferenciação das células foliculares (DeLellis *et al.*, 2004). É mais frequente em mulheres do que em homens.

### 3.2 Carcinoma medular da tiróide

Os carcinomas medulares da tiróide (*Medullary Thyroid Carcinoma* - MTC) têm origem nas células parafoliculares (ou células C) e correspondem a menos de 10% de todos os tipos de tumores da tiróide (Muro-Cacho e Ku, 2000b). A grande maioria dos tumores (cerca de 75%) são esporádicos, embora possam ocorrer, em cerca de 25% dos casos, associados a uma predisposição familiar (autossômica dominante). Neste caso, pode ocorrer como um evento isolado (*Family Medullary Thyroid Carcinoma* - FMTC) ou no contexto de síndromes de neoplasias endócrinas múltiplas (*MEN*) do tipo 2A e 2B, devido a mutação germinal activadora no proto-oncogene *RET* (*REarranged during*

*Transfection*). Em casos esporádicos de MTC são também encontradas mutações no gene *RET* em 12-100% dos casos (Dvorakova *et al.*, 2008).

Apesar de ser evidente que mutações activadoras no *RET* são cruciais para o desenvolvimento de MTC, existem casos de MTC negativos para mutações neste gene, sendo que em 68% destes casos foram encontradas mutações no oncogene *RAS* (*Rat sarcoma virus homolog*). Assim, é possível que a activação dos proto-oncogenes *RAS* e *RET* representem eventos alternativos para a tumorigénese de MTC (Moura *et al.*, 2011).

### 3.3 Carcinoma não-medular da tiróide

As neoplasias com origem nas células foliculares são designadas por carcinomas não-medulares da tiróide (*Nonmedullary Thyroid Carcinoma* – NMTC). Estes carcinomas representam cerca de 80 a 95% de todos os casos de carcinomas da tiróide (Capezzone *et al.*, 2008). Estas neoplasias podem ser divididas de acordo com o grau de diferenciação em bem diferenciadas, pouco diferenciadas e indiferenciadas (Kondo *et al.*, 2006). Os carcinomas bem diferenciados (*Well Differentiated Thyroid Carcinoma* - WDTC) englobam dois histotipos tumorais: os carcinomas papilares (*Papillary Thyroid Carcinoma* - PTC) e os carcinomas foliculares (*Follicular Thyroid Carcinoma* - FTC). Os carcinomas com baixo nível de diferenciação são designados de pouco diferenciados (*Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma* - PDTC) e os indiferenciados são denominados de anaplásicos (*Anaplastic Thyroid Carcinoma* - ATC) (Muro-Cacho e Ku, 2000a) (Figura 1.5).

A grande maioria dos carcinomas derivados do epitélio folicular são indolentes e tratados com cirurgia, normalmente com um bom prognóstico. Contudo, para os tumores mais agressivos (PDTC e ATC) ainda não existe uma forma efectiva de tratamento (Kondo *et al.*, 2006).

#### 3.3.1 Carcinoma Papilar

O PTC é um tumor maligno do epitélio folicular da tiróide, que apresenta diferenciação das células foliculares e é portanto considerado um 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” (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 e Ku, 2000a; Bonora *et al.*, 2010).

O PTC representa cerca de 80% dos NMTC, sendo por isso o tumor mais frequente da tiróide (Farid, 2004; Sippel *et al.*, 2007). A idade no diagnóstico varia entre os 20 e os 50 anos, sendo mais frequente nas mulheres do que nos homens (2-4:1) e raro em crianças (Schlumberger, 1998; Muro-Cacho e Ku, 2000a; DeLellis *et al.*, 2004).

Nos PTC clássicos (cPTC) são detectados rearranjos que envolvem o proto-oncogene *RET*, designados por *RET/PTC* em 20 a 80% dos casos (DeLellis *et al.*, 2004) e mutação no oncogene *BRAF* [*Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1*] em cerca de 53% dos casos (Sobrinho-Simões *et al.*, 2005). Por outro lado, na variante folicular de PTC (fvPTC) são detectados rearranjos *PAX8/PPAR $\gamma$*  em cerca de 40% dos casos, mutações no *RAS* em 25% dos casos e mutações *BRAF* (*Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1*) em 10% dos casos (Castro *et al.*, 2006).

### 3.3.2 Carcinoma Folicular

O FTC é um tumor maligno com evidência de diferenciação das células foliculares (DeLellis *et al.*, 2004; Biersack e Grünwald, 2005) e é também designado como WDTC (Chow *et al.*, 2002), representando cerca de 15% dos NMTC. É geralmente um tumor sólido, encapsulado, com dimensões superiores a 1 cm de diâmetro, aparecendo normalmente como um único foco isolado (Schlumberger, 1998; DeLellis *et al.*, 2004; Sobrinho-Simões *et al.*, 2011). 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; Chow *et al.*, 2002; Farid, 2004; Bonora *et al.*, 2010).

Apesar de apresentarem características comuns com os casos de PTC, os doentes com FTC tendem a ter uma idade de diagnóstico mais avançada, com um pico de incidência entre os 50 e os 60 anos, sendo mais comum nas mulheres e em indivíduos expostos a radiação (Muro-Cacho e Ku, 2000a; Chow *et al.*, 2002; DeLellis *et al.*, 2004; Bonora *et al.*, 2010). Em mais de 20% dos FTC estão presentes mutações no proto-oncogene *RAS* e em 25-50% destes carcinomas é encontrado o rearranjo *PAX8/PPAR $\gamma$*  (Marques *et al.*, 2002; DeLellis *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2006).

### 3.2.4 Carcinoma Pouco Diferenciado

O PDTC representa menos de 10% dos casos de NMTC (Bonora *et al.*, 2010). É uma neoplasia com origem nas células foliculares, com comportamento e morfologia compreendidas entre os carcinomas bem diferenciados e os indiferenciados (DeLellis *et al.*, 2004). A maioria destes tumores apresenta mais de 3 cm de diâmetro (Muro-Cacho e Ku, 2000a; DeLellis *et al.*, 2004).

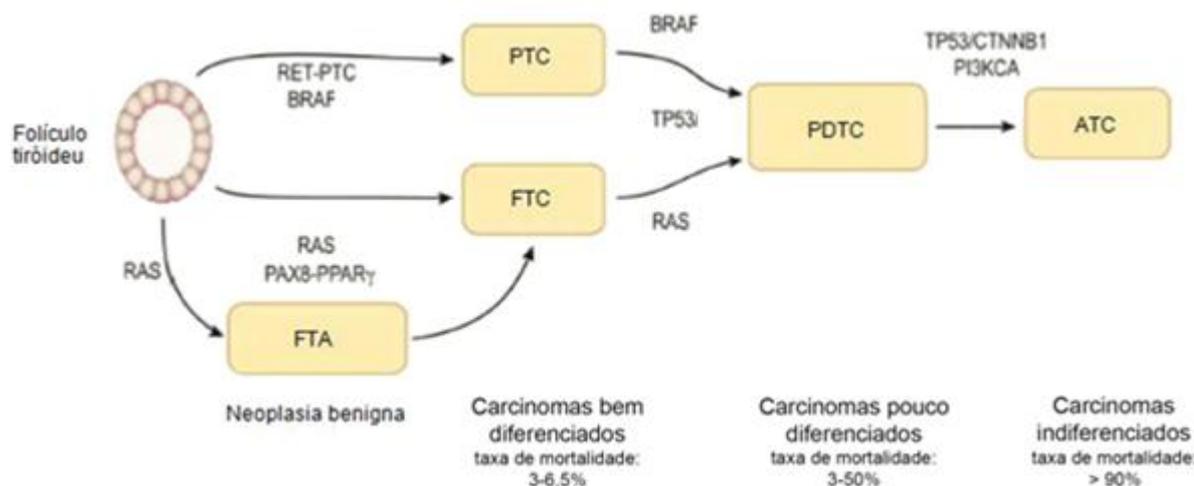
Este tipo de carcinoma é mais comum em mulheres e acima dos 50 anos. A taxa de mortalidade é elevada nos primeiros 3 anos após diagnóstico e poucos doentes sobrevivem mais de 5 anos, normalmente devido à ocorrência de metástases. Neste tipo de tumor, são frequentes mutações no gene *TP53* (*Tumor protein 53*) e no gene *RAS*, podendo também ocorrer mutação no oncogene *BRAF*, sugerindo uma transição de WDTC para PDTC (DeLellis *et al.*, 2004).

### 3.2.5 Carcinoma anaplásico

O ATC é um carcinoma derivado do epitélio folicular, composto parcial ou completamente por células indiferenciadas. Representa menos de 5% dos casos de NMTC, sendo o tipo de tumor menos frequente (DeLellis *et al.*, 2004; Bonora *et al.*, 2010), contudo, é responsável por mais de 50% das mortes associadas aos tumores da tiróide (Catalano *et al.*, 2012). É, portanto, um dos tumores com maior taxa de mortalidade em humanos (DeLellis *et al.*, 2004; Wiseman *et al.*, 2007; Bonora *et al.*, 2010). Em 30% dos casos, o ATC co-existe com outros carcinomas ou hiperplasias da tiróide (Soares *et al.*, 2011).

O ATC é geralmente um tumor não-encapsulado que invade os tecidos extra-tiroideus. É um tumor característico de indivíduos de idade avançada, com uma idade média no diagnóstico de 60 anos, sendo mais frequente nas mulheres do que nos homens (3-4:1). 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 (Muro-Cacho e Ku, 2000a; DeLellis *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2011).

É normalmente aceite que os ATCs podem ocorrer *de novo*, contudo, alguns estudos sugerem uma progressão dos tumores bem diferenciados (PTC e FTC), que normalmente são tratados com sucesso, através de cirurgia e iodo radioativo, para os tumores pouco diferenciados e anaplásicos, que não têm um tratamento efectivo, sendo o PDTC uma forma intermédia desta progressão (Kondo *et al.*, 2006; Patel e Shaha, 2006). O modelo proposto sugere que o aumento das mutações e alterações cromossómicas e epigenéticas, leva a uma acumulação de eventos sequenciais que resultam na desdiferenciação celular. É frequente encontrarem-se mutações, por exemplo, no gene supressor de tumor *TP53*, no gene *CTNNB1* (*catenin (cadherin-associated protein), beta 1*) e no gene *PI3KCA* (*phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide*) (DeLellis *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2011; Sastre-Perona e Santisteban, 2012), que não estão presentes nos WDTC, sugerindo que é necessário que surjam alterações em novos genes para que ocorra a desdiferenciação celular (Soares *et al.*, 2011). Com a desdiferenciação celular aumenta a agressividade dos tumores e consequentemente a taxa de mortalidade associada (Figura I.6) (Clark e Faquin, 2010).



**Figura I.6** – Modelo de progressão dos carcinomas derivados do epitélio folicular e taxa de mortalidade associada a cada tipo de tumor (adaptado de Clark e Faquin, 2010; Sastre-Perona e Santisteban, 2012)

Os ATC são compostos por células que apresentam um fenótipo mesenquimatoso o que as torna mais invasivas, uma vez que perdem a capacidade de adesão intercelular (Catalano *et al.*, 2012).

#### 4. Hiperplasias da tiróide

As hiperplasias ou bóciros originam um aumento de volume da glândula tiroideia. Estas hiperplasias podem ser difusas, quando existe um aumento de todas as células da tiróide, ou nodulares, quando apenas algumas células sofrem um aumento, formando nódulos bem definidos. O bócio nodular pode ainda ser classificado como uninodular ou multinodular (*Multinodular Goiter* – MNG), consoante o número de nódulos (Krohn *et al.*, 2005).

## 5. Formas familiares de cancro da tiróide

### 5.1 Aspectos clínicos do FNMTTC

A maioria dos carcinomas da tiróide ocorre de forma esporádica (LiVolsi e Baloch, 2009), contudo podem também apresentar-se como formas familiares. Estes casos podem ser separados em duas categorias (LiVolsi e Baloch, 2009). Uma primeira categoria engloba as formas familiares de NMTC (*Familial Nonmedullary Thyroid Carcinoma* - FNMTTC), que representam 3 a 7% de todos os casos de carcinomas não-medulares, nas quais o tumor tiroideu é a lesão principal (Hemminki *et al.*, 2008; Nose, 2008; Bonora *et al.*, 2010; Moses *et al.*, 2011). Esta associação familiar é mais frequente em casos com PTC, embora seja ocasionalmente relatada para casos com FTC (Malchoff e Malchoff, 2006; McDonald *et al.*, 2011).

A segunda categoria corresponde à manifestação de lesões tiroideias associadas a síndromes neoplásicas hereditárias com manifestações extratiroideias (Malchoff e Malchoff, 2006; Nose, 2008). Estas síndromes incluem a polipose adenomatosa familiar, a síndrome de Cowden (síndrome de hamartoma múltiplo), o complexo de Carney tipo 1, a síndrome de Werner e a síndrome de Peutz-Jeghers (Sturgeon e Clark, 2005; Nose, 2008; Moses *et al.*, 2011). Estas síndromes neoplásicas estão bem caracterizadas do ponto de vista genético, sendo já conhecidos os genes envolvidos.

O FNMTTC apresenta uma prevalência idêntica entre homens e mulheres. Estes casos podem também apresentar nódulos benignos da tiróide (MNG e FTA). De um modo geral, os tumores dos casos com FNMTTC apresentam certas características comuns a outros tumores associados a síndromes neoplásicas hereditárias, tais como a manifestação em idades mais precoces e multifocalidade (LiVolsi e Baloch, 2009). Além destas características, quando comparados com as formas esporádicas, estes tumores familiares apresentam com maior frequência bilateralidade, metastização para os nódulos linfáticos, invasão da cápsula e recorrência (Grossman *et al.*, 1995; Malchoff e Malchoff, 2006; Sippel *et al.*, 2007; LiVolsi e Baloch, 2009; Moses *et al.*, 2011). Deste modo, alguns autores sugerem que as formas familiares de NMTC são mais agressivas do que as esporádicas, contudo existem também alguns estudos que defendem que tanto os tumores familiares como os esporádicos devem ser tratados da mesma forma, uma vez que têm uma agressividade idêntica (Moses *et al.*, 2011).

O padrão de transmissão de FNMTTC é compatível com autossómico dominante, com penetrância incompleta que aumenta com a idade (Malchoff e Malchoff, 2006; Vriens *et al.*, 2009).

O estabelecimento de um diagnóstico molecular para o FNMTTC possibilitará o rastreio precoce dos portadores, com benefícios no tratamento e seguimento clínico, diminuindo a morbilidade e a mortalidade associadas a esta doença (Bonora *et al.*, 2010).

### 5.2 Aspectos genético-moleculares do FNMTTC

A base molecular do FNMTTC ainda não é bem conhecida (Malchoff e Malchoff, 2006), sendo portanto necessário identificar o(s) gene(s) responsável(is) pela predisposição para esta doença.

Vários grupos realizaram análises de *linkage* globais (*Genome-Wide Linkage Analysis* - GWLA), usando marcadores de microssatélites distribuídos pelo genoma, em famílias informativas com múltiplos familiares afectados (Bonora *et al.*, 2010). Estas análises genéticas representam os

primeiros passos na identificação de genes de susceptibilidade por clonagem posicional (Malchoff e Malchoff, 2006).

As análises de *linkage* possibilitaram a identificação de várias regiões cromossômicas onde se localizam genes de susceptibilidade para o FNMTc (DeLellis *et al.*, 2004; Malchoff e Malchoff, 2006; Moses *et al.*, 2011; Landa e Robledo, 2011). Contudo, até à data, apesar de já terem sido mapeadas oito regiões de susceptibilidade para o FNMTc, apenas um destes genes de susceptibilidade foi identificado. Estas oito regiões encontram-se sumarizadas na Tabela I.I:

**Tabela I.I** – Regiões de susceptibilidade para o FNMTc mapeadas até à data.

<i>Locus</i>	Localização cromossômica	Fenótipo	Referências
<b><i>MNG1</i></b>	14q31	MNG e baixa prevalência de NMTC	Bignell <i>et al.</i> , 1997
<b><i>TCO</i></b>	19p13.2	Forma rara de NMTC com células oxífilas	Canzian <i>et al.</i> , 1998
<b><i>fPTC/PRN</i> ou <i>PRN1</i></b>	1p13.2-q21	PTC e carcinoma papilar renal (PRN)	Malchoff <i>et al.</i> , 2000
<b><i>NMTC1</i></b>	2q21	Susceptibilidade para PTC	McKay <i>et al.</i> , 2001
<b><i>FTEN</i></b>	8p23.1-p22	Neoplasias do epitélio folicular	Cavaco <i>et al.</i> , 2008b
	8q24	Susceptibilidade para PTC	He <i>et al.</i> , 2009
	6q22	Susceptibilidade para FNMTc	Suh <i>et al.</i> , 2009
	1q21	Susceptibilidade para FNMTc	Suh <i>et al.</i> , 2009

No *locus MNG1*, foi recentemente identificado o gene de susceptibilidade *DICER1*. Mutações neste gene estão associadas tanto com MNG e baixa prevalência ou ausência de NMTC, como com MNG e tumores do ovário (Frio *et al.*, 2011). Contudo, estudos de *linkage* anteriores sugerem que este gene não está frequentemente envolvido na manifestação de FNMTc (Bignell *et al.*, 1997).

O envolvimento evidente de várias regiões cromossômicas sugere a existência de heterogeneidade genética para o FNMTc, o que de algum modo está de acordo com as diferentes manifestações clínicas e histológicas desta doença.

Para além dos estudos de mapeamento genético, a identificação de genes de susceptibilidade para o FNMTc pode ser feita através do estudo directo de genes candidatos (*Candidate Gene Approach*). Neste sentido, foram já analisados vários genes candidatos, que foram seleccionados utilizando como critérios o seu envolvimento nos NMTC esporádicos (e.g. *RET* e *MET*) e/ou em síndromes neoplásicas hereditárias (e.g. *PTEN* e *APC*), contudo não foi encontrada evidência do envolvimento de nenhum destes genes na etiologia molecular do FNMTc (Canzian *et al.*, 1998; Malchoff *et al.*, 2000).

O estudo de genes candidatos relacionados com a função tiroideia, entre os quais se destacam os genes importantes para a morfogénese da tiróide durante a embriogénese e para a manutenção da diferenciação desta glândula no adulto, representa uma abordagem alternativa para a identificação de genes de susceptibilidade.

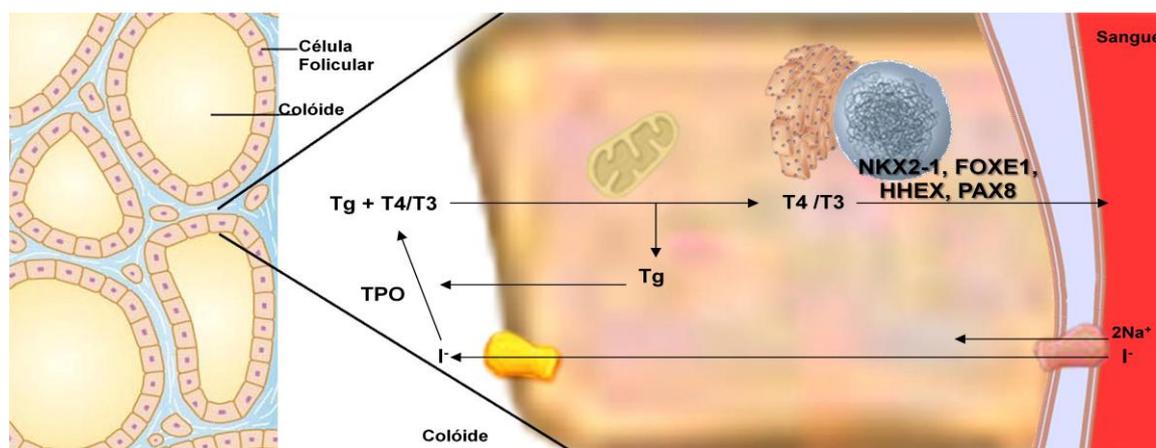
## 6. Genes candidatos para o FNMTC

### 6.1 Factores de transcrição

Alguns genes candidatos para a disgenésia 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; De Felice e Di Lauro, 2004; Al Taji *et al.*, 2007).

Os factores de transcrição mais importantes para a função tiroideia são o NKX2-1 (NK2 homeobox 1 ou Thyroid Transcription Factor-1 - TTF1) (Lazzaro *et al.*, 1991), o PAX8 (Paired box 8) (Plachov *et al.*, 1990), o FOXE1 (Forkhead Box E1 ou Thyroid Transcription Factor-2 - TTF2) (Zannini *et al.*, 1997) e o HHEX (Hematopoietically Expressed Homeobox) (Thomas *et al.*, 1998). 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).

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 tiroglobulina (TG), tiroperoxidase (TPO), receptor da tirotropina (*thyroid stimulating hormone receptor* – TSHR) e simporte iodo/sódio (Civitareale *et al.*, 1989; Kimura *et al.*, 1996; Miccadei *et al.*, 2002; Ngan *et al.*, 2009; Kimura, 2011). Estes genes estão envolvidos na produção das hormonas T3 e T4. As hormonas são produzidas no colóide das células foliculares, onde o iodo é incorporado nos resíduos de tirosina da TG pela enzima TPO (Adjadj *et al.*, 2009). Quando ocorre estimulação hormonal pela tirotropina ou hormona estimuladora da tiróide (TSH), ocorre hidrólise da TG e as hormonas T3 e T4 são libertadas para a corrente sanguínea (Figura I.7) (Francis-Lang *et al.*, 1992; Gudmundsson *et al.*, 2009).



**Figura I.7** – Imagem representativa da síntese das hormonas tiroideas T3 e T4 (imagem original)

O estudo de ratinhos *knock-out* revelou um papel crítico destes factores de transcrição na diferenciação celular, durante a embriogénese e posterior desenvolvimento normal da tiróide (Hanahan e Weinberg, 2000; Puppini *et al.*, 2004; Al Taji *et al.*, 2007; Kimura, 2011).

Ratinhos *NKX2-1*<sup>-/-</sup> nascem sem tiróide, uma vez que, embora o primórdio da tiróide se forme na posição correcta, os precursores das células tiroideias sofrem posteriormente apoptose (Kimura *et al.*, 1996). Em embriões de ratinho *PAX8*<sup>-/-</sup>, as fases iniciais da organogénese decorrem normalmente, mas o primórdio da tiróide é muito pequeno sendo composto essencialmente por células C (Mansouri *et al.*, 1998). Nestes ratinhos, não existe expressão do factor de transcrição FOXE1 na tiróide, sugerindo que há uma estreita relação entre estes dois genes (Parlato *et al.*, 2004). Em embriões de ratinhos *FOXE1*<sup>-/-</sup>, as células precursoras da tiróide não migram e mantêm-se ligadas ao pavimento da faringe, resultando na formação de uma glândula ectópica (De Felice *et al.*, 1998). Em ratinhos *HHEX*<sup>-/-</sup>, o primórdio da tiróide está ausente ou muito reduzido (Martinez Barbera *et al.*, 2000).

Estes genes representam assim bons alvos de estudo para elucidar os mecanismos moleculares que estão envolvidos na iniciação tumoral na tiróide (Fagman e Nilsson, 2011).

### 6.1.1 Factores de transcrição NKX2-1 e PAX8

Como já foi referido, o factor de transcrição NKX2-1 tem um papel fundamental na regulação do desenvolvimento e na manutenção do estado diferenciado das células da tiróide (Civitareale *et al.*, 1989; Miccadei *et al.*, 2002). A proteína NKX2-1 é expressa na tiróide, no pulmão e em regiões restritas do cérebro (no diencéfalo e neurohipófise), durante a embriogénese e no adulto (Lazzaro *et al.*, 1991; Damante e DiLauro, 1994). O NKX2-1 tem um papel activador da transcrição 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 e DiLauro, 1994; Zannini *et al.*, 1997; Miccadei *et al.*, 2002; Di Palma *et al.*, 2003; Altmann *et al.*, 2005).

Em 2009, foi identificada uma mutação germinal (p.A339V) neste gene em 4 doentes (não relacionados), dos quais 2 eram pertencentes a famílias com MNG e PTC (Ngan *et al.*, 2009). A identificação desta mutação representou a primeira evidência do envolvimento do factor de transcrição *NKX2-1* no cancro da tiróide com origem familiar. Evidências baseadas em estudos de associação que abrangeram todo o genoma (GWAS) revelaram 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 x 10<sup>-8</sup>) (Gudmundsson *et al.*, 2009). Existe também a evidência que indivíduos homocigóticos para esta variante e para o alelo A do rs965513, localizado a montante do gene *FOXE1*, apresentam 5,7 vezes maior risco de FTC e PTC (Gudmundsson *et al.*, 2009, Matsuse *et al.*, 2011).

O factor de transcrição PAX8 tem um papel fundamental na indução e na manutenção da diferenciação das células da glândula tiroideia. O seu papel enquanto regulador da transcrição dos genes *TG* e *TPO* ainda não é totalmente conhecido, mas crê-se que funcione como activador (Zannini *et al.*, 1992; Miccadei *et al.*, 2002; Di Palma *et al.*, 2003). A análise dos locais de ligação às regiões reguladoras dos genes *TG* e *TPO* sugere que o PAX8 coopere com o NKX2-1. O promotor do gene *TPO* é preferencialmente activado pelo PAX8 (Damante e DiLauro, 1994; Zannini *et al.*, 1997; Miccadei *et al.*, 2002; Di Palma *et al.*, 2003). No entanto, este factor de transcrição não activa a expressão do gene *TG* na ausência da proteína NKX2-1 (Pasca di Magliano *et al.*, 2000).

Nos PTC, a expressão de *NKX2-1* é detectável, enquanto que nos ATC é indetectável (D'Elia *et al.*, 2002). Por outro lado, não é detectada expressão do gene *PAX8* em PTC ou em ATC (Fabbro *et al.*, 1998; D'Elia *et al.*, 2002). Estas evidências sugerem que para ocorrer a desdiferenciação dos tumores é necessário que haja uma perda da expressão destes genes.

### 6.1.2 Factor de transcrição FOXE1

O factor de transcrição FOXE1 é expresso apenas na tiróide e na hipófise anterior (Zannini *et al.*, 1997). Uma vez que, na ausência da expressão deste gene a tiróide é ectópica, é possível que o FOXE1 esteja envolvido no processo de migração.

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, o que sugere que a presença de *FOXE1* nas células precursoras da tiróide previne a diferenciação celular, que poderia afectar a migração. Este mecanismo poderá estar associado à repressão da expressão de 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*, através da inibição da actividade transcripcional do *NKX2-1* e do *PAX8* (Zannini *et al.*, 1997; Perrone *et al.*, 2000). No entanto, um estudo mais recente (*in vitro*) propôs que o factor de transcrição FOXE1 tem um papel “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 (Cuesta *et al.*, 2007).

Foram já identificadas variantes patogénicas no gene *FOXE1*, entre as quais se encontram as mutações *missense* (p.A65V e p.S57N), detectadas em indivíduos com agénese da tiróide (Park e Chatterjee, 2005).

A proteína FOXE1 possui uma região de polialaninas de tamanho variável (11 a 19 resíduos de alanina), sendo que são os alelos com 14 e 16 resíduos de alaninas (Ala) os mais frequentes na população (> 95% dos indivíduos) (Carré *et al.*, 2007; Bullock *et al.*, 2012). A variação de tamanho das regiões de polialaninas em factores de transcrição está associada com inúmeras doenças (Brown e Brown, 2004). Existem diversos estudos sobre o efeito das variantes dos resíduos de alaninas do FOXE1. Segundo Carré *et al.*, o genótipo 16/16 pode estar associado a um efeito protector para a disgénese da tiróide (Carré *et al.*, 2007). Contudo, num outro estudo, verificou-se que o alelo 16-Ala era significativamente mais frequente nos casos com hipotiroidismo congénito (CH) do que nos controlos, sugerindo que este número de cópias possa estar associado a um risco para CH (Santarpia *et al.*, 2007). Recentemente, foram publicados três estudos que sugerem que o alelo 16-Ala pode estar associado a uma maior predisposição para neoplasias da tiróide, em diferentes populações Europeias, incluindo a Portuguesa, e na população Australiana (Kallel, *et al.*; 2010; Bullock *et al.*, 2012; Tomaz *et al.* 2012). 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). Contudo, um estudo mais recente sugeriu que o

gene *FOXE1* com o alelo 16-Ala tem menor capacidade de transactivação dos genes *TG* e *TPO* do que o alelo 14-Ala (Bullock *et al.*, 2012). Num outro estudo, não se observaram diferenças na activação transcripcional, entre os alelos 11-Ala, 12-Ala e 14-Ala (Hishinuma *et al.*, 2001). Até à data não existem portanto resultados consensuais quanto aos efeitos dos alelos 14- e 16-Ala do *FOXE1*.

Outras variantes do gene *FOXE1*, comuns na população, foram também analisadas. Um estudo de associação, em indivíduos da Islândia com ascendência Europeia, revelou uma forte associação entre o alelo A do rs965513 (G/A) e o risco de WDTC (OR = 1.77;  $P = 6.8 \times 10^{-20}$ ), uma vez que, indivíduos homozigóticos apresentavam 3.1 vezes maior risco de desenvolver a doença do que os homozigóticos para o alelo G (Gudmundsson *et al.*, 2009). A associação ao risco de cancro da tiróide foi também observada para o alelo A do polimorfismo rs1867277 (G/A) nas populações Espanhola e Italiana (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 Chernobyl, em indivíduos da Bielorrússia (Takahashi *et al.*, 2010). Outros estudos em populações Europeias (incluindo a Portuguesa) e na população Australiana confirmaram a associação entre o rs1867277 e o risco de PTC (Kallel, *et al.*; 2010; Bullock *et al.*, 2012; Tomaz *et al.* 2012).

Estudos funcionais mostraram que o alelo A do polimorfismo rs1867277 (comparativamente com o alelo G), localizado no promotor do gene, aumenta a transcrição do gene *FOXE1* (Landa *et al.*, 2009). Dado que o factor de transcrição *FOXE1* tem um papel no controlo da migração das células precursoras da tiróide folicular, é possível que um aumento na expressão do gene *FOXE1* nos carcinomas da tiróide possa estar relacionado com uma maior mobilidade das células tumorais, a qual poderá ser incrementada na presença do alelo A do polimorfismo rs1867277 (Landa *et al.*, 2009).

Estudos anteriores mostraram que a família de factores de transcrição FOX (incluindo o *FOXE1*) participa na regulação da expressão da proteína *WNT5A* por diferentes vias de sinalização (NF-kappaB, Hedgehog, TGF $\beta$  e Notch) (Kato e Kato, 2009). O gene *WNT5A*, que codifica esta proteína, é um importante regulador da proliferação, diferenciação e mobilidade celular. Contudo, o seu papel na tumorigénese ainda é pouco claro, uma vez que alguns estudos apontam para que seja um oncogene enquanto que outros sugerem que tenha uma função de supressor tumoral (Leris *et al.*, 2005), o que poderá explicar os níveis de expressão variável deste gene em neoplasias humanas. O modelo proposto indica que o gene *WNT5A* pode activar ou reprimir os processos celulares consoante o tipo de receptores membranares envolvidos (Iozzo *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2003).

### 6.1.3 Factor de transcrição HHEX

O gene *HHEX* é 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).

Este factor de transcrição pode actuar como activador ou como repressor dependendo do tipo de célula e dos promotores-alvo (Tanaka *et al.*, 1999; Puppini *et al.*, 2003; Soufi *et al.*, 2008). O *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*, anulando os efeitos activadores destas proteínas. (Pellizzari *et al.*, 2000)

Até à data, ainda não foram identificadas mutações no gene *HHEX* em humanos (Al Taji *et al.*, 2007). 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).

#### 6.1.4 Interação dos factores de transcrição

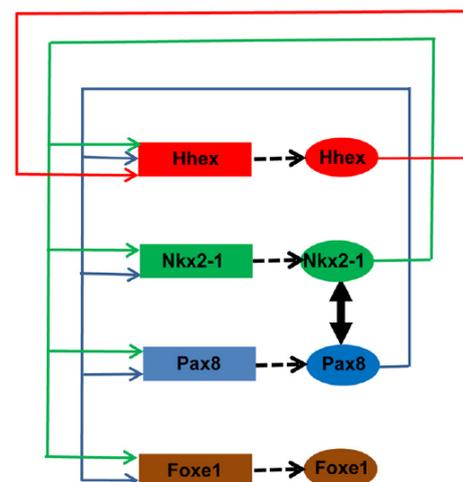
A expressão dos factores de transcrição *NKX2-1*, *FOXE1*, *HHEX* e *PAX8* é mantida nas células foliculares da tiróide adulta. Este facto deve-se a mecanismos de retrocontrolo entre estes genes, que estabelecem redes de auto-regulação entre as proteínas e os promotores dos genes (Figura 8) (Puppini *et al.*, 2004; De Felice e Di Lauro, 2011).

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; Puppini *et al.*, 2003).

A proteína *PAX8* aumenta a actividade transcripcional dos promotores dos genes *HHEX* e *NKX2-1* (Puppini *et al.*, 2004). Este factor de transcrição regula também 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). Para além de interagir com o promotor do gene *NKX2-1*, a proteína *PAX8* pode ainda formar um complexo com a proteína *NKX2-1*, que interage com a *TG* (De Felice e Di Lauro, 2011). O factor de transcrição *PAX8* tem ainda a capacidade de se auto-regular.

Por outro lado, 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* activa também a expressão do gene *HHEX* e *FOXE1* (Puppini *et al.*, 2003; De Felice e Di Lauro, 2011). O gene *NKX2-1* é



**Figura 1.8** - Diagrama esquemático da interacção entre os factores de transcrição *HHEX*, *NKX2-1*, *PAX8* e *FOXE1*. Os promotores dos genes estão representados como rectângulos e as proteínas como formas ovais (adaptado de De Felice e Di Lauro, 2011).

ainda capaz de activar o seu próprio promotor, possuindo vários locais de ligação para a sua própria proteína (Oguchi e Kimura, 1998).

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). Existem, portanto, interações recíprocas entre estes três factores de transcrição (De Felice e Di Lauro, 2011).

Os factores de transcrição funcionam como reguladores importantes da expressão de genes específicos, controlando a função, homeostasia e diferenciação dos tecidos onde são expressos. Assim, quando a expressão ou a estrutura destes factores de transcrição é alterada, pode interferir com o normal funcionamento e metabolismo celular, conduzindo, por exemplo, ao desenvolvimento tumoral.

## 7. Novas tecnologias na detecção de genes de susceptibilidade

### 7.1 Sequenciação global do exoma

A hipótese fundamental para compreender e explicar as doenças genéticas é que existe um padrão de variantes que está presente em doentes e que não é detectado em indivíduos não-afectados (Haimovich, 2011).

Na compreensão actual da biologia molecular do cancro, as mutações podem ser agrupadas em duas categorias: *drivers* e *passengers*. As mutações designadas por *drivers* conferem às células vantagem na sobrevivência, enquanto que as *passengers* apenas são adquiridas num dado momento da evolução clonal, não resultando numa vantagem efectiva na sobrevivência celular (Stratton *et al.*, 2009).

A sequenciação global do exoma (*whole-exome sequencing* - WES) insere-se nas novas tecnologias de sequenciação da próxima geração (*next-generation sequencing* - NGS) ou sequenciação massiva de DNA. A NGS ultrapassa largamente a sequenciação pelo método de Sanger na celeridade e na quantidade de sequências que se obtêm (Ng *et al.*, 2010; Ku *et al.*, 2012). Neste sentido, e complementando os métodos baseados em *arrays*, as tecnologias de *whole-exome* ou *-genome sequencing* representam actualmente uma ferramenta fundamental para a compreensão de doenças complexas, como é o caso do cancro, uma vez que permitem a detecção tanto das mutações *drivers* como *passengers*.

A tecnologia de WES analisa especificamente as regiões dos genes que codificam proteínas, microRNAs e outros RNAs não codificantes e que, embora correspondam a cerca de 1-2% do genoma total, contêm mais de 95% das variantes patogénicas. Deste modo, a utilização do WES leva a uma diminuição do custo e ao aumento da rapidez da sequenciação, quando comparado com a sequenciação de todo o genoma (Welch e Link, 2011). Esta técnica direcciona a pesquisa para mutações em exões e regiões de *splicing*.

Com a utilização do WES, deixa de ser necessário definir genes candidatos *a priori*, uma vez que esta tecnologia permite a comparação de todo o exoma de um indivíduo, com sequências de

referência em bases de dados, permitindo identificar variantes que possam estar associadas à doença em estudo (Mardis e Wilson, 2009; Haimovich, 2011).

## 8. Identificação de genes de susceptibilidade para o FNMTc

Para que possa ser implementado o diagnóstico precoce nas famílias afectadas com FNMTc, é necessário, antes de mais, identificar o(s) gene(s) que conferem essa susceptibilidade. Desta forma, tendo como base o conhecimento adquirido em estudos anteriores de mapeamento genético, ou de genes candidatos, é possível definir estratégias que permitem uma mais rápida e eficaz identificação destes genes.

Em estudos anteriores do grupo de Endocrinologia Molecular do IPO-Lisboa, foi identificada uma nova região cromossómica de susceptibilidade para FNMTc 8p23-p22 (tal como descrito na secção 5.2 deste capítulo) através de análise de *linkage* que abrangeu todo o genoma, em 19 indivíduos da família 1 (Figura 3 - Anexos) (Cavaco *et al.*, 2008b). Apesar de terem sido seleccionados 17 genes para estudo, localizados nesta região, não foram detectadas quaisquer mutações nas regiões codificantes ou junções de *splicing*, pelo que o gene de susceptibilidade permanece por identificar (Batista, 2006).

Numa outra abordagem, este grupo estudou o envolvimento dos factores de transcrição da tiróide em FNMTc, procedendo-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 FNMTc. Nesta série, foi identificada numa família uma variante no gene *FOXE1* (c.743C>G, p.A248G), que não estava descrita na literatura ou em bases de dados de variantes genéticas, (família 25 – Figura 1 dos Anexos). Esta variante segregava com as neoplasias da tiróide nessa família e afectava um resíduo de aminoácido conservado na evolução, sugerindo que seria patogénica. Estudos preliminares *in vitro* sugeriram que a variante p.A248G do gene *FOXE1* promovia a migração celular, em clones de células PCCL3. Esta variante foi também identificada no probando de uma outra família (família 25A - Figura 2 dos Anexos) (Silva, 2011), sugerindo um efeito fundador.

Para dar continuidade aos estudos anteriores do grupo de Endocrinologia Molecular, na presente tese desenvolveram-se novos estudos funcionais para caracterizar a variante identificada no gene *FOXE1*, uma vez que os estudos *in vitro*, com linhas celulares, são muito importantes para o conhecimento mais abrangente da tumorigénese (Staveren *et al.*, 2012).

Por outro lado, e como já referido neste capítulo, a nova tecnologia de WES representa uma importante e poderosa estratégia para acelerar a identificação de genes de susceptibilidade envolvidos neste tipo de carcinomas familiares, tal como já descrito para outras doenças hereditárias. Desta forma, apesar de ainda não estar descrita a utilização do WES na pesquisa de variantes patogénicas em FNMTc, na presente tese procedeu-se à análise global do exoma na família 1, cujo gene de susceptibilidade tinha sido anteriormente mapeado na região 8p23-p22.

## 9. Objectivos

Pretendeu-se neste trabalho identificar e clarificar o papel de alterações moleculares possivelmente envolvidas na susceptibilidade para o FNMTC, recorrendo ao estudo de genes candidatos, utilizando-se várias abordagens. Deste modo, deu-se continuidade ao estudo de variantes em factores de transcrição específicos da tiróide e iniciou-se o estudo de potenciais genes de susceptibilidade com o apoio de tecnologias de sequenciação da próxima geração (whole-exome sequencing - WES). Os objectivos específicos foram:

- Clarificar o papel de uma variante, encontrada no gene *FOXE1* (c.743C>G, p.A248G) no desenvolvimento de tumores familiares da tiróide, através de estudos funcionais *in vitro*.

- Identificar variantes genéticas, com potencial envolvimento na predisposição para neoplasias familiares da tiróide, através da sequenciação de todo o exoma do probando de uma família com FNMTC.

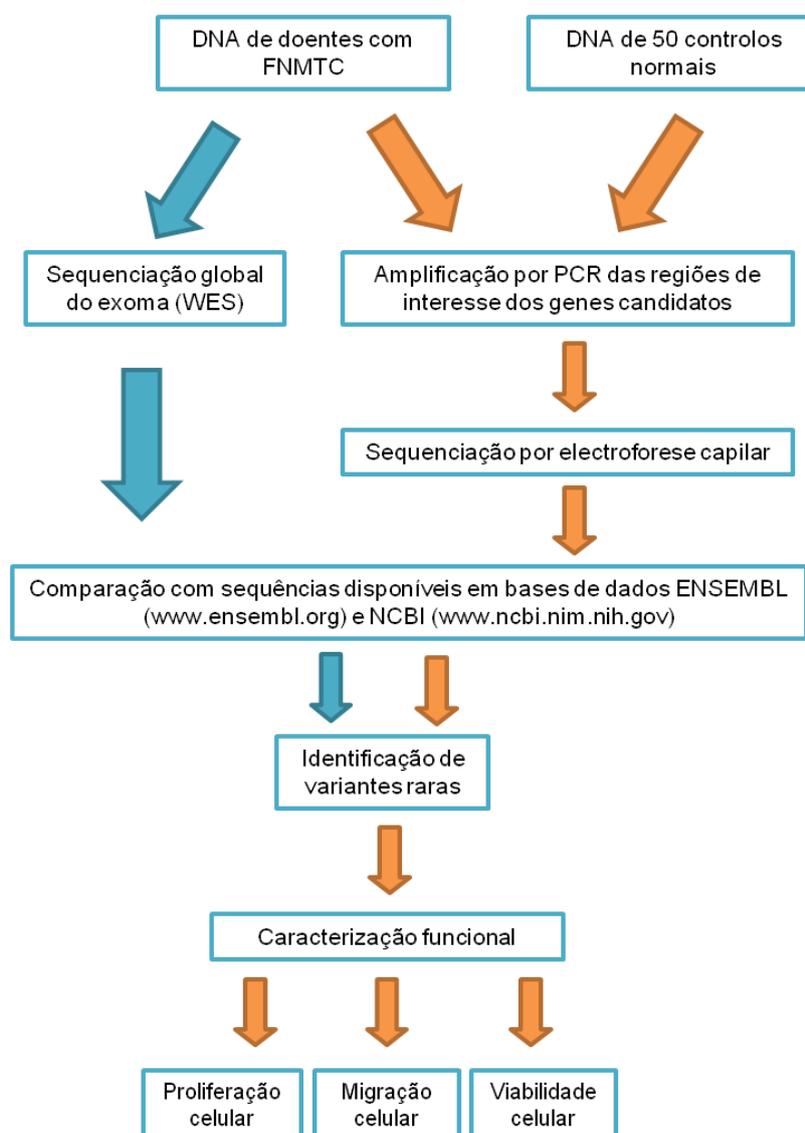
## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Amostras biológicas

As famílias estudadas neste trabalho foram identificadas pelos Serviços de Endocrinologia do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil de Lisboa (IPO-Lisboa) e do Porto (IPO-Porto). A recolha de amostras biológicas foi realizada após consentimento informado dos doentes e familiares. Este estudo foi aprovado pelas Comissões de Ética das duas instituições.

As amostras biológicas analisadas consistiram em sangue periférico e tecidos (frescos ou conservados em parafina). Os tecidos conservados em parafina foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Anatomia Patológica do IPO-Lisboa.

O trabalho laboratorial desenvolvido neste projecto encontra-se resumido no fluxograma que se segue:



## 2. Extracção de DNA

### 2.1 Extracção de DNA a partir de sangue periférico

Para a extracção de DNA a partir de leucócitos de sangue periférico, colheram-se cerca de 3 ml de sangue periférico para um tubo com EDTA. Utilizou-se o *GENTRA PUREGENE DNA BLOOD KIT* (QIAGEN, Alemanha) e seguiram-se as instruções recomendadas pelo fabricante, com algumas modificações. Os passos gerais deste processo estão resumidos no esquema da Figura II.1.

Transferiu-se o sangue para um tubo de 15 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 min à temperatura ambiente, agitando-se ocasionalmente. Centrifugou-se a 2800 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*, raio do rotor = 95 mm) durante 10 min, à temperatura ambiente, obtendo-se um *pellet* de leucócitos. Desprezou-se o sobrenadante e agitou-se no vortex para ressuspender as células. Adicionou-se 3 ml da solução de lise celular, que promove a lise dos leucócitos. Homogeneizou-se e incubou-se a 37°C, durante 30 min, até a solução ficar homogénea.

Para precipitar as proteínas, adicionou-se ao lisado celular 1 ml de solução de precipitação de proteínas. Agitou-se vigorosamente no *vortex*, para promover a agregação das proteínas. Centrifugou-se a 2800 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*) durante 10 min, à temperatura ambiente.

Após a precipitação das proteínas (*pellet* escuro), retirou-se o sobrenadante (DNA) para um novo tubo de 50 ml e adicionou-se 3 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 min para rehidratar o DNA. Guardou-se a solução a 4°C *overnight* e quantificou-se a concentração de DNA no dia seguinte (ver secção II.4.). Para um armazenamento mais longo, guardou-se a solução de DNA a -20°C.

### 2.2 Extracção de DNA a partir de tecido conservado em azoto líquido

Para a extracção de DNA a partir de tecido conservado em azoto líquido utilizou-se o *GENTRA PUREGENE DNA PURIFICATION KIT* (QIAGEN, Alemanha) e seguiram-se as instruções recomendadas pelo fabricante, com algumas modificações.

Colocou-se num almofariz 50 - 100 mg da peça tumoral e com o auxílio de um bisturi e de um pilão fragmentou-se o tecido, adicionando-se a pouco e pouco 3 ml de solução de lise celular. Homogeneizou-se bem com o auxílio de uma pipeta e transferiu-se a solução para um tubo de 50 ml. Em seguida, incubou-se a suspensão tumoral a 37°C durante 30 min.



**Figura II.1** – Esquema representativo do procedimento experimental de extracção de DNA (adaptado de: <http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/gentrapuregenebloodkit.aspx#Tabs=1>)

Após deixar arrefecer a solução, procedeu-se à precipitação de proteínas. Para tal, adicionou-se 1 ml de solução de precipitação de proteínas, agitou-se vigorosamente no vortex até a solução ficar homogénea e centrifugou-se a 2800 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 10 min.

Em seguida, retirou-se o sobrenadante, por inversão, para um tubo de 50 ml contendo 3 ml de isopropanol puro. Para que ocorresse a precipitação do DNA, agitou-se, lentamente, a amostra por inversão até aparecer uma “nuvem” de DNA. Com o auxílio de uma ansa estéril retirou-se o DNA, lavou-se em aproximadamente 1 ml de etanol a 70% (v/v) e transferiu-se o DNA para um tubo de 2 ml contendo entre 150 a 300 µl (consoante a quantidade de DNA) de solução de hidratação de DNA. A amostra foi incubada a 65°C durante 30 min, de forma a permitir a rehidratação do DNA.

Em casos, nos quais a formação da nuvem de DNA não foi visível, a amostra foi centrifugada a 2600 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5417R*, raio do rotor = 95 mm), durante 15 min, a 4°C. Em seguida, o *pellet* foi lavado em 1 ml de etanol a 70% (v/v) e voltou-se a centrifugar a amostra a 2600 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5417R*), durante 10 min, a 4°C. O *pellet* foi ressuscitado em 300 µl de solução de hidratação de DNA e foi incubado a 65°C durante 30 min.

O DNA foi guardado a 4°C *overnight* e só depois foi quantificado por espectrofotometria (ver secção II.4.). Para um armazenamento mais longo guardou-se a solução de DNA a -20°C.

### 2.3 Extracção de DNA a partir de blocos de parafina

Os tecidos recolhidos no Departamento de Cirurgia são por rotina fixados numa solução de 4% (v/v) de formaldeído e incluídos em parafina. Contudo, o formaldeído, utilizado na conservação dos tecidos, pode degradar o DNA.

Após a selecção nas respectivas lâminas das áreas de interesse, realizaram-se, em cada amostra incluída em parafina cerca de 3 cortes com a espessura de 10 µm e transferiram-se para um tubo de 1,5 ml.

Antes de se iniciar o processo de extracção é necessário remover a parafina dos tecidos. Para o efeito incubaram-se os cortes com 500 µl de xilol, durante 15 min (agitando-se ocasionalmente), à temperatura ambiente. Centrifugou-se esta suspensão a 14000 rpm durante 5 min (*Eppendorf centrifuge 5417C*). Removeu-se o sobrenadante e repetiu-se este passo de remoção da parafina do tecido. Depois, realizaram-se duas lavagens do *pellet* com etanol absoluto para remover o xilol. Para tal, incubaram-se durante 15 min as amostras com 500 µl de etanol absoluto, agitando-se ocasionalmente. Centrifugou-se esta suspensão durante 5 min a 14000 rpm (*Eppendorf centrifuge 5417C*). Para finalizar este processo de desparafinação, as amostras foram secas num *speed vacuum* (*UNIVAPO 100H UINQUIP/ aspirator refrigerated UNIGET II*) durante 10 min, de forma a evaporar todo o etanol presente na amostra.

Cada amostra foi ressuscitada em 500 µl de tampão Tris-EDTA (TE) (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Em seguida, adicionou-se 2 µl de proteinase K (5 mg/ml) (*Promega*, EUA) e incubou-se durante 20 min à temperatura ambiente, de forma a permitir a permeabilização dos tecidos.

A proteinase K foi removida em três lavagens com tampão TE. Em cada lavagem centrifugou-se a amostra durante 3 min a 14000 rpm. Posteriormente, adicionou-se a cada amostra 100 µl de mix de recuperação (10 mM de tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2% (p/v) de W-1 e 200 mM de cada dNTP) e incubou-se a 55°C durante 1 h de forma a solubilizar parcialmente o tecido.

De seguida, adicionou-se 2 µl de Taq polimerase (5 U/µl) e incubou-se durante 20 min a 72°C, para reparação do DNA, e ferveu-se a amostra a 100°C durante 7 min, de forma a solubilizar e desintegrar os componentes do tecido.

Posteriormente, adicionou-se 2,5 µl de proteinase K (20 mg/ml) e incubou-se durante 3h a 60°C, agitando-se ocasionalmente. Em seguida, adicionou-se 100 µl de resina quelante Chelex (*instagene matrix*, BIO-RAD, EUA) e incubou-se 15 min com agitação. Ferveu-se, novamente, a amostra a 100°C durante 10 min, de forma a inactivar a proteínase K. De seguida, centrifugou-se a amostra e removeu-se o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 ml.

Para quantificação e controlo da qualidade do DNA genómico extraído recorreu-se a uma electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) – ver secção II.7.

### 3. Extracção de RNA

A extracção e purificação de RNA total foi realizada de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante do *Rneasy Mini Kit* (QIAGEN, Alemanha), com algumas alterações.

#### 3.1 Extracção de RNA a partir de tecidos congelados em azoto líquido

Colocou-se num almofariz com azoto líquido 50 - 100 mg da peça tumoral e com o auxílio de um bisturi e de um pilão fragmentou-se o tecido. Adicionou-se 700 µl de tampão de lise RLT com β-mercapto-etanol 10% (v/v). Com uma seringa com agulha 20 G homogeneizou-se o lisado e transferiu-se para um tubo de 1,5 ml.

Após homogeneização, centrifugou-se o lisado celular a 14000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*) durante 5 min. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de 2 ml e adicionou-se igual volume de etanol a 70% (v/v; em H<sub>2</sub>O estéril tratada com DEPC). 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 ligação do RNA e a remoção do DNA. Após 2 min, 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. Depois da 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, com a finalidade de 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 min 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 H<sub>2</sub>O *RNase-free* directamente para a membrana de sílica-gel. Após 5 min, centrifugou-se a 11000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*) durante 1 minuto, para eluir o RNA. O RNA foi imediatamente armazenado a -80°C.

### 3.2 Extração de RNA de células da linha celular de carcinoma papilar da tiróide (TPC-1)

Colheram-se as células TPC-1 de placas de 35mm com uma confluência de 100% para um tubo de 15ml e centrifugou-se a 1200 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*) durante 5 min, 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 -Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>*; *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). Com uma seringa com uma agulha 20 G, homogeneizou-se o lisado e transferiu-se para um tubo de 1,5 ml.

O restante procedimento foi feito de acordo com o referido em cima para a extração de RNA a partir de tecidos congelados em azoto líquido (secção II.3.1.)

## 4. 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 que esta razão deve encontrar-se entre 1,8 e 2,0, 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 e Russel, 2001). Assim, pode-se determinar a concentração de DNA ou RNA de cada amostra segundo a seguinte relação:

$$[\text{DNA}] \text{ (ng/ml)} = A_{260} \times 50$$

$$[\text{RNA}] \text{ (ng/ml)} = A_{260} \times 40$$

## 5. Síntese de cDNA por transcrição reversa do RNA

O RNA total purificado foi utilizado para a síntese de cadeia simples do DNA complementar (cDNA). O cDNA é obtido pelo uso de *primers* aleatórios (*random primers*) que hibridam com os diferentes mRNAs da célula, permitindo a extensão por uma polimerase de DNA, que usa como cadeia molde o RNA (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 ou 2 µg de RNA, ao qual se adicionaram 1 µl de *random primers* (*Invitrogen™, Life Technologies*, EUA) e H<sub>2</sub>O até perfazer um

volume de 9,5 µl. Para a desnaturação de ligações intramoleculares do RNA, a reacção foi incubada durante 10 min, a 70°C. Após esta incubação, o tubo da reacção foi colocado em gelo e adicionou-se tampão *1<sup>st</sup> strand* pH 8,3 1x concentrado (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl e 15 mM MgCl<sub>2</sub>; *Invitrogen*<sup>TM</sup>), 0,5 mM de desoxirribonucleótidos (dNTPs) (*Invitrogen*<sup>TM</sup>), 100 mM de ditioneitol (DTT; *Invitrogen*<sup>TM</sup>), 20 U de inibidor de RNase (RNase Out, *Invitrogen*<sup>TM</sup>) e 200 U de Transcriptase Reversa SuperScript II RT (*Invitrogen*<sup>TM</sup>).

Incubou-se a reacção durante 1h 30min a 37°C para síntese do cDNA e posteriormente a 95°C durante 5 min para inactivar as enzimas intervenientes. O cDNA sintetizado foi guardado a -20 °C.

## 6. Amplificação de DNA/cDNA por PCR

Para a amplificação *in vitro* de uma região específica do DNA ou cDNA, 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: 50 a 100 ng de DNA/cDNA, 10 pmol de *primer forward* (cadeia *sense*) e de *primer reverse* (cadeia *anti-sense*) (*Invitrogen*<sup>TM</sup>), solução tamponada de PCR (1x concentrada; *Invitrogen*<sup>TM</sup>), 0,2 mM de dNTPs (*Invitrogen*<sup>TM</sup>), 1 a 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (dependendo das condições óptimas para cada reacção; *Invitrogen*<sup>TM</sup>), 1 U de *Taq DNA polymerase* (*Invitrogen*<sup>TM</sup>) e água bi-distilada estéril para perfazer o volume final.

Para cada reacção foi sempre realizado um controlo negativo, constituído por uma mistura reaccional idêntica, preparada em simultâneo com as outras reacções e sujeita às mesmas condições, mas sem DNA molde, para detecção de possíveis contaminações.

Num termociclador (*Biometra*, Alemanha), as reacções processaram-se com uma desnaturação inicial do DNA, durante 5 min a 95°C, seguindo-se 35 a 37 ciclos de amplificação. Cada ciclo de amplificação englobou a desnaturação do DNA a 95°C durante 45 segundos, a hibridação dos *primers* com o DNA à temperatura de *annealing* (56-61°C) durante 35 segundos a 1 minuto (dependendo das condições óptimas para cada reacção) e a 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, seguiu-se uma extensão final a 72°C, durante 10 min.

### 6.1 Optimização das condições de PCR

Antes de proceder à amplificação do DNA das amostras, foi necessário optimizar as condições de PCR para cada par de *primers*, testando diferentes graus de estringência para a reacção, conjugando diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub> e temperaturas de *annealing*.

A concentração de MgCl<sub>2</sub> é um dos parâmetros mais relevantes no que respeita à eficiência e especificidade de uma reacção de PCR, uma vez que os iões Mg<sup>2+</sup> funcionam como co-factor da enzima *Taq DNA polymerase*, utilizada nas reacções de PCR. Contudo, o excesso deste sal pode originar o aparecimento de inespecificidades, sendo, portanto, necessário um compromisso entre o aumento do rendimento e a criação de produtos inespecíficos da reacção (Newton e Graham, 1995).

A optimização da temperatura de *annealing* tem como objectivo maximizar a hibridação dos *primers* com as regiões específicas do DNA alvo, prevenindo as ligações inespecíficas e portanto a síntese de produtos indesejados. Temperaturas elevadas aumentam a especificidade (aumentam a estrigência), enquanto que temperaturas mais baixas facilitam a hibridação mas diminuem a especificidade.

Em algumas reacções de PCR foi necessário adicionar 6% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) como adjuvante para aumentar o rendimento.

Para a amplificação de regiões com elevada percentagem de GC, utilizou-se o *Kit GC-RICH PCR System* (Roche, Germany). A amplificação foi optimizada conforme as recomendações do fabricante.

Para a amplificação de produtos com um tamanho maior do que o usual (> 1000bp), foi usado o *Kit LongRange PCR* (QIAGEN). A amplificação foi optimizada conforme as recomendações do fabricante.

Para cada par de *primers*, optimizaram-se as condições de PCR, testando diferentes graus de estrigência para a reacção, conjugando diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub> e temperaturas de *annealing* (Tabelas I, II, III, IV, V, VI e VII dos Anexos).

## 6.2 Nested PCR

O *nested* PCR é utilizado para aumentar a sensibilidade e especificidade da amplificação. Esta técnica consiste na realização de duas reacções sequenciais de PCR: a primeira realiza-se como descrito na secção III.6; e a segunda realiza-se recorrendo a *primers nested* que hibridam com sequências internas do produto amplificado pelos *primers* utilizados na primeira reacção. Deste modo, utiliza-se 1 a 2 µl do produto do primeiro PCR, como molde, na segunda reacção de amplificação. Neste segundo PCR é feito um controlo negativo tal como descrito em II.6 e é ainda utilizado o controlo negativo da primeira reacção, como molde, para despistar quaisquer contaminações.

## 7. 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 neste trabalho foi de 2% (p/v), para separar fragmentos entre 100-600 pares de bases (bp). Para fragmentos maiores, utilizou-se uma concentração de agarose de 0,8 a 1% (p/v). Para a preparação do gel, dissolveu-se a agarose necessária em solução tamponada TBE 1x 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 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, de acordo com o número de pares de bases do produto esperado: pUC 8 (<1000 bp) ou  $\lambda$ HINDIII (>1000 bp) (Fermentas, EUA). As separações electroforéticas decorreram sob uma diferença de potencial constante de cerca de 120 a 130 V, durante 30 a 50 min.

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).

## 8. 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 trifosfatados (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.

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 fluoróchromos.

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.

### 8.1 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  $\mu$ l de *capture buffer* e, de seguida, a solução de produto de PCR. Para purificação de bandas de gel de agarose, adicionaram-se 600  $\mu$ l de *capture buffer* ao *ependorf* com a banda e incubou-se a 50°C durante 10 min 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  $\mu$ l 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 tudo de 1,5 ml e aplicaram-se entre 30-50  $\mu$ l de tampão de eluição (*elution buffer type 6*), dependendo da

intensidade da banda no gel. Após incubação durante 2 min, 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.

Para alguns produtos de PCR em solução, e em alternativa a este *kit*, utilizou-se a acção conjunta de duas enzimas: *FastAP* (*Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Fermentas*) e *Exo I* (*Exonuclease I, Thermo Scientific*). A enzima *Exo I* degrada DNA em cadeia simples, enquanto que a *FastAP* catalisa a libertação dos grupos fosfato do DNA em cadeia simples. Deste modo, para a purificação, as enzimas foram incubadas com o produto de PCR durante 15 min a 37°C e depois inactivadas a 80°C durante 15 min.

## 8.2 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*, EUA). Para cada amostra preparou-se, em gelo, a seguinte reacção para um volume final de 20 µl: uma solução tamponada *BigDye Sequencing Buffer* (1x), 3.2 pmol de *primer forward* ou *primer reverse*, 1.2 µl de Big Dye, 10 ng de produto PCR purificado (ou mais, dependendo do rendimento da reacção) e H<sub>2</sub>O destilada até perfazer o volume final.

Transferiram-se as reacções para um termociclador (*Biometra*). As reacções de sequenciação foram realizadas em 25 ciclos, precedidos por uma desnaturação inicial de 3 min 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 min. Os produtos da reacção de sequenciação foram guardados a 4°C.

## 8.3 Precipitação dos produtos de sequenciação

É necessário purificar os produtos das reacções de sequenciação, uma vez que os ddNTPs marcados que não são incorporados podem interferir na interpretação da sequenciação. Esta purificação 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 min, à temperatura ambiente. No final desta incubação, centrifugou-se a 14000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417R*), durante 40 min, a 4°C.

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 min, a 4°C. De seguida, removeu-se por completo o sobrenadante e secou-se o *pellet* num banho seco a 37°C, durante 5 min. Guardou-se o *pellet* de DNA a 4°C.

### 8.4 Análise dos produtos de sequenciação por electroforese capilar

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

As amostras foram submetidas a electroforese capilar durante 30 min, num sequenciador automático *ABI Prism™ 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*.

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.

## 9. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

O PCR em tempo real permite a quantificação da expressão de um gene. Existem dois métodos de detecção: *TaqMan* e *SYBR Green (Applied Biosystems, EUA)*.

A detecção através de *TaqMan* tem como base a actividade exonucleotídica 3'-5' da *Taq* polimerase, que promove a ruptura da ligação da sonda com a cadeia simples de cDNA. A sonda é marcada com dois fluoróforos diferentes: um na extremidade 5', o *reporter* e outro na extremidade 3', designado *quencher*. Enquanto a sonda está hibridada com o cDNA e portanto intacta, o *quencher* absorve a fluorescência emitida pelo *reporter*.

Na fase de extensão, a *Taq* polimerase cliva a sonda e o fluoróforo *reporter* é separado da molécula *quencher*, ocorrendo assim um aumento do sinal de fluorescência, uma vez que a *quencher* deixa de absorver a fluorescência. À medida que decorrem os ciclos de PCR existe um incremento na intensidade de fluorescência, por libertação da sonda, que é proporcional ao produto sintetizado (Figura II.2).

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, sendo o ciclo onde se atinge o limiar da fase exponencial. O *Ct* é inversamente proporcional à quantidade de gene alvo da amostra. Assim, é possível comparar a expressão de um gene entre amostras através da comparação de *Cts*.

No método de curva-padrão, uma amostra padrão 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

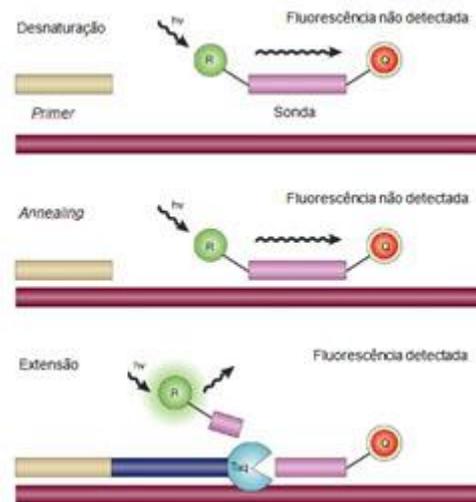


Figura II.2 – Representação esquemática do sistema Taqman (adaptado de Koch, 2004)

desconhecida presente numa amostra é assim determinada com base na curva preparada a partir de uma série de diluições da amostra padrão.

Para corrigir variações, na quantidade de RNA em cada amostra, e nas eficiências das reacções de síntese de cDNA 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 afectado 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, 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).

Esta técnica foi utilizada para quantificar a expressão do gene *wingless-type MMTV integration site family, member 5A (WNT5A)* humano nas 3 *pools* de células TPC-1 (ver secção III.12.5). A referência endógena utilizada foi o gene  $\beta$ -actina humano (*ACTB*). Para construir as curvas de calibração tanto do gene *WNT5A* como do gene *ACTB* foram utilizadas 4 concentrações diferentes da amostra padrão (100, 25, 6.25, 0.78 ng) e 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*).

As reacções de *Taqman* foram executadas seguindo o protocolo do fabricante do *Taqman Gene expression (Applied Biosystems)*. Para cada amostra preparou-se, em gelo, a seguinte reacção para um volume final de 20  $\mu$ l: 1  $\mu$ l de *TaqMan Gene expression* (que contém as sondas e os *primers* específicos para cada gene em estudo; *Applied Biosystems*), 10  $\mu$ l *Taqman Gene expression Mastermix (Applied Biosystems)*, 6.25 ng de cDNA das amostras em estudo (diluição 1:16) e H<sub>2</sub>O até perfazer um volume total de 20  $\mu$ l. Após uma desnaturação de 95°C durante 10 min, realizaram-se 45 ciclos de amplificação. Cada ciclo englobou a desnaturação do cDNA a 95°C durante 15 segundos e a extensão de novas cadeias a 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)*.

## 10. Hidrólise enzimática de produtos de PCR

As enzimas de restrição têm como característica principal a capacidade de reconhecer e hidrolisar regiões específicas do DNA, designadas de locais de restrição. Desta forma, alterações na sequência de DNA alvo (e.g. produto de PCR), que abranjam ou que gerem novos sítios de restrição, podem alterar o reconhecimento pela enzima, originando diferentes produtos de hidrólise (fragmentos de DNA), que podem ser visualizados após electroforese em gel de agarose.

Para investigar se as variantes genéticas detectadas por WES se tratavam de polimorfismos existentes na população, procedeu-se à hidrólise enzimática dos respectivos produtos de PCR, obtidos a partir da amplificação do DNA de 50 indivíduos normais Portugueses, não aparentados, que serviram de controlo.

A escolha da enzima foi feita recorrendo ao *software* JustBio (<http://www.justbio.com/>). A enzima utilizada foi *Ddel* (*Biolabs, England*), que funciona a condições ideais com o tampão 1X NEBuffer 3 (50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM Ditioneitol, com pH 7.9 a 25°C – *Biolabs*). As amostras foram incubadas na solução tamponada com a enzima, a 37°C, *overnight*.

Os produtos resultantes da hidrólise enzimática foram analisados por electroforese em gel de agarose 2% (p/v) (ver secção II.7).

## 11. Vectores recombinantes

### 11.1 Preparação do plasmídeo pcDNA3-FOX E1-16Ala e -16Ala-A248G

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 utilizou-se como vector o plasmídeo pcDNA3 que possui um gene que lhe confere resistência à geneticina. Prepararam-se os plasmídeos pcDNA3 com a sequência completa do cDNA humano do gene *FOX E1* com 16 resíduos de alaninas. A variante p.A248G foi introduzida por mutagénese dirigida no plasmídeo pcDNA3-FOX E1-16Ala. Os plasmídeos foram utilizados para transfectar as células PCCL3 e TPC-1.

A construção do plasmídeo e a mutagénese dirigida foi realizada pela Dra. Rute Tomaz do Grupo Endocrinologia Molecular

## 12. Cultura de células

Para este estudo, foram utilizadas células PCCL3, células de tiróide normal de *Rattus norvegicus* (gentilmente cedidas pelo Professor Dumont do Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, Bélgica) e células TPC-1, células de carcinoma papilar da tiróide humana (gentilmente cedidas pela Doutora Paula Soares do IPATIMUP, Porto). 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 CO<sub>2</sub>*) a 37°C com ambiente de 5% CO<sub>2</sub>.

As células PCCL3 foram propagadas em meio de cultura F12-Coon's modified (F12-C; *EUROCLONE*, Itália), suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino (FBS; *GIBCO™*, EUA), 1 mUI/ml TSH (hormona tirotrófica; *Sigma-Aldrich*, EUA), 1 mg/L insulina (*Sigma-Aldrich*), 5 mg/L apotransferrina (*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. As células TPC-1 foram propagadas em meio de cultura RPMI (*GIBCO™*), suplementado com 10% (v/v) de FBS (*GIBCO™*), antibiótico-antimicótico 1x (*GIBCO™*) e L-glutamina 1x (*GIBCO™*). Nos próximos capítulos, quando se referir meio RPMI 10% FBS, significa que este tinha a composição acima descrita. Quando se referir RPMI 2% FBS ou 1% FBS significa que foi suplementado com o acima descrito, mas com as concentrações 2 e 3% de FBS, respectivamente.

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).

### 12.1 Propagação e expansão de células

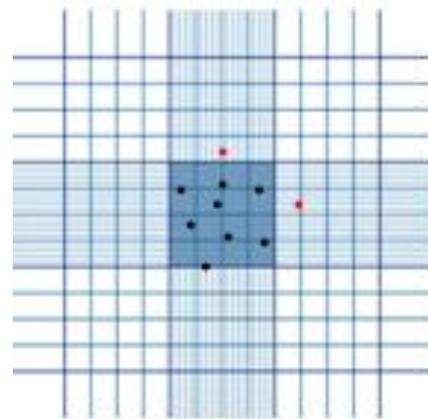
Sempre que necessário, e para evitar a elevada confluência celular, as células foram transferidas para novos frascos. Para evitar a saturação e a insuficiência de nutrientes do meio, este foi renovado a cada 3 dias.

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 (-Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>), para remover resíduos de FBS, uma vez que o FBS possui na sua composição inibidores de proteases e cátions 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 min. 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, uma vez que as PCCL3 e TPC-1 são células aderentes). Quando as células perderam a aderência, neutralizou-se a tripsina com meio puro e centrifugou-se de seguida a 1200 rpm (Labofuge 400, Heraeus Centrifuge) durante 5 min, à temperatura ambiente. As células foram então ressuspensas em quantidades específicas de meio de cultura suplementado e distribuídas por novos frascos de cultura. Colocaram-se as células numa estufa de CO<sub>2</sub>, deixando o frasco mal rolhado, de forma a permitir as trocas gasosas.

### 12.2 Contagem de células

Para determinar o número de células em suspensão, realizou-se uma diluição de 1:2 num tubo de 1.5 ml: 200 µl da suspensão celular, 160 µl de PBS (-Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>) e 40 µl de azul de tripano (1:3) (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) (Figura II.3). As contagens foram sempre feitas em duplicado ou triplicado. A concentração celular (número de células por ml) foi determinada através da fórmula:

$$\text{Número médio de células} \times 10^4 \times 2 \text{ (factor de diluição)}$$



**Figura II.3** – Representação de um hemocítmetro. A preto encontram-se representadas as células que se contam e a vermelho as células que não se contam (adaptado de:

[http://sfiles.crg.es/protocols/cellculture/img/neubauer.jpg/image\\_view\\_fullscreen](http://sfiles.crg.es/protocols/cellculture/img/neubauer.jpg/image_view_fullscreen)).

### 12.3 Criopreservação de células

Transferiu-se o volume de suspensão celular (aproximadamente  $5 \times 10^6$  células) para um tubo de 50 ml e centrifugou-se a 1200 rpm (Labofuge 400) durante 5 min. De seguida, ressuspendeu-se o *pellet* celular em 2 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  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora e armazenou-se em azoto líquido ( $-180^{\circ}\text{C}$ ).

### 12.4 Transfecção de células TPC-1 com construções derivadas do plasmídeo pCDNA3

Para a transfecção das células TPC-1, plaquearam-se  $3,5 \times 10^5$  células em placas de 35mm. 24h após o plaqueamento, diluiu-se o DNA plasmídico (2  $\mu\text{g}$ ) (ver secção II.11) em 200  $\mu\text{l}$  de OPTI-MEM (GIBCO™), homogeneizando gentilmente. Diluiu-se 5  $\mu\text{l}$  de lipofectamina (*Lipofectamine™ 2000*, *Invitrogen™*) em 200  $\mu\text{l}$  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. Após os 20 minutos de incubação, adicionaram-se 400  $\mu\text{l}$  dos complexos a cada placa e agitou-se gentilmente. Incubaram-se as células na estufa de  $\text{CO}_2$ , durante 6h para ocorrer a transfecção. Após esse período de tempo, substituiu-se o meio por novo meio suplementado.

### 12.5 Estabelecimento de *pools* de células TPC-1 com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3

Para preparação das *pools* de células com expressão estável dos 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 duas semanas, sendo que na primeira semana foi utilizada geneticina na concentração final de 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e na segunda semana na concentração final de 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Ao longo do trabalho foi usada a concentração final de 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de geneticina para a propagação das *pools*.

Foram utilizados neste trabalho 3 tipos de *pools*, que foram designadas de pCDNA3 (células TPC-1 com plasmídeo pcDNA3 *empty*), 16 WT (células TPC-1 com plasmídeo pcDNA3-FOXE1-16Ala) e 16 MUT (células TPC-1 com plasmídeo pcDNA3-FOXE1-16Ala-A248G).

### 12.6 Estabelecimento de clones de células PCCL3 com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3

Os clones de células PCCL3 com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3 foram, também, estabelecidos através da selecção por resistência à geneticina. O estabelecimento e isolamento destes clones foram efectuados pela Dra. Rute Tomaz, do grupo de Endocrinologia Molecular do IPO-Lisboa. A expressão do gene *FOXE1* nos diferentes clones foi avaliada por RT-PCR, sendo que, como esperado os clones que integraram o plasmídeo pcDNA3 vazio não apresentaram expressão do gene *FOXE1* (humano).

### 13. Ensaio de migração celular

A migração celular foi avaliada através do ensaio de *wound healing*. Marcaram-se previamente as placas de 35 mm (*Nunclon*), com um traço horizontal (Figura II.4). Plaquearam-se  $3,5 \times 10^5$  células em placas de 35 mm em meio suplementado (F12 5% FBS ou RPMI 10% FBS). Os ensaios foram realizados em triplicado. Após 48h, substituiu-se o meio suplementado pelo meio com menor concentração de FBS (1 ou 2% de FBS). Passado 24h, realizou-se um *scratch*, isto é, uma ferida com uma ponta de micropipeta de 200  $\mu$ l estéril, e renovou-se o meio. Assinalaram-se duas regiões a fotografar, uma em cima e outra em baixo da intersecção do *scratch* com o traço previamente realizado na placa. Fotografaram-se as zonas assinaladas, em *time-points* definidos: 0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 27h, 30h e 54h. As áreas da “ferida” foram medidas para cada região, em cada *time-point*, utilizando o *software* ImageJ.

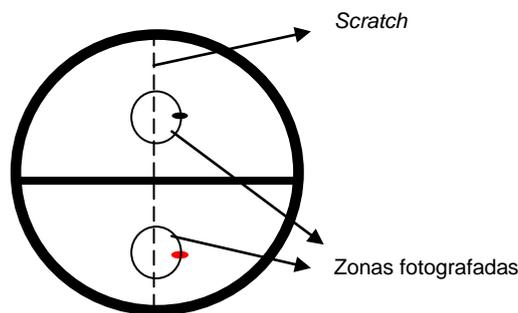


Figura II.4 – Representação esquemática da placa usada para o ensaio de *wound-healing*

### 14. Ensaio de proliferação celular

#### 14.1 Contagem directa em hemocitómetro

O ensaio de proliferação celular foi realizado por contagem celular directa em hemocitómetro. Para esta contagem plaquearam-se  $2 \times 10^4$  células dos clones pcDNA3 #2, 16 WT #3 e 16 MUT #4 de células PCCL3, em placas de 60 mm, em meio F12-C suplementado (5% FBS), com 500  $\mu$ g/mL de geneticina. Foram também plaqueadas  $5 \times 10^4$  células das *pools* de TPC-1 (PCDNA3, 16WT e 16MUT) em placas de 60 mm (*Nunclon*), em meio RPMI suplementado com 2% FBS. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Os clones de PCCL3 foram colhidos e contados nos seguintes *time-points*: 48 horas (2 dias), 96 horas (4 dias) e 144 horas (6 dias). A proliferação celular das *pools* de células TPC-1 foi analisada por contagem de células, às 48 h (2 dias), 72 h (3 dias) e 96 h (4 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 com PBS ( $-Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ). Após remover o PBS ( $-Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ), adicionaram-se 200  $\mu$ l de tripsina e incubou-se 5 min a 37°C. Neutralizou-se a tripsina com 185  $\mu$ l de meio suplementado e transferiram-se as células para um tubo de 1,5 ml. Lavou-se a placa com mais 100  $\mu$ l de meio suplementado e transferiu-se este volume para o mesmo tubo. Adicionou-se ao tubo 15  $\mu$ l de azul de tripano (*stock*) e homogeneizou-se a suspensão celular. Transferiram-se 10  $\mu$ l desta suspensão celular para um hemocitómetro (0.100 mm, *Neubauer*

*Improved*) e contaram-se as células (Secção II.12.2, Figura II.3). A concentração celular (nº de células por ml) foi determinada pela fórmula:

$$\text{Número médio de células} \times 10^4$$

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

## 14.2 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo (FACS - *Fluorescence-activated cell sorting*) pode ser utilizada para analisar a proliferação celular, através da determinação das fases do ciclo celular numa população de células.

Na análise do ciclo celular, as células são permeabilizadas e tratadas com iodeto de propídio (corante fluorescente) que é um agente intercalante, que se incorpora no DNA. A intensidade de fluorescência das células coradas, em comprimentos de onda específicos, correlacionam-se com a sua quantidade de DNA. Dado que a quantidade de DNA de uma célula duplica durante a fase S do ciclo celular, a quantidade relativa de células na fase G0 e G1 (antes da fase S), na fase S e nas fases G2 e M (depois da fase S) pode ser determinada, uma vez que a fluorescência das células nas fases G2/M será o dobro da das células na fase G0/G1.

Para este ensaio foram plaqueadas  $1,5 \times 10^5$  células TPC-1, em frascos de 800 ml, para evitar a inibição da proliferação por contacto. Recolheram-se as células 4 dias (96h) após o plaqueamento, e lavaram-se com 20 ml de PBS (-Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>). Após a lavagem, incubaram-se as células com 4 ml de tripsina a 37°C, durante 5 min, adicionando de seguida 20 ml de meio puro à suspensão celular. Centrifugaram-se as células a 1200 rpm (Labofuge 400) durante 5 min e descartou-se o meio. As células foram ressuspendidas em 1 ml de PBS (-Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>).

O restante processo para a aquisição no citómetro de fluxo, foi gentilmente realizado pelo Doutor António Pinto, do Departamento de Anatomia Patológica do IPO-Lisboa.

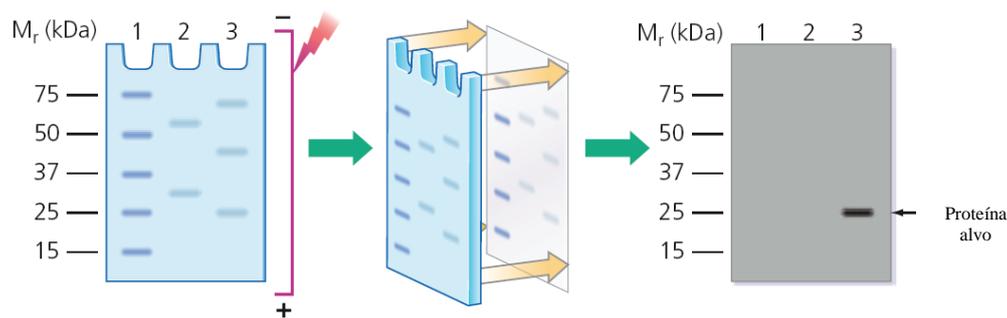
## 15. Ensaio de viabilidade celular

O ensaio com Violeta de Cristal pode ser utilizado para determinar a densidade relativa de células em adesão em placas de cultura. Foram plaqueadas  $1,8 \times 10^5$  células, em placas de 24 poços (*Nunc*), em meio RPMI 2% FBS. Os ensaios foram realizados utilizando duas placas: uma que foi irradiada e outra não irradiada (controlo). O meio foi mudado para RPMI 1% FBS, 48h após o plaqueamento. Três dias (72h) após o plaqueamento, quando a confluência celular era aproximadamente 100%, uma das placas foi irradiada (radiação UV), durante 4 min, na câmara de fluxo laminar. Após 24h, removeu-se o meio das placas irradiadas e das não irradiadas e lavaram-se as células duas vezes com PBS (-Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>). Adicionou-se 250 µl de Violeta de Cristal [0,5% (p/v), diluído em etanol a 20% (v/v)] a cada poço e incubou-se durante 20 min, 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. A absorvência das amostras, em cada poço, foi determinada, por espectrofotometria, pela subtração da absorvência no

comprimento de onda 595 nm pela absorvância a 450 nm (que corresponde ao *background* da placa), num leitor de microplacas (*BIO-RAD microplate reader*). Os ensaios foram realizados em triplicado. Os dados foram analisados com o *software* MPM6 (*BIO-RAD*).

## 16. Western blot

A técnica de *Western blot* permite a detecção, com anticorpos específicos, de proteínas num extracto proteico. Nesta técnica, as proteínas são separadas, de acordo com o seu peso molecular, por electroforese, num gel de poliacrilamida, e transferidas para um suporte sólido, vulgarmente uma membrana de nitrocelulose ou PVDF, onde se dá a conjugação dos anticorpos, permitindo a detecção e comparação da expressão das proteínas de interesse (Figura II.5).



**Figura II.5** – Resumo esquemático dos passos principais da técnica de *Western blot* (adaptado de <http://static.abdserotec.com/Lit-pdfs/Brochures1/westernblotbook.pdf>).

Para uma melhor separação das proteínas, é normal utilizar-se um gel constituído por duas partes distintas. A primeira parte do gel (*stacking gel* – com cerca de 1 cm) apresenta uma menor concentração de poliacrilamida, para que haja uma uniformização das amostras. A segunda parte é constituída pelo gel principal (*resolution gel*) que apresenta uma maior percentagem de poliacrilamida, o que permite a separação das proteínas.

Para corrigir variações na quantidade de amostra, é utilizado um controlo endógeno, ou seja, uma proteína que esteja presente em todas as amostras em estudo, em quantidade aproximadamente constante e que não seja afectada pelo tratamento experimental.

Esta técnica foi usada para avaliar a expressão da proteína FOXE1 (38 KDa) nas 3 *pools* de células TPC-1. O controlo endógeno utilizado foi a proteína  $\beta$ -actina humana (43 KDa).

O *Western blot* está dividido em 4 passos: a) extracção de proteínas; b) separação electroforética das proteínas; c) transferência para uma membrana e bloqueio; d) incubação com os anticorpos e detecção.

### 16.1 Extracção de proteínas

Para a extracção de proteínas, plaquearam-se  $1.6 \times 10^6$  células em frascos de 260 ml com 15 ml de meio RPMI 2% FBS. Após 72h, recolheram-se as células, lavaram-se com PBS ( $-\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ ) e transferiram-se para um tubo de 2 ml. Em seguida, as células foram centrifugadas a 11500 rpm, durante 5 seg (*ependorf Centrifuge 5417C*). Em paralelo preparou-se a solução de lise, que corresponde à junção de RIPA (*Radio Immuno Precipitation Assay*) buffer [5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1% (v/v) Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.5] com o *cocktail* de inibidores de

proteases 1x (*protease inhibitor cocktail tablets*, Roche) e 1 mM ortovanadato. De seguida, adicionaram-se 200 µl da solução de lise ao *pellet* celular e deixou-se, em gelo, durante 15 min, para que se libertassem as proteínas. A solução foi depois centrifugada a 14000 rpm, durante 15 min, a 4°C, para promover a deposição dos ácidos nucleicos.

O extracto proteico, que corresponde ao sobrenadante obtido na última centrifugação, foi transferido para um novo tubo de 1,5ml e guardado a -80°C.

## 16.2 Separação electroforética das proteínas

Para a preparação da solução de proteínas ferveram-se, durante 5 min, 20 µl de extracto proteico, juntamente com *Laemli buffer* (LB) 1x [com 20% (v/v) de β-mercapto-etanol] (*BIO-RAD*).

Aplicou-se em cada poço 25 µl do extracto proteico, que foi separado num gel com um gradiente de 4-10% de poliacrilamida, de 1 mm de espessura, numa solução tamponada de *SDS-page* 1X [*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% (p/v) SDS, pH 8.3]. Em paralelo foi aplicado um marcador de peso molecular (*SDS-PAGE Standards – BIO-RAD*), que permite monitorizar o processo de electroforese e estimar o local onde se espera a banda da proteína de interesse.

As separações electroforéticas decorreram sob uma diferença de potencial constante, de cerca de 0.04A durante aproximadamente 1h, até atingir a separação desejável.

## 16.3 Transferência para a membrana e bloqueio

As amostras foram transferidas e imobilizadas numa membrana de PVDF (*Polyvinylidene fluoride; BIO-RAD*) através do método de transferência electroforética (*BIO-RAD*). Este método consiste na movimentação das proteínas, carregadas negativamente, para o electrodo positivo. A membrana é colocada entre o gel e o eléctrodo positivo de forma a que as proteínas migrem para a membrana. Tanto a membrana como o gel são protegidos através da utilização de uma *sandwich* de papel de filtro. A transferência foi efectuada a 0,22 A, durante aproximadamente 1h, numa solução tamponada, o *Blott buffer*, [solução *SDS-page* com 20% (v/v) de metanol, para promover a ligação das proteínas à membrana].

Para analisar a eficácia da transferência, a membrana foi depois imersa em *Coomassie Brilliant Blue*, que cora de azul as proteínas. Depois de remover o excesso de corante e de 2 lavagens com TBST [TBS (500 mM Tris-HCl, 1,5 M NaCl) com 2% (v/v) triton X100] com agitação, as membranas foram bloqueadas com TBST *milk* [TBST com 4 % (p/v) de leite em pó], *overnight*, a 4°C.

## 16.4 Incubação com os anticorpos e detecção

Após o bloqueio, a membrana foi dividida em duas partes, que continham as mesmas amostras, foram incubadas separadamente com os anticorpos primários anti-FOXO1 humano produzido em coelho (*Sigma-Aldrich*) e anti-ACTB humano produzido em ratinho (*Sigma-Aldrich*), numa diluição em TBST *milk* de 1:100 e 1:1000, respectivamente, durante 4h. Após 3 lavagens com TBST, incubaram-se sob agitação e separadamente, as duas membranas com os anticorpos secundários *anti-rabbit IgG, peroxidase conjugated* e *anti-mouse IgG, peroxidase conjugated* (ambos

da *Thermo Scientific*), em TBST *milk*, numa diluição de 1:3000, durante 2h. Seguidamente, realizaram-se mais 3 lavagens com TBST.

Para a detecção indirecta, através da reacção enzimática com a peroxidase, preparou-se uma solução com partes iguais de solução de peróxido (substrato da peroxidase que está conjugada com os anticorpos secundários) com uma solução de luminol (*SuperSignal West Pico chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific*). Na presença da peroxidase e da solução de peróxido, o luminol (substrato quimioluminescente) sofre oxidação, ocorrendo emissão de luz.

De seguida, as membranas foram incubadas durante, aproximadamente, 1 min com esta solução e após remoção do excesso, protegidas com uma folha de acetato. A aquisição foi feita com o sistema de detecção de imagem *ChemiDoc (BioRad)* que funciona com o software *Image Lab™*.

## 17. Sequenciação global do exoma

O estudo de mapeamento genético realizado anteriormente na família 1, através de análise de *linkage*, usando marcadores de SNPs distribuídos pelo genoma (*arrays* de SNPs), sugeriu que o gene de susceptibilidade para as neoplasias da tiróide se localizava na região 9 000 000 – 17 000 000 bp, no cromossoma 8p23-p22, de acordo com o modelo “tumor- bócio”, que assume como afectados os familiares com lesões benignas e malignas da tiróide. No estudo da região de susceptibilidade nesta família, foi também utilizado um modelo em que apenas os familiares com tumores eram considerados afectados (modelo “adenoma-carcinoma”), definindo-se uma região candidata, maior que a anterior, no intervalo 9 000 000 – 23 900 000 bp, do cromossoma 8p23-p22 (Cavaco *et al.*, 2008).

Para a identificação desse gene de susceptibilidade, recorreu-se à sequenciação de todo o exoma (WES).

Extraiu-se DNA a partir de sangue periférico de um indivíduo afectado com FNMTc da família 1 (Figura 3 dos Anexos), utilizando o protocolo descrito na secção II.2.1. A qualidade do DNA foi conferida através da electroforese em gel de agarose (ver secção II.7), e através da razão entre a absorvência do DNA e das proteínas (> 1,8).

A amostra, cerca de 5 ug de DNA de alta qualidade, foi enviada para uma empresa que fornece como serviço a análise da sequência de todo o exoma, usando as tecnologias *Agilent* (EUA) e *Illumina* (EUA). O processo de análise realizado na empresa incluiu: hidrólise do DNA, preparação de uma biblioteca de DNA, captura dos exões utilizando o *Sureselect Human all exon 50 Mb* (Agilent), sequenciação com *Hiseq2000-2x100pb* (*Illumina*), validação dos resultados e análise bioinformática.

Na análise bioinformática identificaram-se todas as variantes genéticas presentes no exoma do doente, que foram anotadas de acordo com a informação genética disponível na base de dados *Ensembl* ([www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html)). As variantes não sinónimas, em heterozigotia, que não estavam descritas na base de dados dbSNP 132 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) e que estavam localizadas no cromossoma 8 (região 9 000 000 – 23 900 000 bp) foram seleccionadas. O possível envolvimento em cancro, dos genes que continham as variantes seleccionadas, foi investigado por consulta em várias bases de dados, como *UniProtKB* (<http://www.uniprot.org/uniprot/>), *Human Protein Reference Database* ([http://www.hprd.org/index\\_html](http://www.hprd.org/index_html)), *Ensembl*, *NCBI*

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), GeneCards® (<http://www.genecards.org/>), *Cosmic* (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>) e *Human Mutation Database* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

Por fim, as variantes que apresentavam maior probabilidade de envolvimento na tumorigénese nesta família foram confirmadas por sequenciação de Sanger. Quando confirmada a sua presença no DNA do familiar, analisado por WES, as variantes foram pesquisadas nos restantes membros da família, para avaliar a sua segregação com a doença. Foi ainda investigada a sua frequência em 50 controlos normais da população Portuguesa.

## 18. Análise estatística

Os dados obtidos através de vários replicados em 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 os ensaios de proliferação, migração e viabilidade celular utilizou-se o teste paramétrico ANOVA e o *post-test* de Tukey. Para a análise dos resultados de citometria de fluxo, em que os dados apresentavam diferenças significativas para as variâncias, utilizou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e o *post-test* de comparação múltipla de Dunn.

Os dados foram analisados usando o *software* estatístico GraphPad Prism 4.0 (*GraphPad Software*, EUA). Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### III. RESULTADOS

#### 1. Estudo funcional da variante p.A248G do gene *FOXE1*

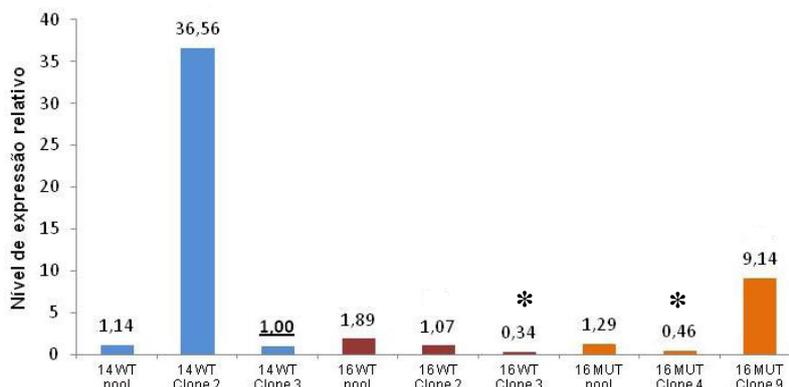
Num projecto anterior, desenvolvido no grupo de Endocrinologia Molecular do IPO-Lisboa, foram pesquisadas variantes genéticas nos genes *NKX2-1*, *FOXE1*, *HHEX* e *PAX8*, através da sequenciação do DNA constitucional dos probandos de 60 famílias com FNMTc. Nesta série, foram identificadas 15 variantes nos genes *FOXE1*, *HHEX* e *PAX8*. Uma destas variantes, no gene *FOXE1* (c.743C>G, p.A248G), que foi detectada em heterozigotia no probando (III.16) da família 25 (Figura 1 - Anexos), que apresentava um cPTC, multifocal, com metástases ganglionares, não estava descrita na literatura ou em bases de dados de variantes genéticas. Esta variante segregava com a doença na família e, de acordo com o *software* SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), o resíduo de alanina do codão 248 foi conservado na evolução, sugerindo que a variante detectada no gene *FOXE1* afecta a função da proteína, sendo potencialmente patogénica. Esta variante foi também identificada no probando (III.5) de outra família (família 25A – Figura 2 - Anexos), que apresentava um 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, no que respeita a doença tiroideia. A análise de segregação de haplotipos no *locus FOXE1*, nas duas famílias, sugeriu que a variante p.A248G poderá ser fundadora.

Para investigar o papel da variante p.A248G no gene *FOXE1* na tumorigénese na tiróide, desenvolveram-se estudos funcionais, usando como modelos células PCCL3 (células de tiróide normal de *Rattus norvegicus*). Estudos preliminares, em que se utilizaram clones de células PCCL3 (PCDNA3, 16WT e 16MUT) sugeriram que a variante p.A248G do gene *FOXE1* promovia a migração celular (Silva, 2011).

No presente projecto, desenvolveram-se novos estudos funcionais para a variante p.A248G, usando como modelos células PCCL3 e células TPC-1.

#### 1.1 Estudos funcionais da variante p.A248G do gene *FOXE1* em células PCCL3

Para avaliar as consequências funcionais da variante p.A248G, transfectaram-se células PCCL3 com os plasmídeos pcDNA3 "vazio", pcDNA3-*FOXE1*-16Ala e pcDNA3-*FOXE1*-16Ala-A248G. Após a transfecção foram estabelecidas *pools* de células PCCL3 com expressão estável dos diferentes plasmídeos. Neste trabalho, foram utilizados clones, isolados a partir das diferentes *pools* de células PCCL3, com expressão idêntica do gene *FOXE1* humano, nomeadamente 16 WT #3 e 16 MUT #4, e como controlo foi utilizado o clone PCDNA3 #2 (Figura III.1; Silva, 2011).

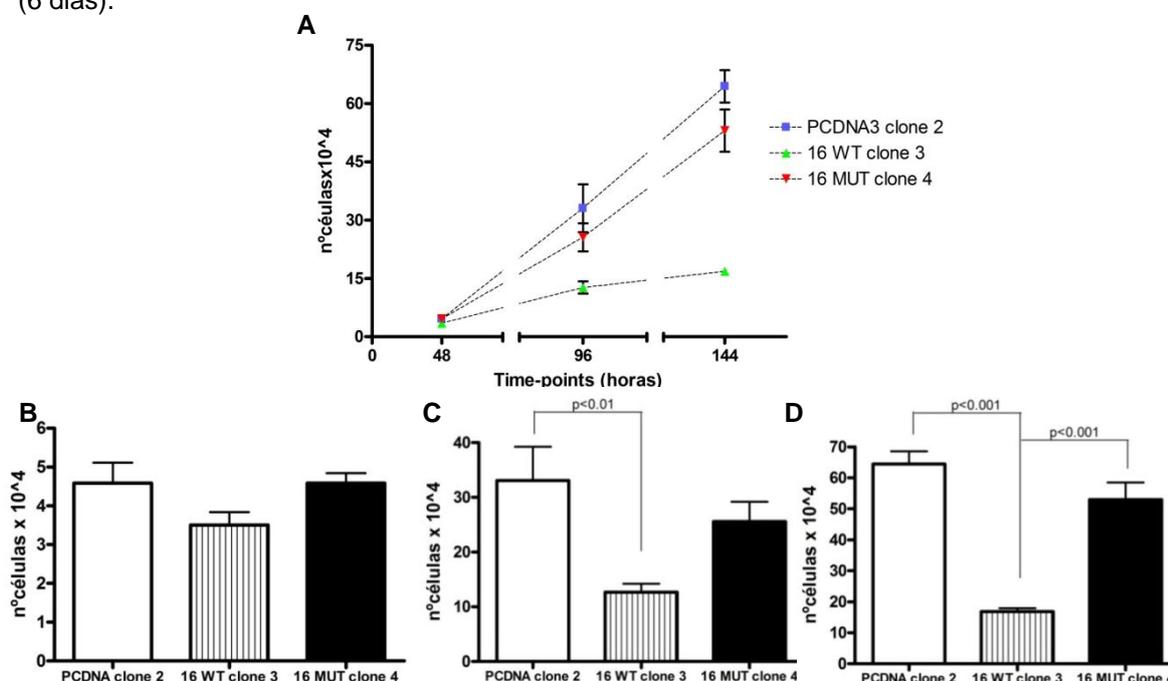


**Figura III.1** - Níveis de expressão relativos do gene *FOXE1* humano em *pools* e clones com expressão estável de diferentes plasmídeos contendo o gene *FOXE1* humano. Os níveis de expressão foram determinados por qRT-PCR e normalizados em relação aos níveis de expressão de um controlo endógeno ( $\beta$ -actina) e à expressão do clone 14WT #3 (calibrador). Valores correspondentes à média dos triplicados. \* Clones utilizados nos estudos funcionais (adaptado de Silva, 2011)

### 1.1.1 Ensaio de proliferação celular com clones de células PCCL3

Uma das principais características das células tumorais é a vantagem proliferativa (Hanahan e Weinberg, 2000). Neste estudo, avaliou-se a capacidade proliferativa das células transfectadas de forma estável com os vários plasmídeos, por contagem directa em hemocitómetro.

Plaquearam-se  $2 \times 10^4$  células dos clones pcDNA3 #2, 16 WT #3 e 16 MUT #4, em placas de 60 mm, em meio F12-C suplementado (5% FBS), com 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de geneticina (Figura III.2). As células foram colhidas e contadas nos seguintes *time-points*: 48 horas (2 dias), 96 horas (4 dias) e 144 horas (6 dias).



**Figura III.2** - Efeito da variante p.A248G no gene *FOXE1* na proliferação celular. (A) Ensaio de proliferação celular para os clones pcDNA3 #2, 16 WT #3 e 16 MUT #4, 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 12 replicados, em 2 ensaios independentes. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico ANOVA e os valores de  $P < 0.05$  foram considerados como estatisticamente significativos.

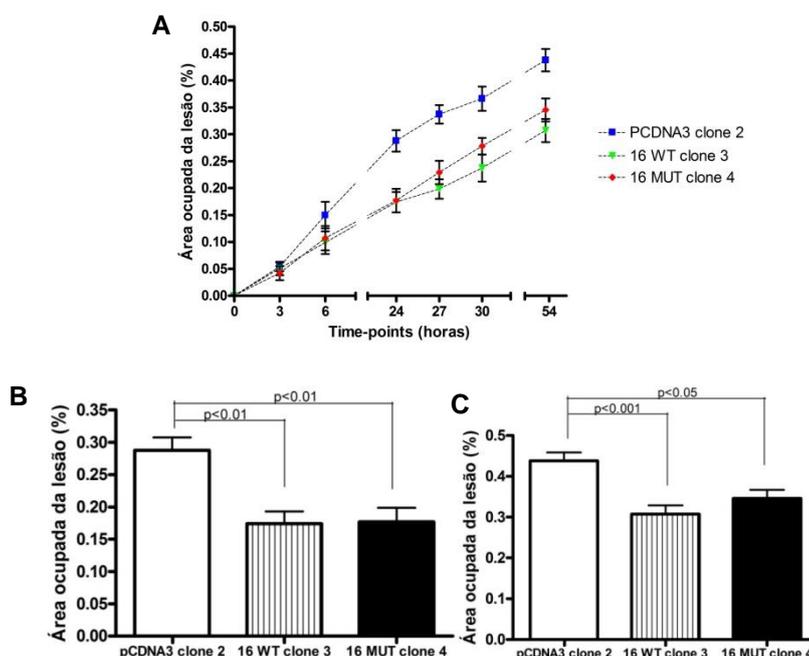
Os clones PCDNA3 #2 e 16 MUT #4 apresentaram uma proliferação celular mais elevada do que o clone 16 WT #3, nos *time-points* de 48, 96 e 144 horas (Figura III.2 B, C e D).

A proliferação do clone 16 WT #3 foi significativamente mais baixa que a dos restantes clones no *time-point* 144 horas (Figura III.2 C e D). O clone 16 MUT apresentou menor proliferação que o controlo.

### 1.1.2 Ensaio de migração celular com clones de células PCCL3

A capacidade de migração permite que as células se desloquem para locais onde o espaço e os nutrientes não são factores limitantes (Hanahan e Weinberg, 2000). Neste trabalho, estudou-se a capacidade de migração através da reparação de uma lesão (*scratch*) realizada na monocamada de células (ensaio de *wound healing*).

Plaquearam-se  $2 \times 10^6$  células dos clones pcDNA3 #2, 16 WT #3 e 16 MUT #4, em meio F12-C suplementado (1% FBS), com 500  $\mu\text{g/mL}$  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 III.3).



**Figura III.3** – 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 #2, 16 WT #3 e 16 MUT #4 foi determinada nos *time-points* 0h, 3h, 6h, 24h, 27h, 30h, 54h. Área ocupada da lesão (%) nos 3 clones nos *time-points* 24h (B) e 54h (C). 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 9 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 clone PCDNA3 #2 apresentou uma maior capacidade de reparação da região lesada e restabelecimento da monocamada de células que os restantes clones (Figura III.3A). A partir das 24h o clone PCDNA3 #2 apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação aos restantes clones [16 WT #3 às 24h,  $P < 0,01$  (B) e às 54h,  $P < 0,001$  (C); 16 MUT #4 às 24h,  $P < 0,01$  (B) e às 54h  $P < 0,05$  (C)].

## 1.2 Estudos funcionais da variante p.A248G do gene *FOXE1* em células TPC-1

Com o intuito de avaliar o efeito funcional da variante p.A248G do gene *FOXE1*, em células de carcinoma papilar de tiróide humana, realizaram-se ensaios *in vitro* com a linha celular TPC-1.

### 1.2.1 Preparação de pools de células TPC-1 com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3

Para avaliar as consequências funcionais da variante p.A248G, as células TPC-1 foram transfectadas com os seguintes plasmídeos: plasmídeo pcDNA3 “vazio” (sem o gene *FOXE1*), plasmídeo pcDNA3-*FOXE1*-16Ala que expressa a proteína *FOXE1 wild type* com 16 resíduos de alaninas. Por mutagénese dirigida (*in vitro*), 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 p.A248G. No texto que se segue, serão utilizadas as seguintes abreviaturas para os plasmídeos: pcDNA3 (plasmídeo pcDNA3 sem o gene *FOXE1*), 16 WT (pcDNA3-*FOXE1*-16Ala) e 16 MUT (pcDNA3-*FOXE1*-16Ala-A248G).

Seleccionaram-se as células com expressão estável dos diferentes plasmídeos com geneticina a 1000 µg/ml, durante 10 dias e obtiveram-se as respectivas *pools* celulares. As *pools* foram mantidas para os estudos funcionais com uma concentração final de geneticina de 500 µg/ml.

Para confirmar a integração dos diferentes plasmídeos, e expressão do gene *FOXE1*, nas *pools* 16 WT e 16 MUT procedeu-se à sequenciação deste gene nos respectivos cDNAs.

A análise de sequenciação revelou que, como esperado, a *pool* PCDNA3 (TPC-1 com vector vazio) apresentava apenas expressão do gene *FOXE1* endógeno. Nestas células, o gene *FOXE1* endógeno apresentava a sequência *wild type* e 14 resíduos de alaninas em homozigotia. A *pool* 16 WT apresentava expressão do gene *FOXE1 wild type* (com 16 resíduos de alaninas) integrado de forma estável e uma expressão residual do gene *FOXE1 wild type* endógeno (com 14 resíduos de alaninas) (Figura III.4). A *pool* 16 MUT apresentava expressão do gene *FOXE1* com a variante em estudo p. A248G (com 16 resíduos de alaninas), integrado de forma estável e uma expressão residual do gene *FOXE1 wild type* endógeno (com 14 resíduos de alaninas) (Figura III.5).

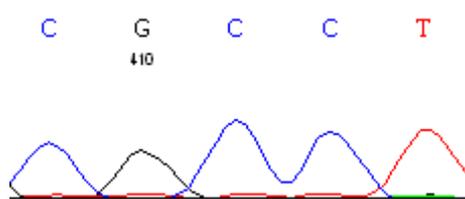


Figura III.4 - Sequenciação do gene *FOXE1* na *pool* de células 16 WT.

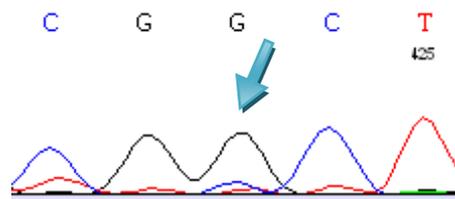


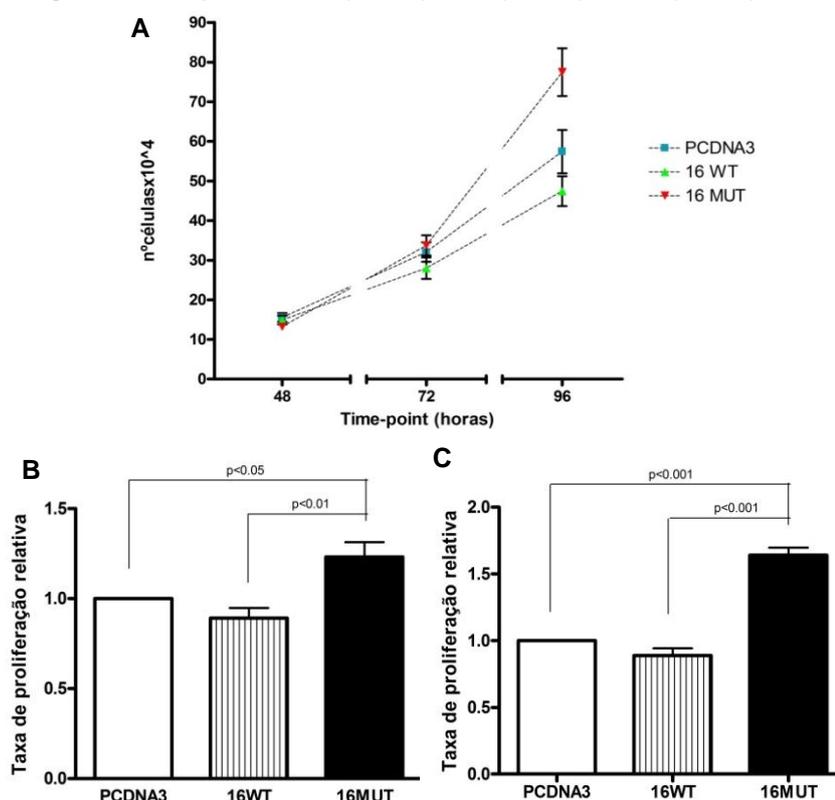
Figura III.5 - Sequenciação do gene *FOXE1* na *pool* de células 16 MUT com a variante c.743C>G, que deverá conduzir à substituição do resíduo de alanina por um resíduo de glicina no codão 248 (p.A248G). A variante encontra-se assinalada pela seta.

## 1.2.2 Ensaios de proliferação celular com *pools* de células TPC-1

Neste estudo, avaliou-se a capacidade proliferativa das *pools* de células TPC-1 transfectadas de forma estável com os diferentes plasmídeos, por contagem directa de células em hemocítmetro e por citometria de fluxo.

### 1.2.2.1 Estudo da proliferação celular por contagem directa de células em hemocítmetro

Para a contagem directa de células, plaquearam-se  $5 \times 10^4$  células das *pools* pcDNA3, 16 WT e 16 MUT, em placas de 60mm, em meio RPMI 2% FBS (Figura III.6). As células foram colhidas e contadas nos seguintes *time-points*: 48h (2 dias), 72h (3 dias) e 96h (4 dias).



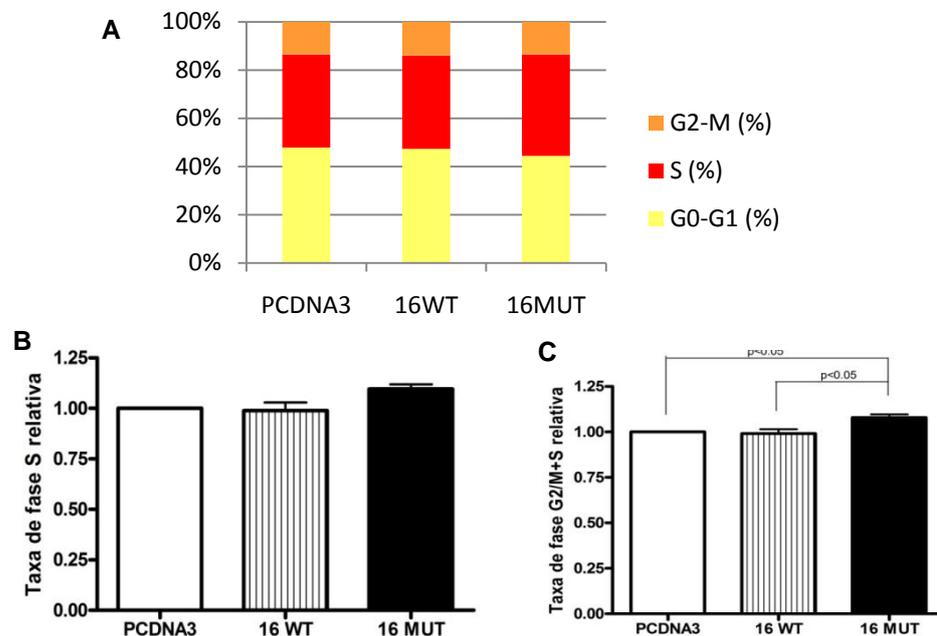
**Figura III.6** - Efeito da variante p.A248G no gene *FOXE1* na proliferação celular. (A) Ensaio de proliferação celular para as *pools* de células TPC-1: pcDNA3, 16 WT e 16 MUT, por contagem directa em hemocítmetro nos *time-points* 48 horas, 72 horas e 96 horas e taxas de proliferação relativas das *pools* de células às 72h (B) e às 96h (C). As barras de erro indicam o desvio padrão. Valores correspondentes à média de 30 replicados, em 5 ensaios independentes. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico ANOVA e os valores de  $P < 0.05$  foram considerados como estatisticamente significativos

A *pool* 16 MUT apresentou uma proliferação celular mais elevada do que as restantes *pools*. A proliferação celular desta *pool*, apesar de já ser mais elevada às 72h foi mais evidente às 96h (Figura III.6A). Esta *pool* apresentou uma diferença na proliferação celular estatisticamente significativa em relação ao controlo (PCDNA3) às 72h ( $P < 0,05$ ) e às 96h ( $P < 0,001$ ) (Figura III.6B e C). A *pool* 16 MUT apresentou, também, uma diferença na proliferação celular, estatisticamente significativa, em relação à *pool* 16 WT às 72h ( $P < 0,01$ ) e às 96h ( $P < 0,001$ ) (Figura III.6B e C).

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

### 1.2.2.2 Estudo da proliferação celular por citometria de fluxo

Para avaliar a proliferação celular através da análise do ciclo celular, plaquearam-se  $1,5 \times 10^5$  células de *pools* TPC-1, em frascos de 800 ml. As células foram recolhidas 96h após o plaqueamento, e analisadas por citometria de fluxo (Figura III.7).



**Figura III.7** - Efeito da variante p.A248G no gene *FOXE1* no ciclo celular. A análise do ciclo celular nas *pools* de células TPC-1 pcDNA3, 16 WT e 16 MUT foi realizada por citometria de fluxo. (A) Percentagem de células de cada pool nas diferentes fases do ciclo celular. Taxa relativa das *pools* 16 WT e 16 MUT na fase S (B) e na fase G2/M+S (C) quando comparadas com a *pool* PCDNA3. Os dados foram analisados pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e os valores de  $P < 0.05$  foram considerados como estatisticamente significativos.

A *pool* 16 MUT apresentou uma maior percentagem de células em fase S, apesar de esta diferença não ser estatisticamente significativa (Figura III.7B).

A *pool* 16 MUT apresentou também um índice proliferativo (percentagem de células nas fases G2/M + S) mais elevado que o das *pools* PCDNA3 e 16 WT, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$  para as duas comparações) (Figura III.7C).

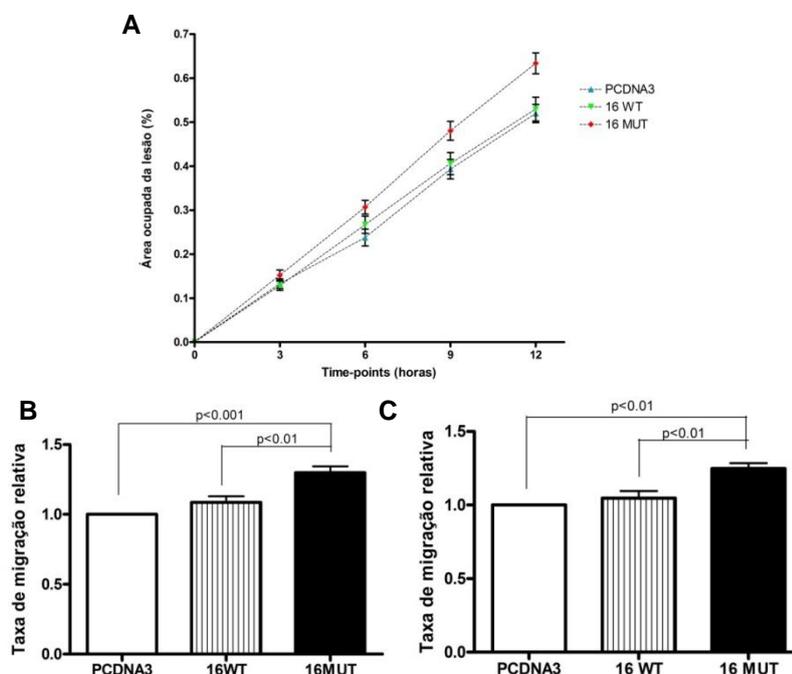
Estes resultados sugerem que a variante p.A248G no gene *FOXE1* poderá promover a proliferação celular.

### 1.2.3 Ensaios de migração celular com células TPC-1

Para avaliar a migração celular das células TPC-1 foi realizado o ensaio de *wound-healing* com transfecções transitórias e estáveis (*pools*) destas células.

### 1.2.3.1 Estudo da migração celular em células TPC-1 utilizando transfecções transitórias

Plaquearam-se  $3,5 \times 10^5$  células TPC-1 em placas de 35mm em meio RPMI 10% FBS. Após 24h transfectaram-se os diferentes plasmídeos. O *scratch* foi realizado 48h após a transfecção em meio RPMI 2% e as placas foram fotografadas às 3h, 6h, 9h e 12h (Figura III.8).



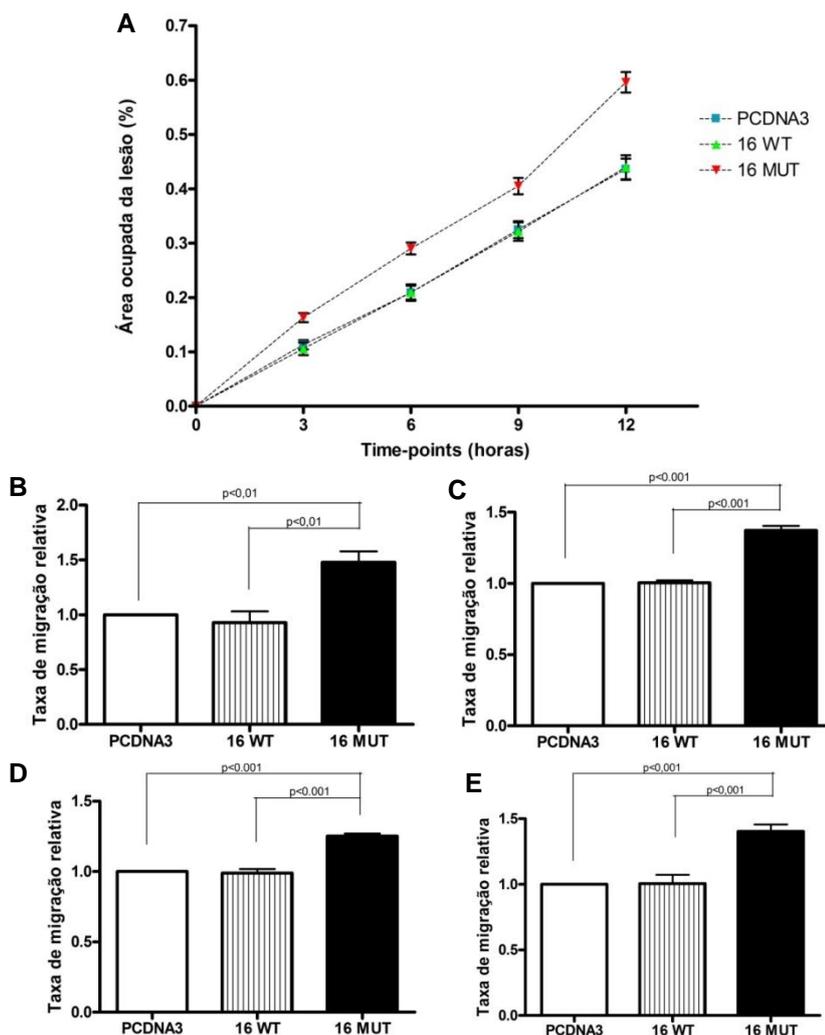
**Figura III.8** - Efeito da variante p.A248G no gene *FOXE1* na migração celular. (A) Quantificação da migração celular através de ensaio de *wound healing*. A área ocupada da lesão (%) nas células TPC-1 com transfecções transitórias dos plasmídeos pcDNA3, 16 WT e 16 MUT foi determinada nos *time-points* 0h, 3h, 6h, 9h e 12h. Taxa de migração relativa nas 3 *pools* nos *time-points* 9h (B) e 12h (C). 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 17 replicados, em 5 ensaios independentes. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico ANOVA e os valores de  $P < 0.05$  foram considerados como estatisticamente significativos.

As células TPC-1 transfectadas com o plasmídeo pcDNA3-*FOXE1*-16Ala-A248G apresentaram uma taxa de migração mais elevada que as restantes células, em todos os *time-points*. Às 9h (Figura III.8B) e às 12h (Figura III.8C) as células 16 MUT apresentaram uma reparação da área lesada da monocamada de células significativamente mais elevada que as restantes células (PCDNA3 às 9h,  $P < 0,001$  e às 12h,  $P < 0,01$ ; 16 WT às 9h e 12h,  $P < 0,01$ ).

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

### 1.2.3.2 Estudo da migração celular em células TPC-1 utilizando transfecções estáveis (*pools*)

Plaquearam-se  $3,5 \times 10^5$  células das *pools* pcDNA3, 16 WT e 16 MUT, em placas de 35 mm, em meio RPMI 2% FBS. A lesão na monocamada celular foi realizada 24h após o plaqueamento. Fotografaram-se duas regiões lesadas nos *time-points* 0h, 3h, 6h, 9h, 12h (Figura III.9).



**Figura III.9** - 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 (%) nas *pools* de células TPC-1: pcDNA3, 16 WT e 16 MUT foi determinada nos *time-points* 0h, 3h, 6h, 9h e 12h. Taxa de migração relativa nas 3 *pools* nos *time-points* 3h (B), 6h (C), 9h (D) e 12h (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 15 replicados, em 5 ensaios independentes. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico ANOVA e os valores de  $P < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos.

A *pool* 16 MUT apresentou uma capacidade de reparação da área lesada da monocamada de células significativamente mais elevada que as restantes *pools* em todos os *time-points* (PCDNA3 às 3h,  $P < 0,01$  e nos restantes *time-points*,  $P < 0,001$ ; 16 WT às 3h,  $P < 0,01$  e nos restantes *time-points*,  $P < 0,001$ ) (Figura III.9B, C, D e E). As *pools* PCDNA3 e 16 WT apresentaram uma capacidade de migração celular similar (Figura III.9A).

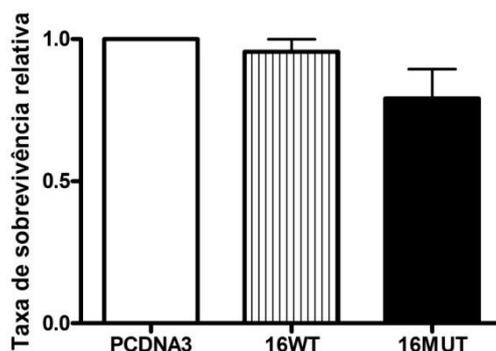
Estes resultados sugerem que a variante p.A248G no gene *FOXE1* poderá promover a migração celular.

### 1.2.4 Ensaio de viabilidade celular com *pools* de células TPC-1

Para além da vantagem proliferativa e migratória, outra alteração que pode conduzir à transformação neoplásica é a resistência à morte celular programada (Hanahan e Weinberg, 2000). A radiação UV pode provocar alterações na sequência de DNA e conduzir a célula à apoptose

(Carvalho *et al.*, 2003). O ensaio com Violeta de Cristal permite obter informação quantitativa sobre a densidade relativa de células em adesão (viáveis) após irradiação.

Para este ensaio, foram utilizadas duas placas de 24 poços onde se plaquearam em paralelo  $1,8 \times 10^5$  células de cada uma das *pools* PCDNA3, 16 WT e 16 MUT, em meio RPMI 2% FBS. Após 48h o meio foi mudado para RPMI 1% FBS. Uma das placas foi irradiada com UV, 72h após o plaqueamento, durante 4 min. As células foram recolhidas 24h após irradiação para determinação da viabilidade celular (Figura III.10).



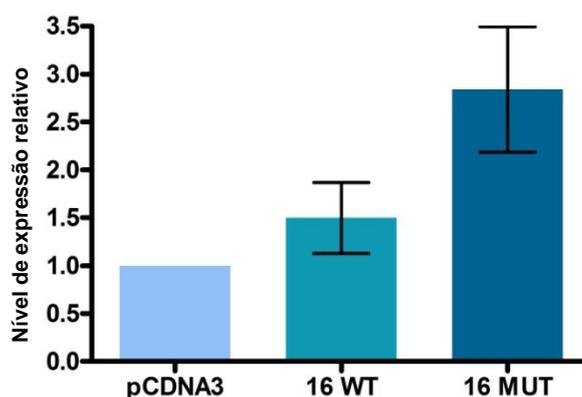
**Figura III.10** - Efeito da variante p.A248G no gene *FOXE1* na viabilidade celular. A viabilidade celular nas *pools* de células pcDNA3, 16 WT e 16 MUT foi determinada por ensaio de Violeta de Cristal. A taxa de sobrevivência celular relativa foi calculada através da razão entre a absorvência das células viáveis (em adesão), 24h após irradiação, durante 4 min, com UV, e a absorvência das células controlo (não irradiadas). Apresenta-se a taxa de sobrevivência relativa ao controlo PCDNA3. As barras de erro indicam o desvio padrão. Valores correspondentes à média de 15 replicados, em 5 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, após uma irradiação de 4 min, a *pool* 16 WT e PCDNA3 (controlo) apresentaram viabilidades muito próximas e superiores à da *pool* 16 MUT. No entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas (Figura III.10).

### 1.2.5 Estudo do nível de expressão do gene *WNT5A* nas *pools* de células TPC-1 com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo PCDNA3

Para este estudo extraiu-se RNA das *pools* de células TPC-1 (PCDNA3, 16 WT e 16 MUT), cultivadas em placas de 35 mm, com uma confluência de 100% (provenientes do ensaio de migração). Utilizou-se cDNA sintetizado a partir de 1 ou 2  $\mu$ g de RNA.

A expressão do gene *WNT5A* nas *pools* utilizadas nos ensaios funcionais foi analisada através de qRT-PCR. Os níveis de expressão relativos do gene *WNT5A* humano nas diferentes amostras foram normalizados em relação aos níveis de expressão do gene *ACTB* (gene *housekeeping*).



**Figura III.11** - Níveis de expressão relativos do gene *WNT5A* humano nas *pools* de células TPC-1 PCDNA3, 16 WT e 16 MUT. Os níveis de expressão foram determinados por qRT-PCR e normalizados em relação aos níveis de expressão de um controlo endógeno ( $\beta$ -actina). Apresentam-se os níveis de expressão em relação à pool PCDNA3 (controlo). Valores correspondentes à média dos triplicados.

A *pool* 16 MUT apresentou uma expressão do gene *WNT5A* superior à das *pools* PCDNA3 (controlo) e 16 WT (Figura III.11). Apesar de se observar esta tendência, os níveis de expressão do *WNT5A* apresentaram desvios padrão elevados, pelo que será necessário a quantificação de mais amostras provenientes de novos ensaios.

### 1.2.6 Análise de alterações somáticas em genes da via *MAPK* nos tumores das famílias 25 e 25A

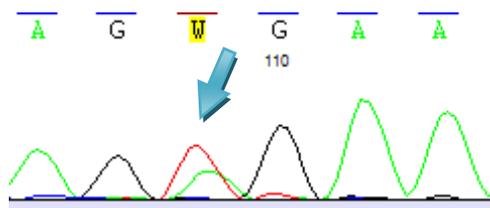
As amostras de DNA dos tumores dos indivíduos III.7 (fvPTC), III.15 (tcPTC), III.16 (cPTC) da família 25, e do indivíduo III.5 (cPTC) da família 25A foram sequenciadas para genes que estão frequentemente alterados a nível somático nos carcinomas da tiróide esporádicos de origem folicular, como é o caso dos genes *BRAF* e *RAS*.

Os genes *BRAF*, e as 3 isoformas do *RAS* (*KRAS*, *NRAS* e *HRAS*) foram apenas sequenciadas para as regiões *hotspot* de mutações, segundo as condições apresentadas na Tabelas II a V dos Anexos.

**Tabela III.I** – Análise de alterações somáticas nos genes *BRAF* e *RAS* em tumores das famílias 25 e 25A.

Família	Doente	<i>BRAF</i>	<i>RAS</i>
25	III.7	negativo	negativo
	III.15	p.V600E	negativo
	III.16	p.V600E	negativo
25A	III.5	n.e.	n.e.

Dois dos quatro indivíduos estudados (indivíduos III.15 e III.16 da família 25) apresentaram a mutação mais frequente no *BRAF* (p.V600E) (Figura III.12). No indivíduo III.7 da família 25 não foi detectada qualquer variante.

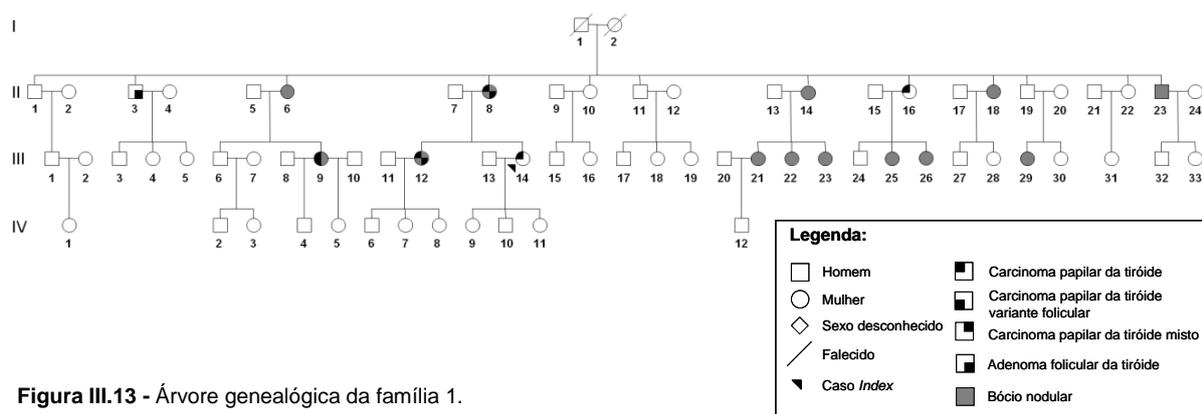


**Figura III.12** - Sequenciação do gene *BRAF* no indivíduo III.15 da família 25, portador de uma variante c.1799T>A, que deverá conduzir à substituição do resíduo de valina por um resíduo de ácido glutâmico no codão 600 (p.V600E). A variante encontra-se assinalada pela seta.

## 2. Estudo de genes candidatos através da sequenciação global do exoma

O estudo de mapeamento genético realizado anteriormente na família 1, sugeriu que o gene de susceptibilidade para as neoplasias da tiróide, nesta família, se localiza na região 9 000 000 – 17 000 000 bp. no cromossoma 8p23-p22, de acordo com o modelo “tumor-bócio”, que assume como afectados os familiares com lesões benignas e malignas da tiróide (Cavaco *et al.*, 2008). Numa abordagem em que se utilizou um modelo em que apenas os familiares com tumores eram considerados afectados (modelo “adenoma-carcinoma”), definiu-se uma região candidata no intervalo 9 000 000 – 23 900 000 bp, do cromossoma 8p23-p22, que foi utilizada na análise dos dados de WES.

A amostra de DNA de um indivíduo afectado (II.8) da família 1 com FNMTC (Figura III.13), que apresentava um cPTC e um FTA, foi sequenciada através da tecnologia da sequenciação global do exoma (WES). Os resultados da análise bioinformática, enviados pela empresa, foram reanalisados de forma a identificar as variantes potencialmente patogénicas, no contexto do estudo. Numa primeira fase, foram removidas todas as variantes sinónimas ou com efeito desconhecido, que apresentavam elevada frequência e estavam validadas em bases de dados, uma vez que o objectivo da análise era identificar uma variante em heterozigotia rara ou ainda não descrita (frequência na população < 1%).

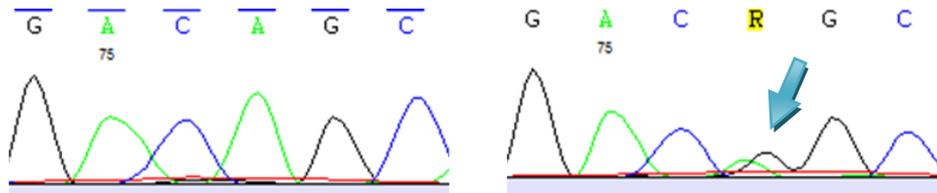


**Figura III.13** - Árvore genealógica da família 1.

A aplicação destes critérios permitiu a exclusão de 53795 variantes e a identificação de dois genes candidatos: *C8orf48* (*chromosome 8 open reading frame 48*) e *PSD3* (*Pleckstrin and Sec7 Domain containing 3*), localizados nas regiões 13 424 352 - 13 425 796 e 18 384 811 - 18 942 240, respectivamente. As variantes encontradas nestes genes ainda não tinham sido descritas nas bases de dados *ENSEMBL* e *NCBI* (SNPdb).

## 2.1 Estudo da variante p.S334G no gene *PSD3* na família 1

Uma nova variante genética no gene *PSD3* (Figura III.14), ainda não descrita na literatura ou nas bases de dados ENSEMBL e NCBI, foi detectada em heterozigotia no indivíduo II-8 da família 1. Esta variante localiza-se no codão 334 deste gene e consiste na transição de uma adenina para uma guanina (c.1000A>G). É esperado que esta alteração no codão 334 conduza à substituição de um resíduo de serina por um resíduo de glicina (p.S334G).



**Figura III.14** - Sequenciação do gene *PSD3* num controlo normal (imagem à esquerda) e no indivíduo II-8 da família 1, portador de uma variante c.1000A>G (imagem à direita), que deverá conduzir à substituição do resíduo de serina por um resíduo de glicina no codão 334 (p.S334G). A variante encontra-se assinalada pela seta.

Para investigar se esta variante segregava com a doença na família, procedeu-se à sequenciação do gene nos restantes familiares (Figura III.13). A análise das sequências obtidas, através do método de Sanger, revelou que a variante não segregava com a doença, visto que o probando (III.14) da família e outros familiares afectados não apresentavam a variante. Por outro lado, indivíduos não afectados apresentavam a variante.

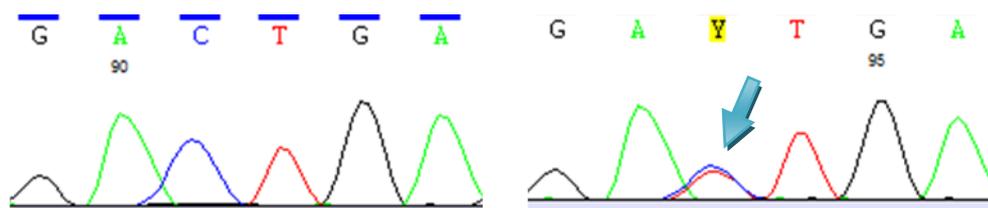
Estes estudos permitiram concluir que o gene *PSD3* não representava um potencial candidato à susceptibilidade para FNMTC nesta família, tendo sido excluído de mais estudos.

## 2.2 Estudo da variante p.T22I no *C8orf48*

### 2.2.1 Estudo da segregação da variante p.T22I do gene *C8orf48* na família 1

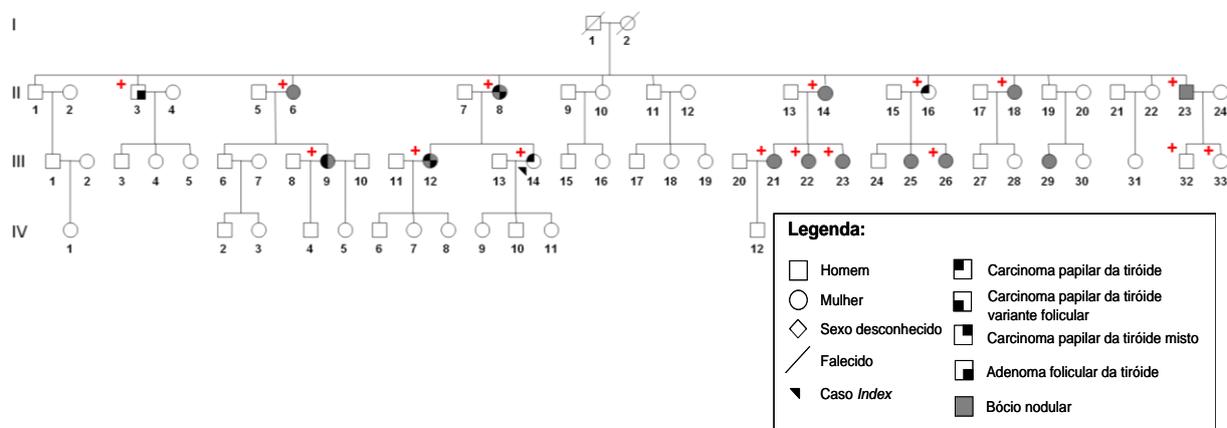
Uma nova variante genética no *C8orf48* (Figura III.15), ainda não descrita na literatura ou nas bases de dados ENSEMBL ou NCBI, foi detectada em heterozigotia no indivíduo II.8 da família 1. Esta variante localiza-se no codão 22 deste gene e consiste na transição de uma citosina para uma timina (c.65C>T). É esperado que esta alteração no codão 22 conduza à substituição do resíduo de treonina por um resíduo de isoleucina (p.T22I). Esta variante genética não estava presente em 50 controlos normais, não sendo por isso um polimorfismo comum na população Portuguesa.

A análise *in silico*, utilizando os softwares *SIFT*, *Mutation Tester* (<http://www.mutationtaster.org/>) e *Polyphen* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), sugeriu que esta variante poderá não afectar a função da proteína. No entanto, embora este gene se encontre conservado entre várias espécies, há ainda pouca informação disponível a seu respeito, o que poderá afectar a fiabilidade das previsões realizadas *in silico*.



**Figura III.15** - Sequenciação do *C8orf48* num controlo normal (imagem à esquerda) e no indivíduo II-8 da família 1, portador de uma variante c.65C>T (imagem à direita), que deverá conduzir à substituição de um resíduo de treonina por um resíduo de isoleucina no codão 22 (p.T22I). A variante encontra-se assinalada pela seta.

Para investigar se esta variante segregava com a doença na família, procedeu-se à sequenciação do DNA dos restantes familiares. A análise das sequências obtidas revelou que, para além do probando (III.14), que apresentava um cPTC, 14 familiares apresentavam também a variante (II.3, II.6, II.14, II.16, II.18, II.23, III.9, III.12, III.21, III.22, III.23, III.26, III.32 e III.33). Entre os portadores, os indivíduos II.6, II.14, II.18, II.23, III.21, III.22, III.23, e III.26 apresentavam bócio, o indivíduo II.3 apresentava FTA, os indivíduos II.16 e III.14 (probando) apresentavam cPTC, o indivíduo III.9 apresentava um fvPTC e um cPTC, os indivíduos II.8 e III.12 apresentavam um FTA e um cPTC. A variante foi ainda detectada, também, nos indivíduos III.32 e III.33, apesar de não apresentarem até à data lesões tiroideias. A variante não foi detectada nos indivíduos III.25 e II.29, que apresentavam bócio, representando possíveis fenocópias (Figura III.16).



**Figura III.16** - Árvore genealógica da família 1. Os indivíduos portadores da variante p.T22I no *C8orf48* estão assinalados (+).

As evidências apresentadas sugerem que o gene *C8orf48* poderá estar envolvido na susceptibilidade para FNMTTC nesta família.

### 2.2.2 Estudo da expressão de genes-alvo da via *WNT* no probando da família 1

A única evidência existente até à data na literatura sobre a proteína codificada pelo *C8orf48* é sua interacção com a proteína MDFI (codificada pelo gene *Myogenic repressor 1-mf*) (Venkatesan *et al.*, 2009). A proteína MDFI está envolvida na via *WNT*, uma vez que se liga ao complexo formado pela axina, aumentando o nível de  $\beta$ -catenina livre. Neste sentido, a expressão de alguns genes-alvo,

cuja expressão é regulada pela ligação da  $\beta$ -catenina aos seus promotores, foi analisada com *micro-arrays de oligonucleótidos* (estudo previamente realizada pelo Dr. Jaime Pita, do grupo de Endocrinologia Molecular, do IPO-Lisboa). Os níveis de expressão de genes-alvo da  $\beta$ -catenina foram comparados entre a amostra do tumor (T) e a amostra do tecido de tiróide normal (N) do probando (III.14) da família 1, entre a amostra T e tecido de tiróide normal contralateral de um doente com tumor da tiróide (NC) e entre a amostra T e uma *pool* comercial de tecidos tiroideus humanos normais (NP) (Tabela III. II).

**Tabela III.II** – Expressão diferencial dos genes-alvo da  $\beta$ -catenina no tumor do probando da família 1 e diferentes amostras de tiróide normal

Proteína	Gene	Sonda	Lower bound of Fold change		
			T vs N	T vs NC	T vs NP
C-MYC	<b>MYC</b> <i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>	202431_s_at	<b>1,69</b>	1,15	1,35
Axin-2	AXIN2 <i>axin 2</i>	222695_s_at	0,91	-0,85	0,91
		222696_at	-1,33	-0,62	-1,41
Claudin-1	<b>CLDN1</b> <i>claudin 1</i>	218182_s_at	<b>7,26</b>	<b>5,42</b>	<b>8,68</b>
Sox9	SOX9 <i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i>	202935_s_at	-1,39	-1,15	-1,84
		202936_s_at	-1,21	-1,20	-1,19
CD44	<b>CD44</b> <i>CD44 molecule (Indian blood group)</i>	204489_s_at	<b>1,97</b>	<b>2,09</b>	<b>2,11</b>
		204490_s_at	<b>1,95</b>	<b>1,78</b>	<b>1,80</b>
MMP-7	<b>MMP7</b> <i>matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)</i>	204259_at	1,33	1,16	1,14
PPAR- $\gamma$	<b>PPARG</b> <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>	208510_s_at	-1,43	-0,65	-0,92
Cyclin-D1	<b>CCND1</b> <i>cyclin D1</i>	208711_s_at	<b>2,29</b>	<b>2,36</b>	<b>2,38</b>
		208712_at	<b>2,18</b>	<b>2,15</b>	<b>2,23</b>
TCF-1	<b>HNF1A</b> <i>HNF1 homeobox A</i>	210515_at	1,20	-0,71	1,06

T – amostra tumor do probando; N – amostra de tecido de tiróide normal do probando; NC – amostra de tecido de tiróide normal contralateral de um doente com tumor da tiróide; NP – *pool* comercial de tecidos tiroideus humanos normais; A negrito encontram-se assinalados os genes que apresentaram diferenças de expressão acima de 1,5 vezes (*threshold* considerado).

A análise de *micro-arrays* revelou que os genes *CLDN1*, *CD44* e *CCND1* se encontravam sobre-expressos no tumor do probando, uma vez que apresentavam uma diferença na expressão (LBFC - *lower bound of fold change*)  $\geq 1,5$  vezes (*threshold* considerado), entre: T e N, T e NC e T e NP. O gene *MYC* apenas se encontrava sobreexpresso entre o T e o N do probando. Os restantes genes não se encontravam diferencialmente expressos entre as amostras de tecidos analisadas.

Na análise feita entre a amostra N e as amostras NC e NP (dados não apresentados) não se observou expressão diferencial para nenhum destes genes analisados.

## IV. DISCUSSÃO

Os tumores da tiróide correspondem a cerca de 1% de todas as ocorrências mundiais de cancro, sendo as neoplasias mais frequentes do sistema endócrino (DeLellis *et al.*, 2004). As neoplasias com origem nas células foliculares são designadas por carcinomas não medulares da tiróide (NMTC). Estes carcinomas representam cerca de 80 a 95% de todos os casos de carcinomas da tiróide (Capezzone *et al.*, 2008). As formas familiares de NMTC (FNMTC) representam 3-7% de todos os casos de NMTC (Hemminki *et al.*, 2008; Nose, 2008; Bonora *et al.*, 2010; Moses *et al.*, 2011).

O diagnóstico molecular precoce e aconselhamento genético são ainda impraticáveis em doentes com FNMTC. É deste modo fundamental a identificação de genes responsáveis por esta doença, que permitirá um diagnóstico atempado, tratamentos mais eficazes e, possivelmente, a redução da mortalidade associada a estas neoplasias.

Estudos de mapeamento genético, através da análise de *linkage* em famílias, possibilitaram a identificação de oito regiões cromossómicas onde se localizam genes de susceptibilidade para o FNMTC (1p13.2-q21, 1q21, 2q21, 6q22, 8p23.1-p22, 8q24, 14q31, 19p13.2) (DeLellis *et al.*, 2004; Malchoff e Malchoff, 2006; Moses *et al.*, 2011). Contudo, até à data, apenas o gene de susceptibilidade localizado na região 14q31, gene *DICER1*, que codifica uma enzima envolvida na síntese de microRNAs (RNaseIII), foi identificado (Frio *et al.*, 2011; Landa e Robledo, 2011). O envolvimento evidente de várias regiões cromossómicas sugere a existência de heterogeneidade genética para o FNMTC.

Entre as possíveis estratégias para identificação dos genes de susceptibilidade para o FNMTC, encontra-se, por um lado, a pesquisa directa de mutações germinais em genes candidatos com base na sua função e, por outro lado, a utilização de tecnologias de sequenciação da próxima geração.

### **Identificação de genes de susceptibilidade para o FNMTC através do estudo de genes candidatos envolvidos na diferenciação tiroideia**

Genes que codificam factores de transcrição envolvidos na diferenciação celular durante a embriogénese podem, se desregulados, contribuir para a tumorigénese (Hanahan e Weinberg, 2000; Puppin *et al.*, 2004). A expressão dos factores de transcrição *NKX2-1*, *FOXE1*, *HHEX* e *PAX8* é essencial para a génese e manutenção do estado diferenciado da tiróide. Desta forma, os genes que codificam estes factores de transcrição representam alvos de estudo adequados, para a elucidação dos mecanismos moleculares que estão envolvidos na iniciação tumoral na tiróide (Fagman e Nilsson, 2010; Kimura, 2011).

O estudo de um candidato funcional – o gene *NKX2-1* – conduziu à identificação de uma mutação germinal em duas famílias com FNMTC, constituindo a primeira evidência do envolvimento de um factor de transcrição na susceptibilidade para o FNMTC (Ngan *et al.*, 2009). Num trabalho recente, desenvolvido pelo nosso grupo, foram pesquisadas variantes genéticas nos genes *NKX2-1*, *FOXE1*, *HHEX* e *PAX8*. Uma das variantes identificadas, no gene *FOXE1* (c.743C>G, p.A248G) segregava com a doença numa família. De acordo com o *software* SIFT, o resíduo de alanina do

codão 248 do gene *FOXE1* foi conservado na evolução, sugerindo que a variante detectada poderá afectar a função da proteína, sendo potencialmente patogénica. Estudos preliminares, em que se utilizaram clones (PCDNA3, 16WT e 16MUT) de células de tiróide normal de *rattus norvegicus* (PCCL3) sugeriram que a variante p.A248G do gene *FOXE1* promove a migração celular (Silva, 2011). Estes estudos vieram apoiar a possibilidade do envolvimento de um segundo factor de transcrição da tiróide na susceptibilidade para o FNMTc.

### **Estudo do papel da variante p.A248G do gene *FOXE1* na proliferação, migração e viabilidade celular**

Tendo em conta a informação atrás mencionada e as evidências experimentais anteriores, desenvolveram-se novos estudos funcionais para a variante p.A248G identificada do gene candidato *FOXE1*, usando como modelos células PCCL3 e uma linha celular de carcinoma papilar da tiróide humano (TPC-1).

#### **Estudos com clones de células PCCL3**

Realizaram-se estudos com clones de células PCCL3 transfectados de forma estável com os plasmídeos: pcDNA3 sem o gene *FOXE1* (pcDNA3), pcDNA3-*FOXE1*-16Ala (16 WT) e pcDNA3-*FOXE1*-16Ala-A248G (16 MUT). Neste projecto, os clones escolhidos foram o 16 WT #3 e 16 MUT #4, que apresentavam uma expressão equivalente do gene *FOXE1* e como controlo o PCDNA3 #2. O clone PCDNA3 apresentou maior capacidade proliferativa e migratória. O clone 16 MUT #4 apresentou proliferação mais elevada do que o clone 16 WT #3, às 48, 96 e 144 horas, embora sendo significativo apenas às 144 horas ( $P < 0,001$ ).

A maior capacidade proliferativa e migratória exibida pelo controlo poderá ser resultado de uma maior eficiência na integração do plasmídeo no genoma das células PCCL3. As células controlo foram transfectadas com o plasmídeo PCDNA3 sem gene *FOXE1*, que possui menos 1157 pares de bases, o que poderá ter facilitado o processo de integração. Desta forma, a maior integração deste plasmídeo (vazio), em relação aos outros plasmídeos (com o gene *FOXE1*), poderá ter conferido a este clone uma maior resistência à geneticina, traduzindo-se numa vantagem proliferativa e migratória, uma vez que os ensaios com as células PCCL3 foram realizados na presença de geneticina.

A integração de um plasmídeo em diferentes regiões do genoma, a integração de um número diferente de cópias, ou ainda diferentes níveis de metilação ou acetilação do promotor CMV, poderão resultar em diferentes níveis de expressão do gene sob estudo e também em diferentes níveis de resistência ao antibiótico utilizado na selecção (Busslinger *et al.*, 1983; Watt e Molloy, 1988; Qu e Ehrlich, 1999). Desta forma, a utilização de clones é bastante discutível, e a utilização de *pools* celulares, poderá ser vantajosa, pois diferenças na integração dos plasmídeos poderão ser compensadas entre as diferentes células que constituem a *pool*. A utilização de *pools* permite, também, obter um modelo mais aproximado do nicho celular existente num tumor, uma vez que são células com características heterogéneas. A presença de geneticina durante os ensaios, também poderá afectar o comportamento celular, pelas razões acima indicadas, tendo-se optado pela não

utilização nos estudos seguintes. A utilização das células PCCL3 é também discutível, uma vez que não são um modelo celular humano.

#### **Estudos com pools de células TPC-1**

Como os estudos iniciais foram inconclusivos, foi necessário desenvolver estudos funcionais, utilizando uma linha celular diferente. Assim, foram realizados ensaios funcionais com uma linha celular de carcinoma papilar da tiróide humano (TPC-1). As células TPC-1 foram transfectadas com os mesmos plasmídeos utilizados para transfectar as células PCCL3: pcDNA3 sem o gene *FOXE1* (PCDNA3), pcDNA3-*FOXE1*-16Ala (16 WT) e pcDNA3-*FOXE1*-16Ala-A248G (16 MUT). Seleccionaram-se as células com expressão estável dos diferentes plasmídeos com geneticina e obtiveram-se as respectivas *pools* celulares.

A sequenciação do gene *FOXE1* nas *pools* de células TPC-1 permitiu a confirmação da integração dos plasmídeos. A *pool* PCDNA3 apresentava apenas expressão do gene *FOXE1* endógeno. Nestas células, o gene *FOXE1* endógeno apresentava a sequência *wild type* e 14 resíduos de alaninas em homocigotia. A *pool* de células 16 WT apresentava expressão do gene *FOXE1 wild type* transfectado (com 16 resíduos de alaninas) confirmando a sua integração do plasmídeo, e uma expressão residual do gene *FOXE1 wild type* endógeno (com 14 resíduos de alaninas). Na *pool* 16 MUT a expressão do gene *FOXE1 wild type* endógeno era também residual, e foi possível identificar a expressão preferencial do gene *FOXE1* integrado (com 16 resíduos de alaninas e com a variante p.A248G). O gene *FOXE1 wild type* ou com a variante (com 16 resíduos de alaninas), subclonados no plasmídeo pCDNA3 e integrados no genoma das células TPC-1, apresentaram um sinal mais elevado nos electroferogramas, em relação ao *FOXE1* endógeno. Este resultado poderá ser explicado pelo facto do gene *FOXE1* ser precedido por um promotor viral no plasmídeo, que terá promovido uma expressão mais abundante do respectivo transcrito. Estes resultados são, no entanto, apenas qualitativos e será necessário em estudos futuros confirmar os níveis de expressão do mRNA e proteína do gene *FOXE1*, por PCR quantitativo e *Western blot*, respectivamente.

Nestas *pools*, a proliferação celular foi avaliada por contagem directa em hemocitómetro e por citometria de fluxo. Na contagem em hemocitómetro, a *pool* 16 MUT apresentou uma proliferação celular mais elevada do que as restantes *pools* tanto às 72h (PCDNA3,  $P < 0,05$ ; 16 WT,  $P < 0,01$ ) como às 96h (PCDNA3,  $P < 0,001$ ; 16 WT  $P < 0,001$ ). Estes resultados sugerem que a variante p.A248G conferiu vantagem proliferativa à *pool* 16 MUT.

Para confirmar os resultados obtidos nos ensaios funcionais de proliferação, recorreu-se à citometria de fluxo, que permite a determinação da proporção de células em diferentes fases do ciclo celular, o que se relaciona com a proliferação celular (Rabinovitch, 1994). Os resultados obtidos por esta técnica sugerem que a variante p.A248G no gene *FOXE1* poderá promover a proliferação celular, uma vez que a *pool* 16 MUT apresentou um maior número de células em fase S (apesar de não ser um valor estatisticamente significativo) e também um índice proliferativo (soma da percentagem de células nas fases G2/M e S) mais elevado que o das *pools* PCDNA3 e 16 WT, sendo esta diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

A migração celular foi avaliada na linha celular TPC-1, recorrendo inicialmente a transfecções transitórias. As células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3-FOXE1-16Ala-A248G apresentaram uma reparação da área lesada da monocamada de células significativamente mais elevada que as células transfectadas com o plasmídeo PCDNA3 (às 9h,  $P < 0,001$  e às 12h,  $P < 0,01$ ) ou com o 16 WT (às 9h e 12h,  $P < 0,01$ ). Contudo, não se pode excluir a possibilidade de que este efeito tenha resultado de uma melhor eficiência da transfecção do plasmídeo pcDNA3-FOXE1-16Ala-A248G, quando comparada com a dos outros plasmídeos.

Neste sentido, para confirmar os resultados da migração celular obtidos com transfecções transitórias, realizou-se um novo ensaio de *wound-healing*, no qual foram utilizadas as *pools* de células TPC-1 acima descritas. As *pools* 16 WT e PCDNA3 apresentaram capacidades de migração celular semelhantes. A *pool* 16 MUT apresentou uma capacidade de reparação da área lesada da monocamada de células significativamente mais elevada que as restantes *pools* em todos os *time-points* (PCDNA3 às 3h,  $P < 0,01$  e nos restantes *time-points*,  $P < 0,001$ ; 16 WT às 3h,  $P < 0,01$  e nos restantes *time-points*,  $P < 0,001$ ). Estes resultados corroboraram os que foram obtidos com as transfecções transitórias.

O factor de transcrição FOXE1 tem um papel crucial no controlo da migração das células precursoras da tiróide folicular, durante a embriogénese (Zannini *et al.*, 1997), desta forma os resultados obtidos sugerem que a variante p.A248G no gene *FOXE1* poderá potenciar os efeitos deste gene na migração celular.

Para além da vantagem proliferativa e migratória, a resistência à morte celular programada (apoptose) pode também contribuir para a transformação neoplásica (Hanahan e Weinberg, 2000). No entanto, após exposição a radiação UV, a *pool* 16 WT e a PCDNA3 apresentaram viabilidades muito semelhantes e superiores à da *pool* 16 MUT, sugerindo que a apoptose não intervém no processo oncogénico iniciado pela variante identificada no gene *FOXE1*.

### **Estudo do papel da variante p.A248G do gene *FOXE1* na transição epitélio-mesenquimatosa (EMT)**

Estudos anteriores mostraram que os factores de transcrição da família de FOX (à qual pertence o FOXE1), quando sobre-expressos, participam na transição epitélio-mesenquimatosa (EMT), pelo que o gene *FOXE1* poderá contribuir para a tumorigénese através da sua capacidade de induzir migração e invasão (Landa *et al.*, 2009). Os resultados no presente estudo sugerem que a variante p.A248G aumenta a capacidade do gene *FOXE1* induzir a migração. Deste modo, estudou-se a EMT nestas *pools* celulares.

Durante a EMT ocorre a supressão da expressão da E-caderina, uma vez que esta proteína associada à  $\beta$ -catenina está envolvida na adesão celular (Shtutman *et al.*, 1999), e existe, ainda, o aumento da expressão de proteínas, como a vimentina e a miosina (Bozzuto *et al.*, 2010).

Para estudar este processo de EMT, neste projecto iniciou-se a optimização de ensaios de imunofluorescência para avaliar a expressão da E-caderina, da vimentina e da  $\beta$ -catenina nas *pools*

de células TPC-1. No entanto, os resultados preliminares não foram conclusivos (dados não apresentados).

Para além do estudo da expressão destas proteínas, será necessário realizar ensaios de invasão celular para compreender melhor o papel do *FOXE1* na EMT e conseqüentemente na tumorigénese.

### **Efeito da variante p.A248G do gene *FOXE1* na diferenciação celular**

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).

Para investigar o efeito da variante p.A248G na diferenciação das células normais e tumorais da tiróide, desenvolveram-se estudos preliminares (dados não apresentados) em que se analisou a transactivação do promotor do gene *TPO*, nos clones de células PCCL3 com os plasmídeos pcDNA3 sem o gene *FOXE1* (pcDNA3), pcDNA3-*FOXE1*-16Ala (16 WT) e pcDNA3-*FOXE1*-16Ala-A248G (16 MUT). Os resultados deste estudo, sugeriram que existia uma maior activação do gene *TPO* no clone 16 MUT#4, quando comparado com o 16 WT#3 e o controlo (PCDNA3 #2).

Para complementar estes estudos será necessário desenvolver novos ensaios em modelos celulares sem expressão endógena de *FOXE1* (por exemplo, células HeLa ou Hek239). Será também importante avaliar por qRT-PCR a expressão dos genes *TG* e *TPO* nos clones e *pools* estabelecidos, e nos tumores dos doentes das famílias 25 e 25A.

### **Efeito da variante p.A248G do gene *FOXE1* na expressão do gene *WNT5A***

Estudos anteriores mostraram que a família de factores de transcrição FOX (incluindo o *FOXE1*) participa na sobre-expressão da proteína *WNT5A*, por diferentes vias de sinalização (NF-kappaB, Hedgehog, TGFβ e Notch) (Katoh e Katoh, 2009). Estudos *in vitro*, usando linhas celulares, demonstraram que o gene *WNT5A* é um importante regulador da proliferação, diferenciação e mobilidade celular (Iozzo *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2003). Os níveis de expressão do gene *WNT5A* em cancros humanos são variáveis. Existem evidências da sua sobre-expressão em cancro da mama, em cancro do pulmão (Iozzo *et al.*, 1995), em cancro gástrico (Saitoh *et al.*, 2002) e em carcinoma cutâneo de células escamosas (Haider *et al.*, 2006). Contudo, um estudo mais recente, em carcinoma da mama, mostrou uma menor expressão desta proteína (Leris *et al.*, 2005). Estes trabalhos sugerem o envolvimento do *WNT5A* na tumorigénese (Huang *et al.*, 2005), mas ainda com um papel pouco claro, uma vez que alguns estudos apontam para uma função oncogénica e outros para um papel de supressor tumoral (Leris *et al.*, 2005).

Neste trabalho, para avaliar o efeito da variante p.A248G do gene *FOXE1* no nível de expressão do gene *WNT5A*, recorreu-se ao qRT-PCR. Observou-se que a *pool* 16 MUT apresentou uma expressão do gene *WNT5A* superior à das *pools* PCDNA3 e 16 WT. Estes resultados são ainda preliminares e sem significado estatístico. Kremenevskaja e seus colaboradores, mostraram por análise de imunohistoquímica que a expressão da *WNT5A* era quase indetectável em tecido normal e carcinomas anaplásicos, mas que esta era elevada em tumores bem diferenciados (Kremenevskaja

*et al.*, 2005). Contudo, estes autores observaram também que a sobre-expressão do *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). Contrastando com estes resultados, no presente trabalho, observou-se que o aumento da expressão do *WNT5A* na *pool* 16 MUT poderá estar relacionado com a maior proliferação e migração celulares observadas.

As proteínas WNT podem ser agrupadas em duas categorias: aquelas que têm a capacidade de activar a via canónica (WNT/ $\beta$ -catenina) e as que têm a capacidade de activar a via não-canónica (WNT/ $\text{Ca}^{2+}$ ). A proteína *WNT5A* pode exercer funções de supressão tumoral, antagonizando a via WNT/ $\beta$ -catenina, em diferentes tipos de tumores, incluindo na tiróide, cérebro, mama, cólon e recto (Li *et al.*, 2010), contudo, pode também exercer funções oncogénicas, possivelmente através da via WNT/ $\text{Ca}^{2+}$ . Apesar de ainda não serem conhecidos genes-alvo desta via, há evidências do seu envolvimento na movimentação celular durante a gastrulação, pelo que possivelmente a activação desta via aumenta a migração e invasão celular, o que poderá contribuir para o processo tumoral (Habas and Dawid, 2005). Deste modo, e como já foi referido, a função da *WNT5A* depende do contexto celular em que está inserida, podendo apresentar papéis antagónicos na tumorigénese (Leris *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos com a linha celular TPC-1 sugerem que a variante p.A248G poderá levar à progressão tumoral, através do aumento da expressão do gene *WNT5A* e que neste contexto este gene terá um papel oncogénico. No entanto, apesar se ter observado esta tendência, os níveis de expressão do *WNT5A* apresentaram desvios-padrão elevados, pelo que será necessário realizar novos ensaios. 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.

### **Alterações somáticas em genes da via *MAPK* nos tumores das famílias 25 e 25A**

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 nos genes da via *MAPK*, 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. Para testar esta hipótese, as amostras de DNA dos 4 tumores disponíveis da família 25 e 25A foram sequenciadas nos *hotspots* dos genes *BRAF* e *RAS*. Os tumores, um tcPTC e um cPTC, de dois familiares (III.15 e III.16 da família 25) apresentaram a mutação somática *BRAF* p.V600E, frequentemente detectada em cPTC, não tendo sido detectadas mutações nos genes *H-*, *K-* ou *N-RAS*. Para completar o estudo será necessário pesquisar a ocorrência de outras alterações somáticas frequentes em carcinomas da tiróide de origem folicular (e.g. rearranjos *RET/PTC* e *PAX8/PPAR $\gamma$* ), nos restantes tumores.

### Génese e progressão tumoral nas famílias 25 e 25A

Os estudos realizados sugerem que nas famílias 25 e 25A a predisposição para o NMTC, é conferida pela variante p.A248G do gene *FOXE1*, que poderá contribuir para a ocorrência de alterações somáticas (na via das *MAPK*, por exemplo). As alterações somáticas, em combinação ou não com factores ambientais poderão levar ao desenvolvimento do cancro da tiróide. Na Figura IV.1 encontra-se representada a hipótese proposta para a génese e progressão tumoral da tiróide na família 25 e 25A.

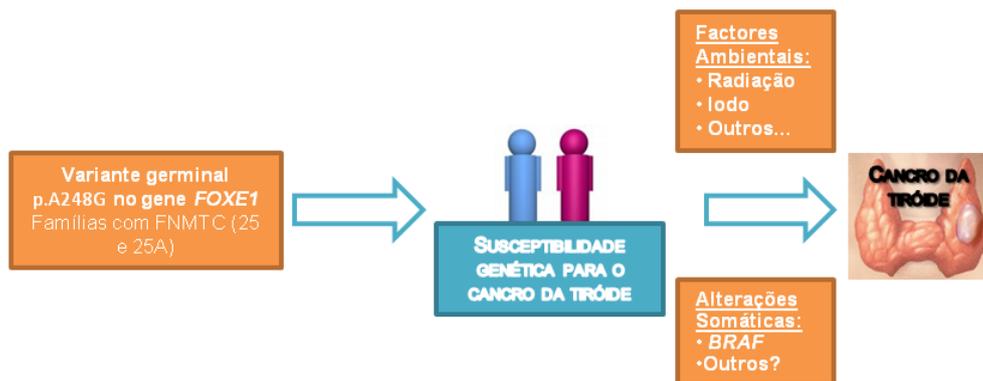


Figura IV.1 – Diagrama esquemático da hipótese para a génese e progressão tumoral da tiróide nas famílias 25 e 25A com FNMTc.

### Identificação de variantes genéticas através da sequenciação global do exoma na família 1

Na família 1, a região cromossómica de susceptibilidade para as neoplasias da tiróide, tinha sido previamente mapeada através de análise de *linkage*, usando *arrays* de SNPs. Apesar de terem sido analisados 17 genes da região mapeada no cromossoma 8q23.1-p22, nenhum apresentou variantes potencialmente patogénicas, tendo sido excluídos de mais estudos (Cavaco *et al.*, 2008b).

A sequenciação da próxima geração representa uma importante estratégia para acelerar a identificação de genes de susceptibilidade envolvidos neste tipo de carcinomas familiares, sem que tenham de ser definidos candidatos *a priori*. A sequenciação global do exoma (WES) consiste na sequenciação de todos os exões codificantes e locais de *splicing*, onde se localizam a maioria das mutações patogénicas. A comparação das sequências obtidas, com sequências de referência existentes em bases de dados, permite identificar variantes genéticas que poderão estar associadas ao cancro (Mardis e Wilson, 2009; Haimovich, 2011).

A sequenciação global do exoma, foi utilizada neste projecto, para identificar o gene de susceptibilidade na família 1.

A amostra de DNA do indivíduo (II.8) da família 1, que apresentava um cPTC e um FTA, foi sequenciada através da tecnologia da sequenciação global do exoma. A aplicação de critérios de exclusão permitiu a rejeição de 53795 variantes e a identificação de dois genes candidatos: *PSD3* e *C8orf48*. As variantes encontradas nestes genes ainda não tinham sido descritas nas bases de dados *ENSEMBL* e *NCBI* (SNPdb).

### Gene *PSD3*

A variante detectada no gene *PSD3* localiza-se no codão 334 e consiste na transição de uma adenina para uma guanina (c.1000A>G). É esperado que esta alteração no codão 334 conduza à substituição de um resíduo de serina por um resíduo de glicina (p.S334G). Contudo, observou-se que a variante não segregava com a doença na família, uma vez que o probando (III.14) e outros familiares afectados não apresentavam a variante, enquanto que indivíduos não afectados apresentavam a variante. Estes estudos permitiram concluir que o gene *PSD3* não representava um potencial candidato à susceptibilidade para FNMTc nesta família, tendo sido excluído de mais estudos.

O gene *PSD3* encontra-se localizado na região 18 384 811-18 942 240 no cromossoma 8, que faz parte da região mínima de localização do gene de susceptibilidade nesta família, de acordo com o modelo “adenoma-carcinoma”. No entanto, o *PSD3* está fora do intervalo mínimo de localização do gene de susceptibilidade, de acordo com o modelo mais provável para esta família “bócio-tumor” (9 000 000 – 17 000 000, ver secção II.17), o que poderá justificar a não segregação da variante encontrada neste gene com a doença.

### Gene *C8orf48*

A variante genética identificada no *C8orf48* localiza-se no codão 22 e consiste na transição de uma citosina para uma timina (c.65C>T). É esperado que esta alteração conduza à substituição do resíduo de treonina por um resíduo de isoleucina (p.T22I). Para além do probando (III.14), que apresentava um cPTC, 14 familiares apresentavam também a variante. Entre os portadores, 8 apresentavam bócio, 1 apresentava FTA, 2 apresentavam cPTC, 2 apresentavam FTA e cPTC e 1 apresentava cPTC e fvPTC. A variante foi ainda detectada nos indivíduos III.32 e III.33, apesar de não apresentarem, até à data, lesões tiroideias.

Este gene está presente em várias espécies e a sua sequência foi conservada na evolução, sugerindo que a sua função poderá ser importante. Apesar da análise *in silico*, utilizando os *softwares SIFT, Mutation Tester e Polyphen*, sugerir que esta variante poderá não afectar a função da proteína, há ainda pouca informação disponível a seu respeito, o que poderá condicionar a fiabilidade das previsões realizadas *in silico*. Esta variante genética não estava presente em 50 controlos normais, não sendo por isso um polimorfismo comum na população Portuguesa.

A única evidência existente, até à data, na literatura sobre a proteína codificada pelo *C8orf48* é sua interacção com a proteína MDFI (codificada pelo gene *Myogenic repressor 1-mf*) (Venkatesan *et al.*, 2009). A proteína MDFI está envolvida na via *WNT* canónica. Esta via controla processos cruciais na célula, através da  $\beta$ -catenina, que é um co-activador de vários genes, envolvidos, por exemplo, na proliferação celular. Num processo normal, esta via é finamente regulada, para que se consiga um balanço correcto entre a sua activação e a sua inibição, contudo existem evidências que quando desregulada pode desencadear e estar associada a várias doenças, como o cancro (MacDonald *et al.*, 2009, Yang, 2012). Quando esta via está inactiva, ou seja, a proteína *WNT* não se encontra ligada ao receptor de membrana, a  $\beta$ -catenina é constantemente degradada através do complexo composto

pela axina e pelo APC, não havendo transcrição dos genes-alvo. Por outro lado, com a ligação da WNT existe um bloqueio da axina, pelo que a  $\beta$ -catenina fica livre para migrar até ao núcleo e activar a transcrição dos genes alvo.

A proteína MDFI tem a capacidade de se ligar ao complexo formado pela axina, bloqueando-o, mesmo na presença da WNT, o que leva ao aumento do nível de  $\beta$ -catenina livre e portanto disponível para iniciar a transcrição dos genes-alvo desta via.

Neste sentido, procedeu-se à análise da expressão de alguns genes-alvo, através de *micro-arrays* de oligonucleótidos (estudo previamente realizada pelo Dr. Jaime Pita, do nosso grupo). Os níveis de expressão foram comparados entre: a amostra do tumor (T) e a amostra do tecido de tiróide normal (N) do probando (III.14) da família 1, entre a amostra T e uma *pool* comercial de tecidos tiroideus humanos normais (NP) e entre a amostra T e uma amostra de tecido de tiróide normal contralateral de um doente com tumor da tiróide (NC). Comparou-se também a amostra N com as amostras NP e NC.

Observou-se que os genes *CLDN1*, *CD44* e *CCND1* se encontravam sobre-expressos no tumor do probando, comparando com as amostras de tecidos tiroideus normais N ou NP. O gene *MYC* apenas se encontrava sobre-expresso entre o tecido tumoral e o tecido normal do probando. Na análise feita entre a amostra N e a amostra NP e a amostra N e a amostra NC (dados não apresentados) não se observou expressão diferencial para nenhum destes genes analisados.

A claudina-1 (codificada pelo gene *CLDN1*) é uma proteína de membrana, fazendo parte das *tight junctions*. Esta proteína pode ter uma acção anti-apoptótica, uma vez que torna a adesão célula a célula mais forte. Contudo, quando sub-expressa pode contribuir para a migração celular, por perda de adesão celular. Deste modo, tanto a sobre-expressão como a sub-expressão estão associadas ao desenvolvimento tumoral, como por exemplo no cancro da mama, no carcinoma do colón e em adenocarcinomas do pulmão (Dhawan *et al.*, 2005; Chao *et al.*, 2009; Akasaka *et al.*, 2010). Em carcinomas papilares da tiróide é frequente encontrar uma sobre-expressão deste gene associado ao aumento da agressividade tumoral (Myal *et al.*, 2010).

O gene *CD44* codifica uma glicoproteína transmembranar com o mesmo nome, que interage com a actina do citoesqueleto, participando em várias vias de sinalização que controlam o crescimento, sobrevivência e diferenciação celular (Ponta *et al.*, 2003). É portanto, considerado um oncogene porque, quando sobre-expresso, está associado à invasão tumoral. Este gene também se encontra associado a vários tipos de carcinomas, como por exemplo ao da próstata (Iczkowski, 2011).

A ciclina D1 (codificada pelo gene *CCND1*) é um dos genes-alvo mais estudados da  $\beta$ -catenina (Shtutman *et al.*, 1999) e está envolvida no ciclo celular, mais especificamente na progressão entre a fase G1 e a S (*checkpoint G1-S*) (Fu *et al.*, 2004). A ciclina D1 está frequentemente sobre-expressa em tumores (Bienvenu *et al.*, 2010), como por exemplo em carcinoma da mama, em carcinomas da cavidade oral e em neoplasias do cólon (Donnellan e Chetty, 1998).

O gene *MYC* é um importante regulador da proliferação celular. Em tecidos normais é pouco expresso, uma vez que é finamente regulado por factores de crescimento extracelular. Este gene encontra-se sobre-expresso em cerca de 80% dos carcinomas da mama e em aproximadamente 70%

dos carcinomas do cólon, e estima-se que contribua para o desenvolvimento de muitos carcinomas humanos (Gardner *et al.*, 2002).

Deste modo, é interessante observar que os genes *CLDN1*, *CD44*, *CCND1* e *MYC*, sobre-expressos no tecido tumoral, não estão sobre-expressos no tecido normal do probando, o que sugere que estas alterações representam eventos somáticos envolvidos na progressão tumoral. O resultado do estudo de expressão destes genes aguarda validação por qRT-PCR.

### **Alterações somáticas em genes da via *MAPK* nos tumores da família 1**

Num estudo anterior, desenvolvido pelo nosso grupo, algumas amostras de DNA de tecido tumoral de indivíduos da família 1 foram sequenciadas nos *hotspots* dos genes *BRAF* e *RAS*, da via *MAPK* (Cavaco *et al.*, 2008a). O probando da família 1 (III.14) e o indivíduo III.12, apresentavam a variante p.V600E no gene *BRAF*.

A via *MAPK* está desregulada em 30% dos carcinomas humanos e é frequentemente activada pelo oncogene *BRAF*<sup>V600E</sup> (Tie e Desai, 2010). A activação constitutiva desta via leva a que ocorra um descontrolo na proliferação celular e no ciclo celular, alterando os níveis de expressão de genes-alvo, como por exemplo, os genes *MYC* e *CCND1*. Deste modo, a sobre-expressão detectada através dos *micro-arrays* para os genes *MYC* e *CCND1*, no tumor do probando, poderão resultar do efeito da mutação somática do gene *BRAF*, ou representar um efeito combinado da alteração germinal e somática.

### **Conclusões**

No presente trabalho, procedeu-se à caracterização de uma variante no gene *FOXE1* identificada numa família com FNMTc, através de estudos *in vitro*, e à identificação de novos genes de susceptibilidade para o FNMTc por sequenciação global do exoma.

Os resultados dos estudos *in vitro* com células normais e tumorais da tiróide, sugerem que a variante p.A248G no gene *FOXE1* está envolvida no aumento da migração e proliferação, mas não na viabilidade celular. A análise de expressão génica sugere que esta variante induz maior expressão do mRNA do gene *WNT5A*, envolvido nas vias *WNT* e *WNT/Ca<sup>2+</sup>*. Esta variante poderá contribuir para a ocorrência de alterações somáticas (e.g. no gene *BRAF*), que em combinação, ou não, com factores ambientais poderão levar ao desenvolvimento tumoral.

Por sequenciação global do exoma, foi identificada uma nova variante (p.T22I) no gene *C8orf48*, numa família com FNMTc. A segregação desta variante com a doença na família e a sua ausência em controlos normais da população Portuguesa apoiam a hipótese de envolvimento deste gene na susceptibilidade para os carcinomas da tiróide. A proteína codificada pelo gene *C8orf48* interage com a proteína MDFI, que está envolvida na via *WNT* canónica. Em estudos de expressão génica, observou-se que alguns genes-alvo da via de sinalização *WNT* apresentavam sobre-expressão no tumor da tiróide do probando, relativamente à tiróide normal, sugerindo um possível envolvimento desta via. Estudos funcionais poderão esclarecer o papel desta variante na tumorigénese.

Neste trabalho, foram identificadas duas variantes, potencialmente patogénicas nos genes *FOXE1* e *C8orf48*, que constituem a primeira evidência do seu envolvimento em FNMTc.

A identificação de genes de susceptibilidade para o FNMTc poderá não só aumentar a nossa compreensão dos mecanismos moleculares que governam o desenvolvimento do cancro nestas famílias, como também possibilitará a identificação precoce dos portadores de mutação, um aconselhamento genético apropriado, podendo ainda contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.



## V. BIBLIOGRAFIA

- Adjadj E, Schlumberger M, de Vathaire F (2009) Germ-line DNA polymorphisms and susceptibility to differentiated thyroid cancer. *Lancet Oncol* **10**: 181-190
- Akasaka H, Sato F, Morohashi S, Wu Y, Liu Y, Kondo J, Odagiri H, Hakamada K, Kijima H (2010) Anti-apoptotic effect of claudin-1 in tamoxifentreated human breast cancer MCF-7 cells. *BMC Cancer* **10**:548
- 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**: 521-529
- 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**: 831-839
- Batista, P (2006) Mapeamento e identificação de genes envolvidos na patogénese das formas familiares de neoplasias da tiróide com origem no epitélio folicular. Tese de estágio de licenciatura em Bioquímica. Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa.
- Berdasco M, Esteller M (2010) Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Developmental Cell* **19**: 698 – 711
- Biennvenu F, Jirawatnotai S, Elias JE, Meyer CA, Mizeracka K, Marson A, Frampton GM, Cole MF, Odom DT, JOdajima J, Geng Y, Zagozdzon A, Jecrois M, Young RA, Liu XR, Cepko CL, Gygi SP, Sicinski P (2010) Transcriptional role of cyclin D1 in development revealed by a “genetic-proteomic” screen. *Nature* **463**: 374–378
- Biersack HJ, Grünwald, F (2005) *Thyroid Cancer*, 2<sup>nd</sup> ed. 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**: 1123-1130
- 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**: 1-7
- Bozzuto G, Ruggieri P, Molinari A (2010) Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. *Ann Ist Super Sanità* **1**: 66-80
- Bullock M, Duncan EL, O'Neill C, Tacon L, Sywak M, Sidhu S, Delbridge L, Learoyd D, Robinson BG, Ludgate M, Clifton-Bligh RJ (2012) Association of *FOXE1* Polyalanine Repeat Region with Papillary Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* **97**: E1-E6
- Buslinger 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
- Capezzone 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**: 1075-1081

- Carré 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**: 467-476
- 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**: 159-166
- 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**: 213-220
- Catalano MG, Fortunati N, Boccuzzi G (2012) Epigenetics modifications and therapeutic prospects in human thyroid cancer. *Cancer Endocrinology* **3**:article 40
- 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**: 207-215
- 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**: 4426-4430
- Chao Y, Pan S, Yang S, Yu S, Che T, Lin C, Tsai M, Chang G, Wu C, Wu Y, Lee Y, Hong T, Yang P (2009) Claudin-1 Is a Metastasis Suppressor and Correlates with Clinical Outcome in Lung Adenocarcinoma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **179**: 123-133
- 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**: 2537-2542
- Clark DP, Faquin WC (2010) *Thyroid Cytopathology*. Vol. 8, 2nd edn. NY, USA: Springer-Verlag
- Chow S, Law SCF, Mendenhall WM, Au S, Yau S, Yuen K, Law C, Lau W (2002) Follicular Thyroid Carcinoma Prognostic Factors and the Role of Radioiodine. *Cancer* **98**: 488-498
- 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**: 7302-7314
- 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**: 1376-1383
- Damante G, Di Lauro R (1994) Thyroid-specific gene expression. *Biochim Biophys Acta* **1218**: 255-266
- 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**: 395-398
- De Felice M, Di Lauro R (2004) Thyroid Development and Its Disorders: Genetics and Molecular Mechanisms. *Endocrine Reviews* **25**: 722-746
- De Felice M, Di Lauro R (2011) Intrinsic and Extrinsic Factors in Thyroid Gland Development: An Update. *Endocrinology* **152**: 2948-2956

- DeLellis RA, Lloyd, RV, Heitz, PU, Eng C (2004) *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. Lyon, França: IARC Press
- Dhawan P, Singh AB, Deane NG, No Y, Shiou S, Schmidt C, Neff J, Washington MK, Beauchamp RD (2005) Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *The Journal of Clinical Investigation* **115**: 1765-1776
- 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**: 3395-3402
- Donnellan R, Chetty R (1998) Cyclin D1 and human neoplasia. *J Clin Pathol: Mol Pathol* **51**:1-7
- Dunn GP, Koebel CM and Schreiber RD (2006) Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Tumour Immunology* **6**: 836-848
- Dvorakova S, Vaclavikova E, Sykorova V, Vcelak J, Novak Z, Duskova J, Ryska A, Laco J, Cap J, Kodetova D, Kodet R, LKrskova L, Vlcek P, Astl J, Vesely D, Bendlova B (2008) Somatic Mutations in the *RET* proto-oncogene in Sporadic Medullary Thyroid Carcinomas. *Molecular and Cellular Endocrinology* **284**
- 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**: 1180-1187
- Fabbro D, Pellizzari L, Mercuri F, Tell G, Damante G (1998) Pax-8 protein levels regulate thyroglobulin gene expression. *J Mol Endocrinol* **21**: 347-354
- Fagman H, Nilsson M (2011) Morphogenetics of early thyroid development. *Journal of Molecular Endocrinology* **46**: R33–R42
- 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**: 576-588
- Frio TR, Bahubeshi A, Kanellopoulou C, Hamel N, Niedziela M, Sabbaghian N, Pouchet C, Gilbert L, O'Brien PK, Serfas K, Broderick P, Houlston RS, Lesueur F, Bonora E, Muljo S, Schimke RN, Soglio DB, Arseneau J, Schultz KA, Priest JR, Nguyen V, Harach HR, Livingston D, Foulkes WD, Tischkowitz M (2011) *DICER1* Mutations in Familial Multinodular Goiter With and Without Ovarian Sertoli-Leydig Cell Tumors. *Jama* **305**: 68-77
- Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG (2004) Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions. *Endocrinology* **145**:5439–5447
- Gardner L, Lee L, Dang C (2002) The c-Myc Oncogenic Transcription Factor. *The Encyclopedia of Cancer*. 2<sup>nd</sup> edition
- 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, Helgadóttir 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**: 460-464
- 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**: 892-899

- Gutmann DH (2001) The neurofibromatoses: when less is more. *Human Molecular Genetics* **7**: 747-755
- Habas R, Dawid IB (2005) Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *Journal of Biology* **4**:2
- Haider AS, Peters SB, Kaporis H, Cardinale I, Fei J, Ott J, Blumenberg M, Bowcock AM, Krueger JG, Carucci JA (2006) Genomic Analysis Defines a Cancer-Specific Gene Expression Signature for Human Squamous Cell Carcinoma and Distinguishes Malignant Hyperproliferation from Benign Hyperplasia. *Journal of Investigative Dermatology* **126**: 869–881
- Haimovich AD (2011) Methods, challenges, and Promise of next-Generation Sequencing in cancer Biology. *Yale Journal of Biology And Medicine* **84**: 439-446
- 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**: 646-674
- Hemminki K, Sundquist J, Bermejo JL (2008) Familial risks for cancer as the basis for evidence-based clinical referral and counseling. *Oncologist* **13**: 239-247
- 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**: 385-389
- Hsu PP, Sabatini DM (2008) Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell* **134**: 703-707
- Huang C, Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Kontani K, Yokomise H, Ueno M (2005) Wnt5a Expression Is Associated With the Tumor Proliferation and the Stromal Vascular Endothelial Growth Factor - An Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **23**: 8765 - 8773
- Iczkowski KA (2011) Cell adhesion molecule CD44: its functional roles in prostate cancer. *Am J Transl Res* **3**: 1-7
- Iozzo RV, Eichstetter I, Danielson K (1995) Aberrant Expression of the Growth Factor *Wnt-5A* in Human Malignancy. *Cancer Res* **55**:3495-3499
- 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, Katoh M (2009) Transcriptional mechanisms of WNT5A based on NF-kappaB, Hedgehog, TGFbeta, and Notch signaling cascades. *Int J Mol Med* **23**: 763-769
- Kim R, Emi M and Tanabe K (2007) Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **121**: 1-14
- 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**: 60-69
- Kimura S (2011) Thyroid-Specific Transcription Factors and Their Roles in Thyroid Cancer. *Journal of Thyroid Research*
- Knudson AG (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci* **68**: 820-823
- 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**: 2144-2154
- Krohn K, Fuhrer D, Bayer Y, Eszlinger M, Brauer V, Neumann S, Paschke R (2005) Molecular Pathogenesis of Euthyroid and Toxic Multinodular Goiter. *Endocrine Reviews* **26**: 504–524
- Ku C, Cooper DN, Polychronakos C, Naidoo N, Wu M, Soong R (2012) Exome Sequencing: Dual Role as a Discovery and Diagnostic Tool. *American Neurological Association* **11**: 7-14
- 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
- Landa I, Robledo M (2011) Association studies in thyroid cancer susceptibility: are we on the right track?. *Journal of Molecular Endocrinology* **47**, R43–R58
- 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**: 1093-1104
- Leris A, Roberts T, Jiang W, Newbold R, Mokbel K (2005) WNT5A Expression in Human Breast Cancer. *Anticancer Research* **25**: 731-734
- Levine AJ, Puzio-Kuter AM (2010) The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Science* **330**: 1340-1344
- Li J, Ying J, Fan Y, Wu L, Ying Y, Chan ATC, 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 Biology e Therapy* **10**: 617-624;
- LiVolsi VA, Baloch ZW (2009) Familial thyroid carcinoma: the road less travelled in thyroid pathology. *Diagnostic Histopathology* **15**:2
- Loh KC (1997) Familial nonmedullary thyroid carcinoma: a meta-review of case series. *Thyroid* **7**: 107-13
- MacDonald BT, Tamai K, He X (2009) Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* **17**: 9–26
- 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**: 1758-1764
- Malchoff CD, Malchoff DM (2006) Familial nonmedullary thyroid carcinoma. *Cancer Control* **13**: 106-110
- Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P (1998) Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* **19**: 87-90
- Mardis ER, Wilson RK (2009) Cancer genome sequencing: a review. *Human Molecular Genetics* **18**: R163–R168
- Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, Leite V (2002) Expression of PAX8-PPAR<sub>1</sub> Rearrangements in Both Follicular Thyroid Carcinomas and Adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology e Metabolism* **87**:3947–3952

- 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**: 2433-2445
- 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**: 645-648
- McDonald TJ, Driedger AA, Garcia BM, Uum S, Rachinsky I, Chevendra V, Breadner D, Feinn D, Walsh S, Malchoff CD (2011) Familial Papillary Thyroid Carcinoma: A Retrospective Analysis. *Journal of Oncology* **948786**
- 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**: 837-846
- Moses W, Weng J, Kebebew E (2011) Prevalence, clinicopathologic features, and somatic genetic mutation profile in familial versus sporadic nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid* **21**: 367-371
- 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-E868
- Muro-Cacho CA, Ku NN (2000) Tumors of the thyroid gland: histologic and cytologic features--part 1. *Cancer Control* **7**: 276-287
- Muro-Cacho CA, Ku NN (2000b) Tumors of the thyroid gland: histologic and cytologic features--part 2. *Cancer Control* **7**: 377-385
- Myal Y, Leygue E, Blanchard AA (2010) Claudin 1 in Breast Tumorigenesis: Revelation of a Possible Novel "Claudin High" Subset of Breast Cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **956897**
- Newton C, Graham A (1995) PCR, introduction to biotechniques. Bios. Scientific Publishers
- Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, Huff CD, Shannon PT, Jabs EY, Nickerson DA, Shendure J, Bamshad MJ (2010) Exome sequencing identifies the cause of a Mendelian disorder. *Nat Genet* **42**: 30-35
- 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**: 162-175
- Nose V (2008) Familial non-medullary thyroid carcinoma: an update. *Endocr Pathol* **19**: 226-240
- 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
- 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
- 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**: 464-475
- Park SM, Chatterjee VK (2005) Genetics of congenital hypothyroidism. *J Med Genet* **42**: 379-389

- Pasca di Magliano M, Di Lauro R, Zannini M (2000) Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 13144-13149
- Patel KN, Shaha AR (2006) Poorly Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer. *Cancer Control* **13**: 119-128
- 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**: 2503-2511
- 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**: 203-208
- 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**: 643-651
- Ponta H, Sherman L, Herrlich PA (2003) CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**: 33-45
- 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**: 1845-1852
- 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**: 117-125
- Qu GZ, Ehrlich M (1999) Demethylation and expression of methylated plasmid DNA stably transfected into HeLa cells. *Nucleic Acids Res* **27**: 2332-2338
- Rabinovitch P (1994) Introduction to cell cycle analysis. *Phoenix Flow Systems, Inc.* USA
- 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**: 1350-1354
- 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**: 487-491
- Saitoh T, Mine T, Katoh M (2002) Frequent up-regulation of WNT5A mRNA in primary gastric cancer. *Int J Mol Med*. **9**: 515-519
- 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**: 5463-5467
- Santarpia L, Valenzise M, Di Pasquale G, Arrigo T, San Martino G, Ciccio MP, Trimarchi F, De Luca F, Benvenga S (2007) TTF-2/FOXE1 gene polymorphisms in Sicilian patients with permanent primary congenital hypothyroidism. *J Endocrinol Invest* **30**: 13-19
- Sastre-Perona A, Santisteban P (2012) Role of the Wnt pathway in thyroid cancer. *Cancer Endocrinology* **3**: article 11
- Sato N, Fukushima N, Maitra A, *et al.* (2003) Discovery of Novel Targets for Aberrant Methylation in Pancreatic Carcinoma Using High-Throughput Microarrays. *Cancer Res* **63**:3735-3742
- Schlumberger MJ (1998) Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med* **338**: 297-306

- Shtutman M, zhurinsky J, simcha I, albanese C, d'Amico M, Pestell R, Ben-Zeev A (1999) The cyclin D1 gene is a target of the b-catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5522-5527
- Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A (2011) The Impact of Eliminating Socioeconomic and Racial Disparities on Premature Cancer Deaths. *Ca Cancer j clin* **61**:212–236
- Silva J (2011) Caracterização molecular e funcional de variantes genéticas em factores de transcrição da tiróide em formas familiares de cancro da tiróide. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa.
- 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**: 311-318
- 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**: 924-933
- Soares P, Lima J, Preto A, Castro P, Vinagre J, Celestino R, Couto JP, Prazeres H, Eloy C, Máximo V, Sobrinho-Simões M (2011) Genetic Alterations in Poorly Differentiated and Undifferentiated Thyroid Carcinomas. *Current Genomics* **12**: 609-617
- Sobrinho-Simões M, Preto A, Rocha AS, Castro P, Maximo V, Fonseca E, Soares P (2005) Molecular pathology of well-differentiated thyroid carcinomas. *Virchows Arch* **447**: 787-793
- Sobrinho-Simões M, Eloy C, Magalhães J, Lobo C, Amaro T (2011) Follicular thyroid carcinoma. *Modern Pathology* **24**: S10–S18
- Soufi A, Jayaraman PS (2008) PRH/Hex: an oligomeric transcription factor and multifunctional regulator of cell fate. *Biochem J* **412**: 399-413
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA (2009) The cancer genome. *Nature* **458**: 719-724
- Sturgeon C, Clark OH (2005) Familial nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid* **15**: 588-593
- Staveren W, Solís DS, Delys L, *et al.* (2012) Human Thyroid Tumor Cell Lines Derived from Different Tumor Types Present a Common Dedifferentiated Phenotype. *Cancer Res* **67**:8113-8120
- 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**: 2516-2523
- 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
- Tennant DA, Durán RV and Gottlieb E (2010) Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nature Reviews* **10**: 267-277
- 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
- Tie J, Desai J (2010) BRAF V600E as a Therapeutic Target in Colorectal Cancer. *European Oncology* **60-64**

- Tomaz RA, Sousa I, Silva JG, Santos C, Teixeira MR, Leite V, Cavaco BM (2012) FOXE1 polymorphisms are associated with familial and sporadic nonmedullary thyroid cancer susceptibility. *Clin Endocrinol. In press.*
- Venkatesan K, Rual J, Vazquez A, Stelzl U, Lemmens I, Hirozane-Kishikawa T, Hao T, Zenkner M, Xin X, Goh K, Yildirim MM, Simonis N, Heinzmann K, Gebreab F, Sahalie JM, Cevik S, Simon C, Smet A, Dann E, Smolyar A, Vinayagam A, Yu H, Szeto D, Borick H, Dricot A, Klitgord N, Murray RR, Lin C, Lalowski M, Timm J, Rau K, Boone C, Braun P, Cusick ME, Roth FP, Hill DE, Tavernier J, Wanker EE, Barabási A, Vidal M (2009) An empirical framework for binary interactome mapping. *Nat Methods* **6**: 83–90
- 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**: 681-683
- Vriens MR, Suh I, Moses W, Kebebew E (2009) Clinical Features and Genetic Predisposition to Hereditary Nonmedullary Thyroid Cancer. *Thyroid* **19**:1343-1349
- 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**: 1136-1143
- Welch JS, Link DC (2011) Genomics of AML: Clinical Applications of Next-Generation Sequencing. *Hematology* 30-35
- 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**: 4689-4698
- Wiseman SM, Masoudi H, Niblock P, Turbin D, Rajput A, Hay J, Bugis S, Filipenko D, Huntsman D, Gilks B (2007) Anaplastic Thyroid Carcinoma: Expression Profile of Targets for Therapy Offers New Insights for Disease Treatment *Annals of surgical oncology* **14**: 719-729
- Yang Y, Topol L, Lee H, Wu J (2003) Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* **130**: 1003-1015
- Yang Y (2012) Wnt signaling in development and disease. *Cell e Bioscience* **2**:14
- 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**: 4230-4241
- Zannini M, Avantiaggiato 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**: 3185-3197



## ANEXOS

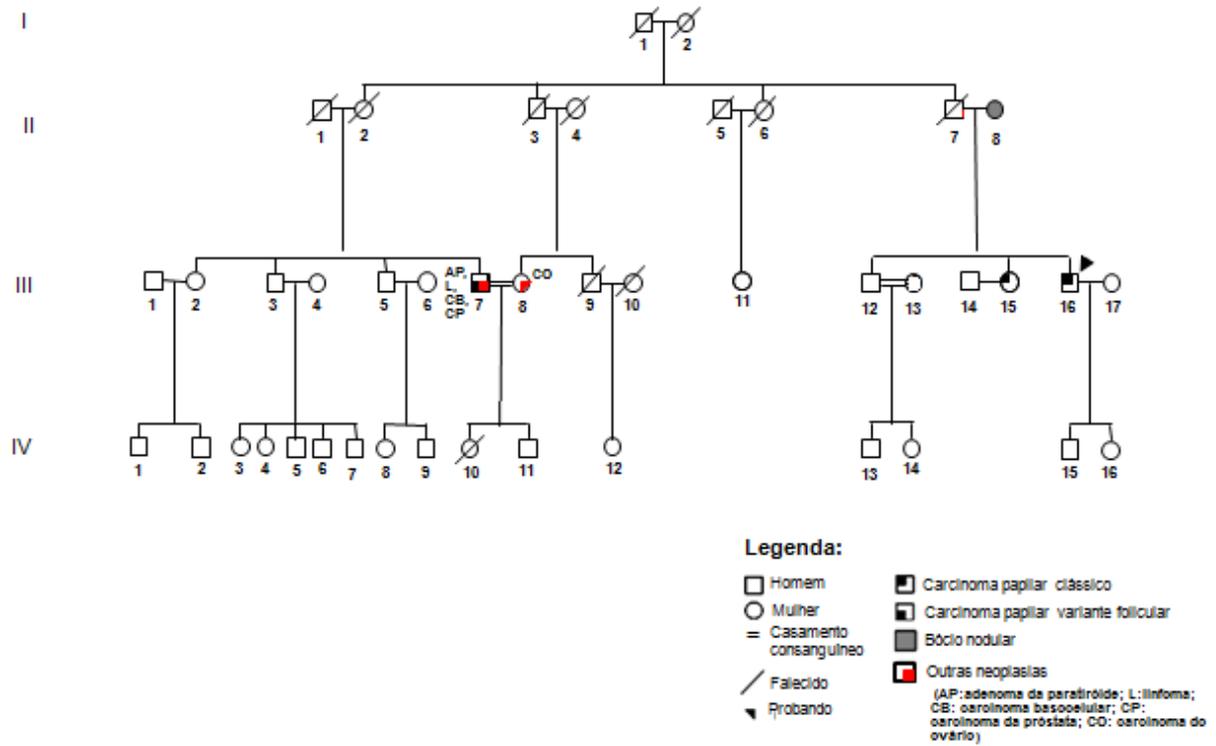


Figura 1 - Árvore genealógica da família 25.

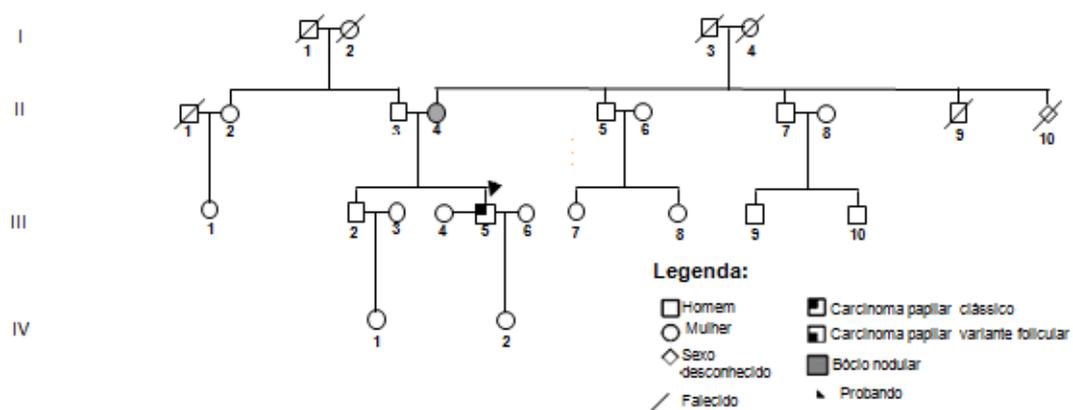


Figura 2 – Árvore genealógica da família 25A.

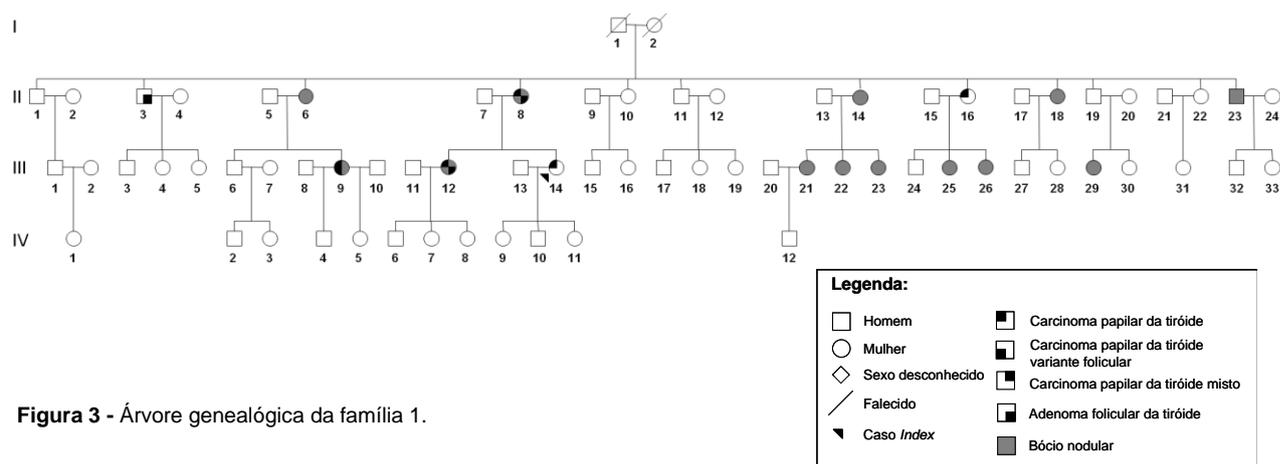


Figura 3 - Árvore genealógica da família 1.

Tabela I - Sequências dos *primers* e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do *locus FOXE1*.

<i>Locus FOXE1</i>	Nome do <i>Primer</i>	Sequência (5'→3')	Tamanho do segmento (bp)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Hibridação (°C)
Exão 2	FOXE1-2F	CCTCACACTCAACGACTGCTT	586	1,8*	59°C
	FOXE1-2R	AGCGGCAAAGATCGCACT			

\* Adicionou-se 6% DMSO (v/v)

Tabela II - Sequências dos *primers* e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do *locus HRAS*.

<i>Locus HRAS</i>	Nome do <i>Primer</i>	Sequência (5'→3')	Tamanho do segmento (bp)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Hibridação (°C)
Exão 1	HRAS-1F	CAGGAGACCCTGTAGGAGGA	148	1,8	60°C
	HRAS-1polR	GGGTCGTATTCGTCCACAA			
Exão 2	HRAS-2F	GATTCCTACCGGAAGCAGGT	140	1,8	60°C
	HRAS-2R	ATGGCAAACACACACAGGAA			

Tabela III - Sequências dos *primers* e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do *locus NRAS*.

<i>Locus NRAS</i>	Nome do <i>Primer</i>	Sequência (5'→3')	Tamanho do segmento (bp)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Hibridação (°C)
Exão 2	NRAS-2F	GGTTTCCAACAGGTTCTTGC	145	1,8	60°C
	NRAS-2R	CTCACCTCTATGGTGGGATCA			
Exão 3	NRAS-3F	CACCCCAGGATTCTTACAG	148	1,8	60°C
	NRAS-3R	TGGCAAATACACAGAGGAAGC			

**Tabela IV** - Sequências dos *primers* e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do *locus KRAS*.

<i>Locus KRAS</i>	Nome do <i>Primer</i>	Sequência (5'→3')	Tamanho do segmento (bp)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Hibridação (°C)
<b>Exão 2</b>	KRAS-2F	TTAACCTTATGTGTGACATGTTCTAAT	175	1,8	60°C
	KRAS-2R	TTGTTGGATCATATTCGTCCAC			
<b>Exão 3</b>	KRAS-3intF	TCAAGTCCTTTGCCCATTTT	376	1,8	60°C
	KRAS-3intR	ATGCATGGCATTAGCAAAGA			

**Tabela V** - Sequências dos *primers* e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do *locus BRAF*.

<i>Locus BRAF</i>	Nome do <i>Primer</i>	Sequência (5'→3')	Tamanho do segmento (bp)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Hibridação (°C)
<b>Exão 15</b>	BRAF-15F	AAACTCTTCATAATGCTTGCTCTG	231	1,5	58°C
	BRAF-15R	GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA			

**Tabela VI** - Sequências dos *primers* e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do *locus C8orf48*.

<i>Locus C8orf48</i>	Nome do <i>Primer</i>	Sequência (5'→3')	Tamanho do segmento (bp)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Hibridação (°C)
<b>Exão 1</b>	C8orf48-1F	GTCTTAACCTGGGCAAAGGA	231	1,2	58°C
	C8orf48-1R	AGTCTGCTTTTCCCTCTCCA			

**Tabela VII** - Sequências dos *primers* e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do *locus PSD3*.

<i>Locus PSD3</i>	Nome do <i>Primer</i>	Sequência (5'→3')	Tamanho do segmento (bp)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Hibridação (°C)
<b>Exão 1</b>	PSD3-3F	TGTGGAATTTCAAGGAGTGG	214	1,2	58°C
	PSD3-3R	TGAAGGAGCTTTCCAGGATT			