



Daniela Ribeiro Bettencourt Félix

Licenciada em Bioquímica

**As GTPases RAC1 e RAC1b na
modulação da expressão do
simportador de sódio e iodo em tecido
tiroideu normal**

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

Orientador: Doutora Ana Luísa Silva,

Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo,
Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte,
E.P.E.



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2017

As GTPases RAC1 e RAC1b na modulação da expressão do simportador de sódio e iodo em tecido tiroideu normal

Copyright Daniela Ribeiro Bettencourt Félix, 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 objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste projeto não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho, não só meus, mas de diversas pessoas. Gostaria de expressar e demonstrar toda a minha gratidão a todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para esta importante etapa da minha vida.

Em primeiro lugar, um especial agradecimento à minha orientadora Doutora Ana Luísa Silva por me ter recebido de braços abertos no seu grupo e por me orientar da melhor maneira possível. Um enorme obrigada por todo o conhecimento transmitido e por ser a pessoa que é. Existem pessoas que realmente nasceram para servirem de exemplo a outras, e sem dúvida que a Ana é um desses casos. Não só em questões profissionais, mas também pessoais. Um exemplo de humildade, competência e dedicação. Apesar de todos os estudos e cargos que tem, nunca mostrou ser mais que ninguém, garantindo sempre um bom ambiente entre a equipa e um bom ambiente de trabalho.

À Rita Domingues pela sua boa disposição e disponibilidade para ajudar sempre que foi necessário. Pelas inúmeras caminhadas pelo edifício e por abrir todas as portas que eu precisei durante o ano.

Às minhas colegas de laboratório Márcia Faria e Joana Dias. Um enorme obrigada à Márcia por toda a disponibilidade e paciência que teve para me orientar e explicar todas as coisas ao pormenor. Sei que não foi fácil e que nós muitas vezes “já tínhamos falado sobre isso”. À Joana por toda a alegria e boa disposição que transmitia, mesmo quando as coisas corriam menos bem. Era impossível haver tristezas naquele laboratório. A ambas muito obrigada por este ano e por todas as conversas que nos fizeram tornar amigas, mesmo que não quissem.

Aos meus amigos de sempre Laia, Mariana, Beatriz, Gutierres, João Ricardo, Dianas, Oksana, Hugo, Rodrigo, Filipa e Nuno por todo o apoio ao longo dos anos. Por nunca me deixarem desistir, por toda a motivação, por todos os momentos bons e por todos os momentos maus. Sei que são verdadeiros.

E, por último, mas não menos importante, à minha família, que não há agradecimento suficiente que faça jus a tudo aquilo que já fizeram por mim. Obrigada por serem um exemplo de força e coragem e por me apoiarem em todas as situações. Merecem tudo mãe, mana, Manel, Bruno, Leonardo e tios.

A todos o meu enorme obrigada. Sem vocês nada disto teria sido possível.

RESUMO

O simportador de sódio e iodo (NIS) é altamente expresso no tecido da tiróide. Uma vez que a expressão de NIS resulta na acumulação de iodeto, a sua expressão em células tumorais permite o uso de iodo radioativo (^{131}I) no diagnóstico e no tratamento da doença. No entanto, os níveis de expressão de NIS e a absorção de iodo no carcinoma de tiróide são reduzidos quando comparados ao tecido normal.

Estudos recentes mostraram que, embora desencadeadas por diferentes vias de sinalização, a estimulação da expressão de NIS envolve a indução da atividade da cinase mitogénica p38 pela GTPase RAC1. O nosso grupo também descreveu recentemente a sobre-expressão de RAC1b (uma variante hiperativa do RAC1) numa série de carcinomas papilares da tiróide, associada à mutação BRAF V600E. Notavelmente, a presença da mutação BRAF V600E tem sido igualmente correlacionada a uma diminuição da expressão do NIS.

O objetivo do presente estudo foi investigar o papel das GTPases RAC1/1b na modulação da expressão do NIS e ainda desenvolver um sistema repórter para estudar e identificar reguladores pós-traducionais deste simportador.

Utilizando como modelo experimental uma linha celular de tiróide normal, os resultados obtidos suportam um papel da sinalização RAC1/1b na regulação da expressão do NIS. RAC1b demonstrou ter um papel na inibição dos níveis de expressão do simportador, enquanto RAC1 demonstrou poder ter um papel na estimulação dos mesmos, ao reduzir a expressão do NIS após a sua inibição e ao induzir a ativação da cinase mitogénica p38.

Este estudo suporta um efeito da sinalização RAC1/1b na regulação da expressão de NIS. A identificação de novos moduladores dos níveis funcionais deste simportador será de extrema relevância para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas co-adjuvantes ao ^{131}I que permitam um aumento da eficiência na captação de iodo por parte das células tumorais.

Palavras-Chave: Simportador de sódio e iodo; RAC1; RAC1b; p38; Iodo radioativo; Tiróide

ABSTRACT

The sodium iodide symporter (NIS) is highly expressed in thyroid tissue. Since the expression of NIS results in the accumulation of iodide, its expression in tumor cells allows the use of radioactive iodine (¹³¹I) as a diagnostic and therapeutic tool.

Recent studies showed that, although triggered by different intracellular signaling pathways, stimulation of NIS expression involves the induction of the p38 mitogenic kinase activity by the GTPase RAC1. Our group has recently described the overexpression of the RAC1b protein (a hyperactive variant of RAC1) in a number of papillary thyroid carcinomas with unfavorable outcome, carrying the activating mutation V600E in the mitogenic kinase BRAF. Notably, the presence of BRAF V600E mutation has been associated with downregulation of NIS.

The aim of the present study was to investigate the role of RAC1/1b GTPases in modulating the expression of the symporter and also to develop a reporter system to study and identify post-translational regulators of this symporter.

Using a normal thyroid cell line, the results obtained support a role for RAC1/1b signaling in the regulation of NIS expression. RAC1b was shown to play a role in inhibiting the expression levels of the symporter, whereas RAC1 seems to exert the opposite effect, since inhibition of endogenous RAC1 decreases the expression of NIS and its overexpression induces the activation of mitogenic p38 kinase.

This study supports a role for RAC1/1b signaling in the regulation of NIS expression. The identification of new modulators of the functional levels of this symporter will be extremely relevant for the development of therapeutic strategies that allow an increase in the efficiency in ¹³¹I uptake by tumor cells.

Key words: Sodium iodide symporter; RAC1; RAC1b; p38; Radioactive iodine; Thyroid

ÍNDICE

Agradecimentos	I
Resumo.....	III
Abstract.....	V
Índice de Figuras	IX
Índice de Tabelas.....	XI
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	XIII
I. Introdução.....	1
1. O cancro	1
2. Glândula da Tiróide	3
2.1. Neoplasias da Tiróide.....	4
2.1.1. Carcinomas Não Medulares da Tiróide.....	6
2.1.1.1. Carcinoma Papilar da Tiróide (CPT)	6
2.1.1.2. Carcinoma Folicular da Tiróide (CFT)	7
2.1.1.3. Carcinoma Pouco Diferenciado da Tiróide (CPDT)	7
2.1.1.4. Carcinoma Anaplásico / Indiferenciado da Tiróide (CAT).....	8
3. Simportador de Sódio e Iodo (NIS)	8
3.1. Caracterização Bioquímica e Funcional.....	9
3.2. Regulação	10
3.2.1. Regulação Transcricional	11
3.2.2. Regulação Pós-Traducional	13
4. Superfamília Ras de GTPases de baixo peso molecular.....	14
4.1. RAC1.....	16
4.2. RAC1b.....	16
5. Relação NIS e RAC1/1b.....	17
6. Terapias com Iodo Radioativo.....	18
7. Objetivos do estudo proposto.....	19
II. Materiais e Métodos	21
1. Construção e clonagem dos vetores de expressão do gene SLC5A5	21
1.1. Construto pNIS_CFP.....	22
1.2. Construto pNIS_HA	22
2. Cultura celular	23
3. Transfecção.....	23
4. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	24
5. PCR (Reação em Cadeia da Polimerase / <i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	24
6. PCR quantitativo (RT-qPCR)	25
7. Extração proteica, Eletroforese SDS-PAGE e <i>Western blot</i>	25
8. Imunofluorescência	26
9. Análise estatística.....	26

III. Resultados.....	27
Parte 1	27
1. Otimização das condições de estimulação da TSH na expressão de NIS	27
2. Efeito da sobre-expressão de RAC1/1b na expressão de NIS	28
3. Efeito da sobre-expressão de RAC1b <i>wt</i> com o inibidor EHT 1864 na expressão de NIS 30	
4. Efeito da sobre-expressão de RAC1/1b na expressão de p38 e fosfo-p38.....	31
Parte 2	32
1. Construção e Validação funcional dos vetores de expressão pNIS_CFP e pNIS_HA ..	32
IV. Discussão de Resultados	35
V. Conclusões e Perspetivas Futuras.....	39
VI. Bibliografia	41
VII. Anexos.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. O microambiente tumoral e características do cancro.	2
Figura I.2. Histologia da glândula da tiróide.	3
Figura I.3. Síntese das hormonas T3 e T4 da tiróide.	4
Figura I.4. Modelo esquemático da estrutura secundária de NIS.	9
Figura I.5. Captação de iodo pelo simportador de sódio/iodo.	10
Figura I.6. Modo de ativação das GTPases da família Rac.	15
Figura I.7. Diagrama do gene RAC1, transcritos alternativos e proteína RAC1b.	16
Figura I.8. Esquema representativo das principais características da GTPase RAC1b.	17
Figura I.9. Níveis de expressão do transcrito NIS.	18
Figura II.10. Esquema representativo do método de construção e clonagem dos vetores de expressão do gene SLC5A5.	21
Figura III.11. Imagens representativas da reação de PCR para amplificação de NIS.	27
Figura III.12. Imagens representativas da reação de PCR para amplificação de RAC1/1b.	28
Figura III.13. Efeito da sobre-expressão de RAC1/1b na regulação da expressão de NIS em células PCCL3.	29
Figura III.14. Efeito da sobre-expressão de RAC1/1b na regulação da expressão de NIS em células PCCL3.	29
Figura III.15. Expressão de RAC1/1b em células PCCL3 transfectadas.	30
Figura III.16. Efeito da sobre-expressão de RAC1b <i>wt</i> com o inibidor EHT 1864 na regulação da expressão de NIS em células PCCL3.	31
Figura III.17. Expressão da cinase mitogénica p38 e fosfo-p38 em células PCCL3 transfectadas.	32
Figura III.18. Modelo esquemático da estrutura secundária de NIS com as marcas peptídicas CFP e 3xHA.	32
Figura III.19. Validação dos construtos pNIS_CFP e pNIS_HA.	34
Figura III.20. Localização subcelular e intensidade dos construtos pNIS_CFP e pNIS_HA.	34

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I.1. Classificação das neoplasias da tiróide.	5
Tabela VII.2. Soluções e concentrações finais para o <i>Western blot</i>	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AFT - Adenoma Folicular da Tiróide

AKT - *Protein kinase B (PKB)*

AMPc - monofosfato cíclico de adenosina

Apo-T - Apo-Transferrina

Arf - *ADP-ribosylation factor*

ATG - codão de iniciação da transcrição

ATPase - Adenosinatrifosfatases

BRAF - *V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1; serine/threonine-protein kinase B-Raf*

CAT - Carcinoma Anaplásico da Tiróide

Cdc42 - *Cell division control protein 42 homolog*

cDNA - DNA complementar

CFT - Carcinoma Folicular da Tiróide

CMT - Carcinoma Medular da Tiróide

CNMT - Carcinoma Não Medular da Tiróide

CO₂ - Dióxido de Carbono

COOH - C-terminal; Terminal Carboxilo

CPDT - Carcinoma Pouco Diferenciado da Tiróide

CPT - Carcinoma Papilar da Tiróide

CRE - *cAMP Response Elements*

CREB - *cAMP Response Element-Binding protein*

CT - Carcinoma da Tiróide

ddH₂O – Água bidestilada

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeo Fosfatado

ECL - *Enhanced chemiluminescence*

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EHT 1864 - Inibidor de RAC1/1b

ERK - *Extracellular Signal-Regulated Kinases*

FBS - *Fetal bovine serum*

g - grama

GAP - *GTPase activating protein*

GDI - *Guanine nucleotide dissociation inhibitor*

GDP - *Guanosine diphosphate*

GEF - *Guanine Exchange Factors*

GTP - *Guanosine triphosphate*

GTPase - *Guanosine triphosphatase*

I⁻ - Ião Iodeto

Ig - *Imunoglobulina*

IGF-1 - *Insulin Growth Factor 1*

K⁺ - Ião Potássio

kDa - *Kilodalton*

L - Litro

L61 - *Mutante constitutivamente ativo*

m – Metro

M – Molar

MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinases*

mm - *Milímetro*

mRNA - *RNA mensageiro*

MTOR - *Mechanistic Target Of Rapamycin*

Na⁺ - Ião Sódio

NH₂ - *N-terminal; Terminal amino*

NIS - *Sodium/iodide symporter*

NUE - *NIS Upstream Enhancer*

PAX8/ PPAR γ - *paired box gene 8 (PAX8) - peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)*

pb - pares de bases

PBF - *PTTG binding factor*

PBS - *Phosphate-buffered saline*

PCR - *Polymerase chain reaction*

PI – *Inorganic Phosphate*

PI3K - *Phosphoinositide 3-kinase*

PKA - *Protein Kinase A*

PTTG1 - *Pituitary Tumor-Transforming Gene-1*

PVDF - Polyvinylidene difluoride

PFA - Paraformaldeído

Rab - *Ras-like proteins in brain*

RAC1 - *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*

RAF - Família de proteínas cinases serina/treonina

Ran - *Ras-like nuclear*

RAS - *Rat Sarcoma vírus*

Rho - *Ras homologous*

RNA - Ácido Ribonucleico

RT-qPCR – PCR quantitativo em tempo real

SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*

SLC5A5 - *Solute Carrier Family 5, Member 5*

T3 - Triiodotironina

T4 – Tetraiodotironina; Tiroxina

TBE - *Tris-borate-EDTA*

TBST - *Tris Buffered Saline Buffer 0,05% Triton X-100*

TSH - Hormona Estimulante da Tiróide - *Thyroid Stimulating Hormone*

Tg - Tiroglobulina

TGF- β - *Transforming Growth Factor Beta*

TPO - Tiroperoxidase

TSHr - *TSH receptor*

U - Unidade

UV - Ultravioleta

V - Volt

wt – *wild-type*

¹³¹I - Iodo Radioativo

³⁵S - Isótopo de enxofre 35

°C – Graus centígrados

μ - Micro

% (p/v) - Concentração expressa em peso por volume

% (v/v) – Concentração expressa em volume por volume

I. INTRODUÇÃO

1. O cancro

O cancro é uma doença complexa que pode ter origem em virtualmente qualquer tipo celular, resultante do crescimento celular anormal e envolvendo inúmeras mudanças na fisiologia celular (Seyfried & Shelton, 2010; Cooper, 2000). Desde há muitos anos que se tenta encontrar uma explicação para o processo biológico pelo qual as células normais são transformadas em células malignas, mas a longa e frustrante pesquisa sobre o cancro pareceu fornecer pouco sobre o assunto nas primeiras décadas do século XX (Klausner, 2002; Macconail & Garraway, 2010). No entanto, nos últimos anos, vários avanços científicos ocorreram na área da investigação do cancro, permitindo que a comunidade científica compreendesse melhor os mecanismos biológicos envolvidos na génese dos tumores – tumorigénese (Sahai & Marshall, 2002).

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, em 2012, cerca de 8.2 milhões de pessoas morreram de cancro em todo o mundo, sendo esta uma das principais causas de morte.

Após um quarto de século de avanços rápidos, a pesquisa do cancro gerou um vasto conhecimento, revelando a transformação maligna como um processo que envolve mudanças dinâmicas no genoma. Estas têm por base alterações que por um lado produzem oncogenes com ganho dominante de função e, por outro lado levam à perda recessiva de função de genes supressores de tumores (Hanahan & Weinberg, 2000).

A aquisição do fenótipo maligno por parte de uma célula normal é um processo complexo que se desenvolve em várias etapas. Para a maioria dos tumores humanos, há um intervalo de cerca de 20 anos entre a exposição ao agente carcinogénico e a deteção clínica do tumor (Loeb, Loeb & Anderson, 2003). Durante esse período, as células cancerígenas adquirem a capacidade de se dividir desreguladamente, invadir e metastatizar. Mutações em genes de estabilidade genética, tais como genes de reparação de DNA, podem levar à instabilidade genética, iniciando uma série de alterações no genoma da célula que acabam por estabelecer o fenótipo maligno (Ashkenazi, Gentry, & Jackson, 2008; Loeb et al., 2003).

Atualmente, são dez as principais características do cancro universalmente reconhecidas: imortalidade replicativa, capacidade de contrariar estímulos supressores de crescimento, capacidade de resistir à apoptose, capacidade de ativar a invasão e a metastização, capacidade de estimular a angiogénese, capacidade de sustentar a sinalização proliferativa, reprogramar o metabolismo energético e a capacidade de evasão ao sistema imunitário. Subjacente a estas características estão ainda a instabilidade no genoma e a inflamação que promovem a aquisição das alterações genéticas causadoras do fenótipo maligno (Figura I.1.) (Hanahan & Weinberg, 2011; Serpa & Dias, 2011; Wang et al., 2017).



Figura I.1. O microambiente tumoral e características do cancro.
Adaptado de Hanahan & Weinberg (2011).

Na realidade, as células tumorais têm um metabolismo alterado em relação às células normais, gerando um “microambiente tumoral” (Serpa & Dias, 2011; Wang et al., 2017). O aumento do potencial proliferativo das células tumorais requer taxas mais altas de reações metabólicas para obter nutrientes, energia e atividade biossintética. Este fenótipo permite que as células tumorais tenham uma taxa de glicólise aumentada (conversão de glicose em piruvato), seja em condições aeróbicas ou anaeróbicas (Tennant, Durán, Boulahbel, & Gottlieb, 2009).

Ao longo da progressão tumoral, ocorre diversificação e evolução genética. Esta situação deve-se em parte aos níveis de replicação desregulados de DNA. Outros mecanismos que contribuem para a diversificação dos clones malignos incluem o tecido e genótipo da célula em que o processo de transformação é iniciado, a idade do indivíduo e numerosos fatores ambientais (Balani, Nguyen, & Eaves, 2017; Seyfried & Shelton, 2010).

Não há dúvida de que a tumorigênese é um processo dinâmico que depende de um grande número de variáveis e é regulado em múltiplas escalas. Ver o cancro como um sistema que é dinamicamente complexo pode ajudar a esclarecer conceitos, iniciar experiências alternativas, interpretar dados e categorizar o conhecimento adquirido com base nas semelhanças e/ou comportamentos compartilhados por diferentes tipos tumorais (Grizzi et al., 2006).

2. Glândula da Tiróide

A glândula da tiróide faz parte do sistema endócrino e é um órgão altamente vascularizado em forma de borboleta, constituído por dois lóbulos, posicionados em ambos os lados da traqueia, ligados por uma estreita ponte de tecido tiroideu denominada istmo. A tiróide é uma das maiores glândulas endócrinas do corpo tendo um peso de aproximadamente 15 a 25 g, apesar de o seu tamanho e aparência variar consoante a atividade funcional, género, estado hormonal e consumo de iodo (Muro-Cacho & Ku, 2000; Nussey & Whitehead, 2001).

Ao contrário das restantes glândulas endócrinas que armazenam pequenas quantidades de hormonas nos compartimentos intracelulares, a tiróide possui a capacidade de armazenar grandes quantidades de hormonas sob a forma inativa, dentro dos compartimentos extracelulares (no centro dos folicúlos) (Ellis, 2003).

Esta glândula é composta por dois tipos de células distintos (Seeley, Stephens & Tate, 2003) produtoras de hormonas (Figura 1.2.): as células parafoliculares ou células C, produtoras de calcitonina, fundamental na regulação do cálcio, e as células foliculares, produtoras das principais hormonas da tiróide, triiodotironina (T3) e tetraiodotironina ou tiroxina (T4), essenciais para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência dos vertebrados. Estas últimas também são responsáveis pela absorção de iodo (Lopes et al., 2012).

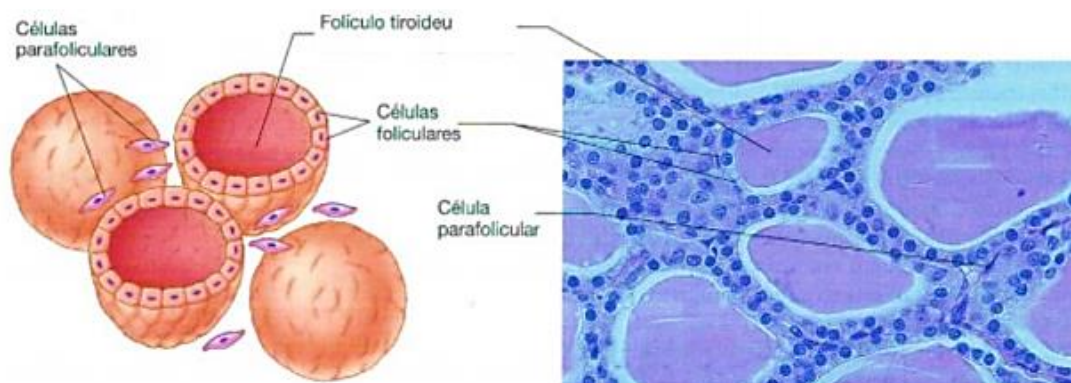


Figura 1.2. Histologia da glândula da tiróide. Adaptado de Seeley et al. (2003).

A produção das hormonas T3 e T4 nas células foliculares e posterior libertação na circulação sistémica, em resposta à hormona estimulante da tiróide (TSH – *Thyroid Stimulating Hormone*), requer a integridade de um complexo sistema proteico e diversos passos sequenciais (Filetti et al., 1999a; Pinto, Áreas, Marialva, & Cardoso, 2010).

Tendo em conta a estrutura química das hormonas tiroideias T3 e T4 (3 átomos e 4 átomos de iodo, respetivamente), é indispensável a presença de iodo no organismo, principalmente na tiróide, para a sua síntese nas células foliculares. Inicialmente, os iões iodeto (I⁻) são captados

pelo simportador de sódio e iodo (NIS). Simultaneamente dá-se a secreção da molécula precursora de hormonas da tiróide, a tiroglobulina (Tg) por exocitose para o lúmen do tecido tiroideu, onde ocorre a síntese das hormonas. Seguidamente, na presença de tiroperoxidase (TPO) e peróxido de hidrogénio, o iodeto é oxidado a iodo e incorporado na Tg (Dohán et al., 2003; Kogai, Taki, & Brent, 2006). Após este processo, T3 e T4 são armazenadas em grandes quantidades no interior dos folículos, como componentes da Tg, até ser necessário o seu transporte para as células foliculares, através da fusão de lisossomas com vesículas endocíticas, onde a molécula precursora irá sofrer hidrólise e libertar as hormonas da célula (Figura I.3.) (Dohán et al., 2003; Pinto et al., 2010).

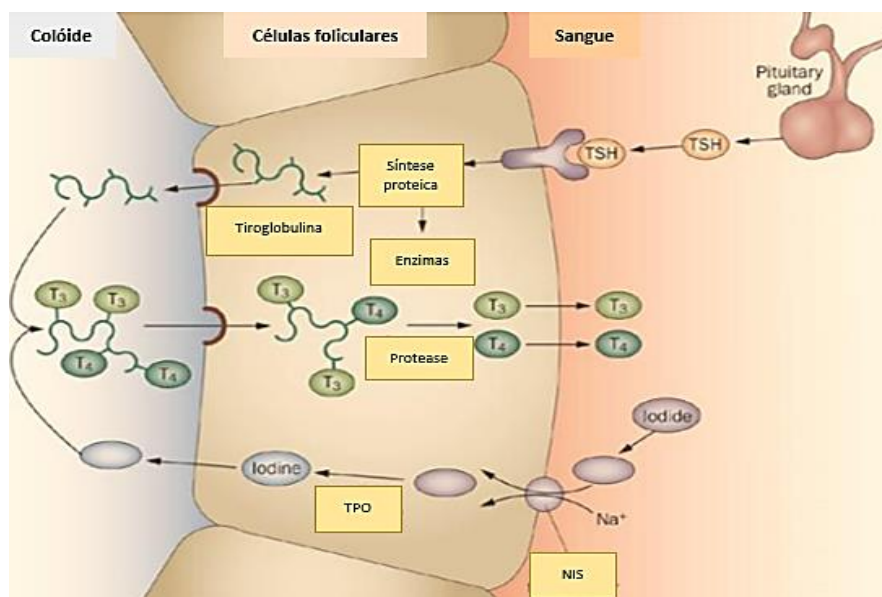


Figura I.3. Síntese das hormonas T3 e T4 da tiróide. Adaptado de Cohen-lehman, Dahl, Danzi, & Klein (2009).

2.1. Neoplasias da Tiróide

A glândula da tiróide, semelhante a todos os outros órgãos do corpo, está sujeita a uma multiplicidade de doenças e síndromes, que provocam o seu mal funcionamento, como por exemplo a doença de Graves, o hipertiroidismo, o hipotiroidismo, as tiroidites e as neoplasias malignas (Muro-Cacho & Ku, 2000).

O cancro da tiróide é a neoplasia endócrina mais comum (cerca de 90%), é mais prevalente no sexo feminino, e apesar da grande maioria dos nódulos da tiróide serem benignos, surgem anualmente, em Portugal, cerca de 400 novos casos de cancro da tiróide (<https://advancecare.pt/glossario/cancro-da-tiroide>). Embora representando apenas 1% de todas as patologias oncológicas registadas no nosso país, a sua incidência tem vindo a aumentar, à semelhança de outros países desenvolvidos, como nos Estados Unidos, onde se estima que ocorram cerca de 33 550 novos casos por ano (Dotto & Nosé, 2008).

A exposição à radiação, a desregulação hormonal, uma dieta deficiente em iodo ou outros fatores ambientais ou genéticos estão entre os fatores que aumentam a probabilidade do desenvolvimento das neoplasias da tiróide (DeLellis, Lloyd, Heitz & Eng, 2004).

Apesar de tudo, estas neoplasias respondem geralmente bem à terapêutica e estão associadas a uma taxa elevada de sobrevivência. O bom prognóstico associado à maior parte dos carcinomas da tiróide pode ser explicado pela baixa taxa de proliferação celular, e está também provavelmente relacionado com a existência de protocolos terapêuticos eficazes (DeLellis, Lloyd, Heitz & Eng, 2004). A terapia padrão para a maioria dos carcinomas da tiróide é a tireoidectomia total. Classicamente, o iodo radioativo (^{131}I) é a terapêutica adjuvante da cirurgia no contexto de carcinoma diferenciado da tiróide de origem folicular, permitindo a destruição de tecido tiroideu restante, pós tireoidectomia (Soares et al., 2014; Chung, Youn, Kang, Lee, & Kang, 2010; Nguyen et al., 2015). No entanto, existem casos refratários ao iodo radioativo, muitas vezes associados a formas avançadas da doença e intimamente relacionados com a mortalidade nesta patologia. Estas situações colocam problemas práticos importantes no que respeita à gestão clínica destes doentes (Arturi et al., 1998; Chung et al., 2010).

As neoplasias da tiróide podem ser subdivididas em diferentes grupos com características notavelmente diferentes. Primeiramente, é possível distinguir lesões benignas, designadas por adenomas (adenomas foliculares da tiróide – AFT), de lesões malignas, denominadas carcinomas (CT- carcinomas da tiróide) (Muro-Cacho & Ku, 2000). Existe também uma segunda divisão baseada no tipo de células a partir das quais os tumores se desenvolvem: os carcinomas com origem nas células parafoliculares ou células C, designados carcinomas medulares da tiróide (CMT), que representam de 3 a 5% dos casos, podendo ser esporádicos (75%) ou com predisposição hereditária (25%), e os carcinomas com origem nas células foliculares, denominados carcinomas não medulares da tiróide (CNMT), representando 95% dos casos. A grande maioria dos CNMT são bem diferenciados e classificados como papilares (carcinomas papilares da tiróide – CPT) ou foliculares (carcinomas foliculares da tiróide – CFT). Uma minoria dos CNMT podem apresentar um fenótipo pouco diferenciado (carcinomas pouco diferenciados da tiróide – CPDT) ou um fenótipo indiferenciado (carcinomas anaplásicos da tiróide – CAT) (DeLellis, Lloyd, Heitz & Eng, 2004; Muro-Cacho & Ku, 2000; Maciel, 1998).

Tabela I.1. Classificação das neoplasias da tiróide.

Tumores derivados das células parafoliculares	Tumores derivados das células foliculares
Carcinoma medular da tiróide (3% - 5%) – CMT	Adenoma folicular da tiróide – AFT Carcinoma papilar da tiróide (≈ 80%) – CPT Carcinoma folicular da tiróide (5% - 15%) – CFT Carcinoma pouco diferenciado da tiróide (<10%) – CPDT Carcinoma anaplásico da tiróide (<5%) – ATC

Neste projeto iremo-nos focar nos carcinomas não medulares da tiróide (CNMT), derivados das células foliculares, pois são aqueles para os quais a terapia com iodo radioativo é aplicável devido à capacidade de absorção de iodo por parte destas células, como já foi referido anteriormente.

2.1.1. Carcinomas Não Medulares da Tiróide

Conforme referido anteriormente, os carcinomas não medulares da tiróide têm origem nas células foliculares e representam cerca de 95% de todas as neoplasias da tiróide. As lesões podem ser agrupadas em concordância com o grau de diferenciação de células foliculares: carcinomas bem diferenciados, carcinomas pouco diferenciados e carcinomas anaplásicos. O grupo dos carcinomas bem diferenciados é composto por dois tipos histológicos diferentes de tumores: papilares e foliculares (Muro-Cacho & Ku, 2000; Maciel, 1998; DeLellis, Lloyd, Heitz & Eng, 2004). Normalmente, os tumores com uma menor diferenciação são geralmente mais agressivos e também associados a um mau prognóstico. Embora essas patologias possam surgir de novo, alguns estudos apoiam a hipótese de que carcinomas bem diferenciados podem dar origem a formas pouco diferenciadas ou anaplásicas, através de um processo gradual de desdiferenciação (Muro-Cacho & Ku, 2000).

2.1.1.1. Carcinoma Papilar da Tiróide (CPT)

O CPT é a forma mais comum de carcinoma bem diferenciado da tiróide, representando cerca de 80% de todos os carcinomas (DeLellis, Lloyd, Heitz & Eng, 2004; Aboelnaga & Ahmed, 2015; <http://emedicine.medscape.com/article/282276-overview>). Esta classe de tumores está associada a um bom prognóstico e a taxas de sobrevivência a longo prazo elevadas, devido a uma combinação de tratamento com iodo radioativo e levotiroxina, após tiroidectomia total. No entanto, cerca de 10% dos pacientes, com carcinomas em estado avançado possui neoplasias refratárias e não responsivas ao iodo radioativo, o que pode tornar a doença fatal, evoluindo com metástases para outros tecidos (Durante et al., 2006; Kogai & Brent, 2012).

Este carcinoma é mais comum em mulheres e em pacientes jovens, entre os 20 e 50 anos (DeLellis, Lloyd, Heitz & Eng, 2004). A maioria das lesões papilares são massas firmes com dimensões que variam de menos de 1 mm a vários centímetros. As papilas proeminentes são uma característica específica deste tipo de carcinoma, como o alargamento, a forma oval, o alongamento e a sobreposição dos núcleos (DeLellis, Lloyd, Heitz & Eng, 2004). Além da forma clássica de CPT, podem ser distinguidas diversas variantes morfológicas, com base nos padrões de crescimento específico, tipos de células e alterações a nível do estroma (Muro-Cacho & Ku, 2000).

O CPT é influenciado por fatores ambientais, genéticos e hormonais. Diferentes alterações genéticas, incluindo rearranjos cromossómicos, muitas vezes decorrentes da exposição a radiação e mutações pontuais nos genes *BRAF* e *RAS* da via de sinalização MAPK (*Mitogen*

Activated Protein Kinases) têm sido associadas ao desenvolvimento de carcinomas papilares (DeLellis, Lloyd, Heitz & Eng, 2004).

2.1.1.2. Carcinoma Folicular da Tiróide (CFT)

O CFT é o segundo subtipo mais frequente de CNMT e representa aproximadamente 10 a 15% de todos os CT (<http://emedicine.medscape.com/article/278488-overview>; Muro-Cacho & Ku, 2000). Forma nódulos solitários bem delimitados e encapsulados, sendo microscopicamente semelhantes aos adenomas foliculares (DeLellis, Lloyd, Heitz & Eng, 2004). O grau de invasão da cápsula e dos vasos sanguíneos (crescimento infiltrativo) é uma característica distintiva entre os carcinomas foliculares e adenomas foliculares (Maciel, 1998).

Tal como os CPT, os carcinomas foliculares são mais frequentes nas mulheres do que nos homens e também podem ser divididos em diferentes variantes. Em regiões não deficientes em iodo, o carcinoma folicular constitui 5 a 15% de todas as malignidades da tiróide. Em regiões deficientes em iodo, no entanto, a incidência relativa atinge 30 a 40% de todos os CT. Do ponto de vista morfológico e prognóstico, o carcinoma folicular é dividido em duas categorias principais com base no grau de invasão: minimamente invasivo e amplamente invasivo (Muro-Cacho & Ku, 2000). Considerado mais agressivo que o carcinoma papilar, o carcinoma folicular tende a disseminar-se através da corrente sanguínea, originando metástases em diferentes zonas do organismo. O tratamento do CFT, à semelhança do CPT passa pela remoção da tiróide e a subsequente destruição do tecido tiroideu remanescente, incluindo as metástases, com iodo radioativo (Aboelnaga & Ahmed, 2015).

As mutações genéticas mais comuns associadas a CFT (70-75% dos casos) são mutações pontuais no gene *RAS* (*H-RAS*, *K-RAS* e *N-RAS*), presente na via *MAPK*, e rearranjos *PAX8/PPAR γ* (Nikiforov & Nikiforova, 2011).

2.1.1.3. Carcinoma Pouco Diferenciado da Tiróide (CPDT)

O carcinoma pouco diferenciado da tiróide é uma forma rara que representa menos de 10% de todos os CNMT. É uma neoplasia originada a partir de células foliculares, que representa um comportamento morfológico e biológico intermédio entre carcinomas da tiróide bem diferenciados e carcinomas anaplásicos da tiróide (Muro-Cacho & Ku, 2000).

Os carcinomas da tiróide são considerados pouco diferenciados quando começam a perder as funções de captação de iodeto e a dependência de TSH para o crescimento e produção de proteínas específicas da tiróide, como o NIS e a Tg (Graf, 2005). Como referido anteriormente, os tumores com uma menor diferenciação são geralmente mais agressivos e também associados a um mau prognóstico. As taxas de sobrevivência deste tipo de carcinomas são baixas, devido à ocorrência frequente de metástases (DeLellis, Lloyd, Heitz & Eng, 2004; Soares et al., 2011).

Estudos documentaram as mutações no gene *RAS* e no gene supressor de tumores *p53* como as alterações genéticas mais frequentes nos CPDT. A mutação no gene *BRAF* também está presente em alguns casos, apoiando a hipótese de uma transição de carcinomas bem diferenciados para carcinomas pouco diferenciados (Kondo, Ezzat & Asa, 2006).

2.1.1.4. Carcinoma Anaplásico / Indiferenciado da Tiróide (CAT)

O carcinoma anaplásico é um tumor altamente maligno composto por células parcialmente ou totalmente indiferenciadas. Este tipo de lesão representa menos de 5% de todos os casos de CNMT, sendo a forma menos comum (Muro-Cacho & Ku, 2000; DeLellis, Lloyd, Heitz & Eng, 2004). Os CAT são altamente agressivos e letais na maioria dos casos, apresentando uma taxa de sobrevivência muito baixa – o tempo de sobrevivência mais longo é cerca de 2.5 anos (Muro-Cacho & Ku, 2000). É caracteristicamente um tumor com prevalência em indivíduos com idade média no momento do diagnóstico inicial de 60 a 65 anos, havendo uma maior frequência em mulheres (Muro-Cacho & Ku, 2000; Kondo, Ezzat & Asa, 2006). As mutações no gene supressor de tumores *p53* são conhecidas como os eventos genéticos mais comuns neste tipo de carcinomas (Soares et al., 2011; (Muro-Cacho & Ku, 2000; Kondo, Ezzat & Asa, 2006).

3. Simportador de Sódio e Iodo (NIS)

A capacidade de absorção de iodeto pelas células da tiróide é conhecida há mais de um século, quando o iodo foi utilizado para prevenir e tratar casos de bócio, que ocorriam em regiões carentes em iodo (Darrouzet et al., 2014; Wartofsky & Nostrand, 2006). No entanto, a identidade molecular do transportador de iodeto foi determinada apenas em 1996, primeiramente em ratos e, posteriormente, nos humanos, murganhos e porcos. A proteína foi designada por simportador de sódio e iodo (NIS) (Darrouzet et al., 2014; Dai, Levy & Carrasco, 1996).

O simportador de sódio e iodo, também designado por NIS ou SLC5A5 (transportador de solutos família 5, membro 5 - *solute carrier family 5, member 5*), está codificado no gene *SLC5A5* e é uma glicoproteína responsável pela absorção de iodo nas células foliculares da tiróide, fundamental para a biossíntese de hormonas tiroideias (Darrouzet et al., 2014; Kogai & Brent, 2012; Kogai et al., 2012).

Apesar de a tiróide ser o principal órgão que expressa NIS, a expressão deste simportador está igualmente presente noutros tecidos, embora em níveis menos elevados. São exemplos disso as glândulas mamárias lactante, a glândula salivar, a mucosa gástrica e o rim (Darrouzet et al., 2014; Dohán et al., 2003).

Uma vez que o NIS permite a acumulação de iodo nas células, a sua expressão em células cancerígenas possibilita a aplicação diagnóstica e terapêutica de substratos radioativos de NIS, como o ¹³¹I (Darrouzet et al., 2014; Kogai & Brent, 2012; Wapnir et al., 2004).

3.1. Caracterização Bioquímica e Funcional

NIS é uma glicoproteína intrínseca da membrana plasmática com 13 domínios transmembranares, com o terminal COOH intracelular e o terminal NH₂ extracelular (Figura I.4.) (Vieja, Dohan, Levy & Carrasco, 2000).

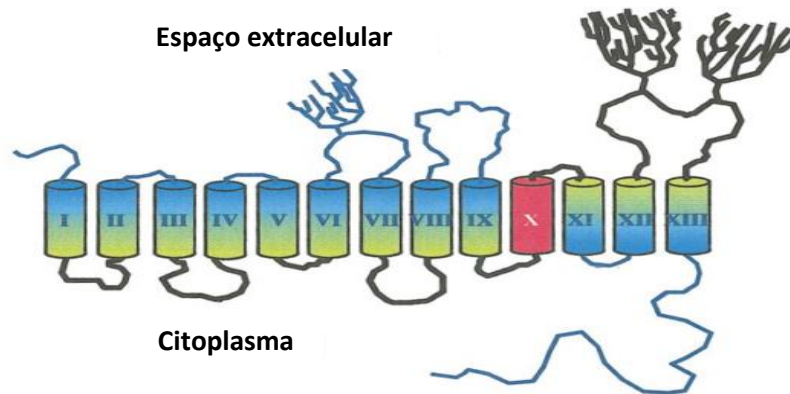


Figura I.4. Modelo esquemático da estrutura secundária de NIS. Adaptado de Vieja, Dohan, Levy & Carrasco (2000).

O gene *SLC5A5* está localizado no cromossoma 19p12-13.2 e codifica uma glicoproteína de 643 aminoácidos, com um peso molecular variável entre 70 a 90 kDa, devido a modificações pós-traducionais como glicosilação (Darrouzet et al., 2014; Dohán et al., 2003).

A proteína NIS é considerada uma glicoproteína porque possui 3 potenciais locais de glicosilação (as asparaginas nas posições 225, 485 e 497) (Darrouzet et al., 2014; Dohán et al., 2003). Para elucidar a biogénese do NIS, Levy e seus colaboradores (1997) realizaram experiências na linha celular FRTL-5, derivada de células de tireóide normal de rato, fazendo marcação da síntese proteica com ³⁵S metionina/cisteína seguida de imunoprecipitação com o anticorpo anti-NIS. Os resultados demonstraram que o NIS é inicialmente sintetizado como uma proteína precursora que posteriormente sofre glicosilação no retículo endoplasmático. A proteína vai lentamente adquirindo a sua forma madura e, 12 horas após a glicosilação, pode-se verificar o transporte ativo de I⁻, indicando que o NIS atingiu a forma funcional e está inserido na membrana plasmática dos tireócitos (células epiteliais foliculares secretoras) (Dohán et al., 2003). No entanto, experiências em que foram induzidas alterações na sequência nativa do NIS com o objetivo de abolir ou de apenas permitir a glicosilação parcial deste simportador, mostraram que a meia-vida da proteína não glicosilada é semelhante à do NIS selvagem, indicando que a função e a estabilidade do NIS estão preservadas, tanto na proteína parcialmente glicosilada quanto naquela em que a glicosilação está ausente (Levy et al., 1998; Pinto et al., 2010).

Na tireóide, a TSH é a principal hormona reguladora da atividade e da expressão do NIS. No entanto, em tecidos extratiroideus que expressam NIS, a TSH não tem efeito sobre a captação de I⁻ (Pinto et al., 2010).

A TSH é uma glicoproteína de aproximadamente 30 kDa, sintetizada na hipófise anterior e é a principal reguladora da função hormonal da tireóide. A hormona estimulante da tireóide regula a captação de iodo via AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) de duas formas: 1) através do aumento na transcrição do NIS – estudos demonstraram que a estimulação com TSH aumenta a expressão de mRNA de NIS, tanto em tireócitos humanos, como nas linhas celulares de tireócitos de rato PCCL3 e FRTL-5 (Filetti et al., 1999; Kogai et al., 1997; Trapasso et al., 1999); 2) através da indução na atividade de NIS – estudos demonstram que após privação de TSH há diminuição da proteína NIS na membrana plasmática, permanecendo esta preferencialmente no citoplasma, num estado não funcional (Filetti et al., 1999; Riedel, Levy, & Carrasco, 2001). Estes resultados sugerem que a TSH interfere na expressão de NIS tanto a nível transcricional como a nível pós-traducional.

Também foi demonstrado o papel de diversas vias de sinalização na modulação da expressão do NIS. Dois exemplos clássicos são as vias PI3K-AKT-MTOR e MAPK, implicadas na regulação negativa da expressão do simportador (ver adiante). Mutações ativadoras nos componentes destas vias que levam à ativação constitutiva das mesmas são frequentes nos carcinomas da tireóide de origem folicular, podendo isto contribuir para os baixos níveis de expressão de NIS observada nos carcinomas relativamente ao tecido normal (Kleiman et al., 2013; Kogai et al., 2008).

3.2.1. Regulação Transcricional

A regulação transcricional da expressão de NIS é complexa e envolve diferentes regiões reguladoras. A nível da transcrição, a TSH é a principal reguladora da função hormonal tiroideia, através do AMPc. Primeiramente a TSH liga-se aos seus recetores, associados às proteínas G e, de seguida induz a ativação da enzima adenilato ciclase, aumentando os níveis intracelulares de AMPc. Por sua vez, pode ocorrer a ativação do fator de transcrição CREB (*cAMP Response Element-Binding protein*) que se ligará ao CRE (*cAMP Response Elements*). No entanto, esta situação pode não ocorrer e, em vez disso, o aumento de AMPc pode ser seguido pela ativação da cinase PKA (*Protein Kinase A*) levando à ativação do fator de transcrição Pax8 (*Paired Box Gene 8*) após fosforilação do AMPc (Dohán et al., 2003; Kogai & Brent, 2012).

CREB e Pax8 ligam-se ao *enhancer* NUE (*NIS Upstream Enhancer*) influenciando a sua atividade, que é essencial para iniciar a transcrição de NIS. NUE está localizado, no genoma humano, 9242 a 9300 pares de bases a montante do codão de iniciação ATG e a sua sequência é conservada em várias espécies (Kogai & Brent, 2012; Kogai et al., 2006).

Pax8 é um fator de transcrição chave para o desenvolvimento e diferenciação da tireóide. A transcrição de genes envolvidos no desenvolvimento e na função celular da tireóide, incluindo

TSHr (*TSH receptor*), Tg, TPO e NIS, depende da atividade de Pax8 (Matsuo et al., 2004). A ligação do Pax8 ao NUE, em resposta à estimulação do TSH, é o principal requisito para ativação significativa de NUE (Kogai & Brent, 2012). Por outro lado, estudos recentes demonstram a regulação de NUE nas células da tiróide por mecanismos independentes de TSH que afetam a ligação Pax8 a NUE, como por exemplo o proto-oncogene PTTG1 (*Pituitary Tumor-Transforming Gene-1*), que regula negativamente NUE (Kogai & Brent, 2012).

Como já foi dito anteriormente, existem diversas vias de sinalização capazes de reduzir a expressão do NIS. Em vários tipos de células, a estimulação do PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) resulta na ativação a jusante de MTOR (*Mechanistic Target Of Rapamycin*), uma proteína cinase serina-treonina, que é um regulador crítico do metabolismo celular, crescimento e proliferação.

A via PI3K/MTOR pode ser ativada em resposta a diferentes estímulos, contrariando o efeito estimulatório na expressão do NIS induzido pela TSH (Garcia & Santisteban, 2002; Kogai et al., 2008). A insulina, tal como o fator de crescimento IGF-1 (*Insulin Growth Factor 1*), mediados pela via PI3K, diminuem significativamente a expressão de NIS (Garcia & Santisteban, 2002; Kogai et al., 2008). Foi igualmente observado que o tratamento das células com o inibidor específico de PI3K, LY294002, leva ao aumento da expressão funcional do NIS tanto na linha celular FRTL-5, aumentando a captação de iodeto (Garcia & Santisteban, 2002; Kogai et al., 2008), como em linhas celulares de carcinoma papilar da tiróide (Souza et al., 2010). Por sua vez, PI3K ativa também, a jusante, o efector AKT. A utilização de um inibidor seletivo de AKT aumentou modestamente a expressão de mRNA de NIS em células FRTL-5 na presença de TSH, mas não aumentou significativamente a captação de iodeto, ao contrário da situação anterior (Kogai et al., 2008). Foi também demonstrado que a ativação de MTOR está envolvida na regulação da proliferação de tireócitos pela TSH e a sua inibição através de rapamicina aumenta a absorção de iodeto na linha celular PCCL3 estimulada por TSH (Souza et al., 2010).

Alterações na ativação da via canónica RAS/RAF/MEK/ERK, da via de sinalização MAPK, são consideradas como tendo um papel fundamental na carcinogénese da tiróide (Bhajee & Nikiforov, 2011). BRAF é uma cinase serina/treonina da família de proteínas RAF e é considerada um forte ativador da via MAPK (envolvido na regulação de várias respostas celulares). A mutação BRAF V600E (substituição de uma valina por um ácido glutâmico na posição 600) é a alteração genética mais frequente em carcinomas papilares da tiróide. Esta mutação é responsável por ativar constitutivamente a cinase BRAF, que induz uma estimulação prolongada da via MAPK, resultando num aumento da proliferação celular e diminuição da apoptose (Davies et al., 2002). Numerosos estudos reportam a associação entre a presença da mutação BRAF V600E e uma diminuição ou perda de expressão de NIS (Riesco-Eizaguirre et al., 2009; Zhang et al., 2014). A mutação em BRAF induz a secreção do fator de crescimento TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*) nas células dos carcinomas da tiróide, estando associado à invasão tumoral, à estimulação da mobilidade celular e à supressão da expressão de NIS, não permitindo que este se localize na membrana das células tiroideias, reduzindo significativamente a absorção de iodeto, influenciado pela diminuição da expressão do fator transcricional Pax8 (Costamagna, García &

Santisteban, 2004; Kogai & Brent, 2012; Kogai et al., 2008; Riesco-Eizaguirre et al., 2009). Foi igualmente demonstrado, através de ensaios *in vitro*, que inibição da via MAPK ou o silenciamento de expressão BRAF V600E podia restaurar uma expressão de NIS em linhas celulares da tiróide (Kleiman et al., 2013). Esta descoberta teve implicações terapêuticas importantes por possibilitar a manipulação da via MAPK visando a restauração da expressão de NIS e a capacidade de captação de ¹³¹I em tumores refratários. Um ensaio clínico recente veio reforçar esta hipótese, tendo-se demonstrado que a utilização de Selumetinib (um inibidor da via de MAPK) como co-adjuvante na terapêutica com ¹³¹I, produziu um aumento clinicamente significativo na captação e retenção de iodo num subgrupo de doentes com carcinoma da tiróide metastático, refratário ao iodo radioativo (Ho et al., 2013).

Se por um lado as vias PI3K/MTOR e MAPK estão envolvidas na redução da expressão funcional do NIS, por outro lado, a via RAC1/p38 parece estar envolvida na sua estimulação (Kogai & Brent, 2012; Kogai et al., 2012; Pomerance et al., 2000). Este tema encontra-se desenvolvido adiante no ponto 6. “Relação NIS e RAC1/1b”.

3.2.2.Regulação Pós-Traducional

A função celular do NIS na captação de iodeto depende da sua correta localização à superfície celular, na membrana basolateral (Darrouzet et al., 2014). Os mecanismos de regulação pós-traducionais, especialmente o transporte do NIS para a membrana, são de grande relevância na funcionalidade do NIS e, por isso, propostos como potenciais alvos de intervenção terapêutica para aumentar a absorção de iodo em células cancerígenas (Kogai & Brent, 2012).

A expressão diminuída de mRNA de NIS nalguns tecidos de carcinomas diferenciados da tiróide, sugerem uma falha ao nível da regulação transcricional do NIS. No entanto, vários estudos relatam a expressão abundante de NIS em carcinomas diferenciados da tiróide (Dohán et al., 2003), sendo que essa mesma expressão parece ser predominantemente intracitoplasmática e escassa na membrana celular. Assim, uma falha na translocação do NIS para a superfície da membrana celular foi proposto como um dos mecanismos responsáveis pela deficiente acumulação de iodo nos carcinomas (Kogai & Brent, 2012).

A fosforilação, um mecanismo celular comum na modulação da atividade, localização subcelular e degradação de diferentes proteínas, foi recentemente relatado como um mecanismo pós-traducional regulador da atividade de vários transportadores. O NIS contém vários resíduos de serina que constituem potenciais locais de fosforilação, como foi referido anteriormente. Assim, sugere-se que a fosforilação seja um importante fator envolvido na regulação ao nível traducional do NIS (Dohán et al., 2003).

O NIS contém vários padrões proteicos na região C-terminal que, em outras proteínas de membrana, estão envolvidos na direção, retenção e endocitose da membrana plasmática, tornando-se assim potenciais reguladores (Dohán et al., 2003). Um desses exemplos é a sequência PDZ, implicada na interação proteína-proteína, através do reconhecimento do mesmo

domínio presente noutras proteínas, impedindo a sua internalização na superfície das células epiteliais polarizadas. O NIS apresenta ainda um motivo dileucina, o qual interage com a proteína clatrina, permitindo a incorporação seletiva de proteínas integrais de membrana em vesículas revestidas que as transportam para diferentes destinos dentro da célula. (Ahn, 2012; Dohán et al., 2003; Pinto et al., 2010).

Apesar de vários estudos demonstrarem que o estado de glicosilação não interfere na função e na estabilidade do NIS na tiróide, o mesmo não acontece nos tecidos extratiroideus. Estudos relatam que PI3K leva ao aumento das formas não glicosiladas de NIS podendo assim regular a translocação de NIS, através da modulação do seu estado de glicosilação, em células de carcinoma da mama. A abolição dos locais de glicosilação do NIS leva à redução da absorção de iodeto, provavelmente devido à redução da expressão de NIS na membrana celular (Kogai & Brent, 2012; Pinto et al., 2010).

PBF (*PTTG binding factor*), um dos reguladores de NUE, também foi caracterizado como uma proteína que interage com o NIS no citoplasma (Smith et al., 2009). Smith e seus colaboradores demonstraram que a expressão exógena de PBF reduz significativamente a absorção de iodeto e a expressão de NIS na superfície celular, sugerindo ser um regulador do transporte do NIS para a membrana.

Para além da sua função na regulação transcricional, a TSH parece ter um papel chave na regulação da absorção de iodo ao nível traducional, nas células normais da tiróide. Estudos recentes demonstram que, se a TSH estiver ausente, o NIS pode ser reconduzido da membrana basolateral da célula para o citoplasma onde deixa de ser funcional, com consequente redução de absorção de iodeto (Kogai & Brent, 2012; Riedel et al., 2001).

Os mecanismos subjacentes à falha na correta localização membranar do NIS em células de carcinoma da tiróide permanece por esclarecer. Portanto, torna-se de extrema importância o desenvolvimento de sistemas repórter para estudos pós-traducionais, com o objetivo de se superar as limitações técnicas na deteção de NIS devidas à sua expressão ser essencialmente baixa nos carcinomas da tiróide e tornar a deteção e localização subcelular do NIS sensível e específica.

4. Superfamília Ras de GTPases de baixo peso molecular

A superfamília Ras é uma superfamília proteica de guanosina trifosfato hidrolases (GTPases) de baixo peso molecular, que contém mais de 150 elementos. Com base na estrutura, sequência e função, a superfamília Ras é dividida em cinco principais famílias: Ras, Rho, Rab, Ran e Arf (Wennerberg, Rossman, & Der, 2005).

A família Ras está geralmente relacionada com a proliferação celular, diferenciação, morfologia e apoptose. A família Rho está envolvida em vias de sinalização que regulam a organização da actina, a progressão do ciclo celular e a expressão genética. A família Rab é a

maior família da superfamília Ras e está envolvida no transporte vesicular intracelular e do tráfego de proteínas entre diferentes organelos. A família Ran tem apenas um membro presente em todos os eucariotas, exceto nas plantas, sendo o mais abundante na célula, influenciando o transporte nuclear. Por fim, a família Arf também está relacionada com o transporte de vesículas (Wennerberg, Rossman & Der, 2005).

No presente trabalho iremos focar-nos essencialmente na subfamília Rac da família Rho da qual fazem parte as três subfamílias Rho, Rac e Cdc42 (Wennerberg & Der, 2004; Kawano, Kaneko-Kawano, & Shimamoto, 2014).

As GTPases de baixo peso molecular compartilham um mecanismo bioquímico comum e atuam como interruptores moleculares binários em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares: associam-se ao GDP (Guanosina Difosfato) constituindo o estado inativo, e ao GTP (Guanosina Trifosfato) constituindo o estado ativo (Fiegen et al., 2004; Wennerberg et al., 2005).

A interconversão entre os dois estados ocorre através de um ciclo de troca de guanina e hidrólise de GTP, em que a ligação ao GTP induz uma mudança conformacional que envolve duas regiões reguladoras importantes, denominadas *Switch I* e *Switch II*. Consequentemente, as regiões de comutação fornecem uma superfície que, no estado ativo, permite a sua interação com efetores a jusante (Wennerberg et al., 2005). Este processo cíclico é regulado por vários grupos de proteínas: Rho-GEFs (*guanine exchange factors*) que promovem a troca de GDP por GTP, estimulando a dissociação do GDP do complexo; Rho-GAPs (*GTPase activating protein* – proteína ativadora de GTPase) que aumentam a hidrólise do GTP dando origem a GDP e a fosfato inorgânico (PI), regulando a inativação das GTPases; e inibidores de dissociação do GDP (GDI), que são proteínas reguladoras que sequestram Rho GTPases no citoplasma no estado inativo GDP, impedindo a interação com os Rho-GEFs (Figura I.6.) (Fiegen et al., 2004; Kogai et al., 2006; Wennerberg et al., 2005).

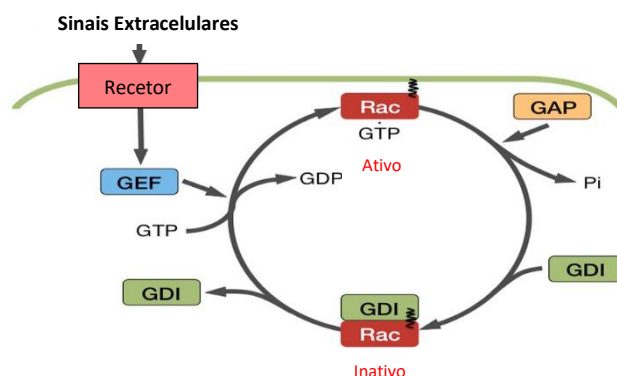


Figura I.6. Modo de ativação das GTPases da família Rac. Adaptado de Kawano, Kaneko-Kawano, & Shimamoto (2014).

4.1. **RAC1**

RAC1 é uma proteína da subfamília de proteínas Rac, da família Rho, da superfamília Ras de GTPases de baixo peso molecular. Esta família inclui outros membros, tais como os membros das subfamílias de proteínas Rho e Cdc42, como dito anteriormente.

A família Rho das GTPases de baixo peso molecular é conhecida por desempenhar um papel importante em vários processos celulares, nomeadamente na reorganização do citoesqueleto da actina. Entre os membros mais estudados estão os membros: Cdc42 que regula a formação de filopódios; RAC1 que está envolvido na formação de lamelipódios; e RhoA que promove a formação de fibras de actina (Kawano et al., 2014; Matos, Collard, & Jordan, 2003; Wennerberg & Der, 2004; Wennerberg et al., 2005).

A proteína RAC1 é codificada pelo gene *RAC1* e pode existir em dois estados conformacionais – uma forma inativa ligada a GDP e uma forma ativa ligada a GTP (Matos & Jordan, 2008), conforme explicado anteriormente. RAC1 tem a capacidade de interagir com efetores específicos, induzindo a ativação de numerosas cascatas de sinalização, com diferentes resultados fisiológicos, nomeadamente a alteração da dinâmica do citoesqueleto, a proliferação celular, apoptose, migração e adesão célula-célula, transporte membranar e produção de espécies reativas de oxigénio (Silva, Faria, Capinha & Bugalho, 2016; Wennerberg & Der, 2004).

4.2. **RAC1b**

Em 1999, Jordan e os seus colaboradores documentaram a descoberta de uma nova variante de *splicing* de RAC1, denominada RAC1b.

RAC1b resulta de um fenómeno de *splicing* alternativo que leva à inclusão de um exão adicional (exão 3b), entre os exões 3 e 4 (Figura I.7.) de RAC1. Contém 57 nucleótidos adicionais, que resultam na inserção de 19 aminoácidos na vizinhança de uma importante região reguladora da GTPase, a região *Switch II* (Jordan et al., 1999; Matos & Jordan, 2006; Zhou et al., 2013).

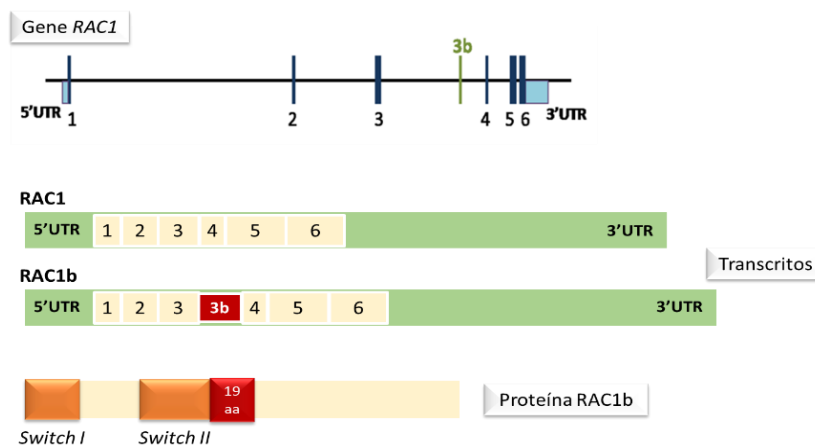


Figura I.7. Diagrama do gene *RAC1*, transcritos alternativos e proteína RAC1b. 1, 2, 3, 4, 5, 6 representam exões; aa.: aminoácidos.

Rac1b é considerada uma variante hiperativa de RAC1: apesar dos níveis mais baixos de expressão em comparação com RAC1, RAC1b existe predominantemente no estado ativo ligado a GTP, devido essencialmente à incapacidade para interagir com Rho-GDI, mantendo-se esta GTPase predominantemente em associação com a membrana, o que beneficia a interação com os GEFs e, conseqüentemente, promove o estado ativo ligado a GTP (Figura I.8.). Além disso, comparativamente com RAC1, esta variante demonstrou ter uma sinalização seletiva, uma vez que várias vias ativadas pelo RAC1 não são ativadas pelo RAC1b (Matos, Collard, & Jordan, 2003).

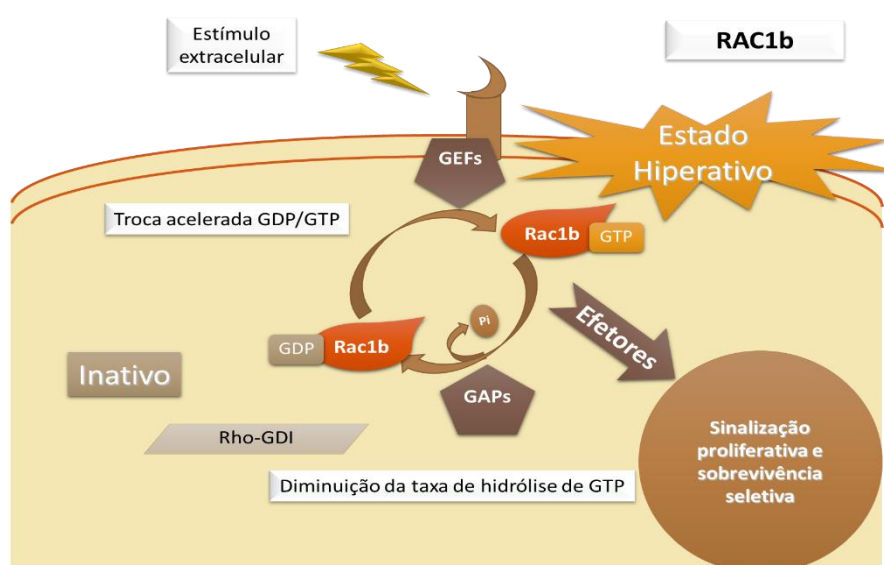


Figura I.8. Esquema representativo das principais características da GTPase RAC1b.

5. Relação NIS e RAC1/1b

Estudos anteriores do nosso grupo revelaram que RAC1b é sobre-expresso em CPTs em comparação com o tecido tiroideu normal, encontrando-se associado a uma evolução clínica mais desfavorável (Silva et al., 2013). Mostrámos ainda que esta sobre-expressão está significativamente correlacionada com a presença da mutação BRAF V600E, que tem sido, por sua vez, associada a uma diminuição da expressão de NIS (Riesco-Eizaguirre & Santisteban, 2006).

A correlação observada entre RAC1b e BRAF V600E levou-nos a investigar uma potencial associação entre a sobre-expressão de RAC1b e os níveis de expressão de NIS. De facto, resultados preliminares da nossa equipa de investigação apontam para a existência de uma correlação inversa entre a sobre-expressão de RAC1b e os níveis de expressão de NIS numa série de 64 carcinomas da tiróide de origem folicular (Figura I.9.) (Faria et al., 2016).

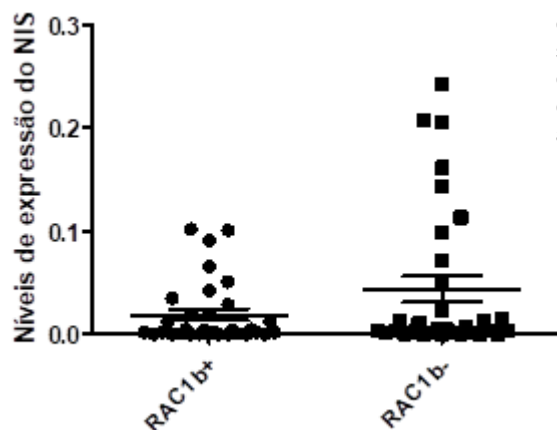


Figura I.9. Níveis de expressão do transcrito NIS em carcinomas da tireoide de origem folicular, com e sem sobre-expressão de RAC1b. Os níveis de expressão NIS quantificados por RT-qPCR correspondem a unidades arbitrárias relativas a uma amostra de referência (n = 64; P = 0.0384, *two-tailed Student's t-test*).

É de notar que o papel desta subfamília de GTPases na regulação da expressão do NIS havia sido documentado recentemente, tendo-se demonstrado que embora desencadeada por diferentes vias de sinalização intracelular, a estimulação da expressão de NIS envolve a indução da atividade da cinase mitogénica p38 pela GTPase RAC1, após a estimulação pela TSH ou AMPc (Kogai et al., 2006; Kogai et al., 2012; Pomerance et al., 2000). Considerando que a variante RAC1b tem o potencial de poder competir com RAC1, inibindo a sua atividade endógena em diversas vias de sinalização, incluindo a via que leva à ativação da cinase p38 (Matos et al., 2008), podemos colocar a hipótese de que a sobre-expressão de RAC1b possa ser um dos mecanismos a contribuir para os baixos níveis de expressão de NIS observados em alguns subgrupos de carcinomas, antagonizando o efeito estimulatório descrito para RAC1.

6. Terapias com Iodo Radioativo

Os níveis de absorção de iodeto dependem diretamente da expressão funcional de NIS. A maioria (mais de 70%) dos carcinomas da tiróide bem diferenciados retém a expressão funcional de NIS, permitindo o uso de iodo radioativo como terapia adjuvante para eliminar células tumorais remanescentes e metástases de carcinomas da tiróide (Castro, Bergert, Goellner, Hay, & Morris, 2001; Wapnir et al., 2003). No entanto, os níveis de expressão de NIS e a absorção de iodo no carcinoma de tiróide são reduzidos quando comparados ao tecido normal. Para além deste facto, cerca de 10% dos pacientes com cancro avançado perdem a capacidade de responder à terapia radioativa (Chung et al., 2010), o que reduz a sobrevivência em 10 anos, de 60% para apenas 10% (Durante et al., 2006).

O iodo radioativo ^{131}I pode ser utilizado no diagnóstico e tratamento da doença metastática do cancro da tiróide (Shen, Kloos, Mazzaferri, & Jhiang, 2001), uma vez que células tiroideias não diferenciam o iodo estável do iodo radioativo, utilizando os mesmos mecanismos de captação e metabolismo intracelular. O iodo radioativo emite radiações de duas maneiras: radiação gama e radiação beta. A administração de ^{131}I ao doente possibilita, através da radiação gama, um mapeamento funcional da tiróide, a deteção de tumor residual após a tiroidectomia

total ou a identificação de metástases à distância. A radiação beta emitida pelo iodo radioativo são partículas que possuem muita energia, que servirão como pequenas “bombas”, e irão acumular-se no tecido da tiróide destruindo as células, servindo assim como método terapêutico quando aplicado às células cancerígenas. As doses de radiação usadas para fins terapêuticos são maiores que as usadas em exames diagnósticos (Sapienza, Endo, Neto, Tavares).

Em condições basais, as células do cancro da tiróide captam quantidades reduzidas de iodo (ou ^{131}I). No entanto quando sujeitas a concentrações elevadas de TSH, as células malignas da tiróide são capazes de captar quantidades significativas de ^{131}I (Chung & Cheon, 2014; Filetti et al., 1999; Klubo-gwiezdzinska et al., 2012). Esta dose elevada de ^{131}I destrói as células malignas da tiróide sem lesar os tecidos que as rodeiam. Portanto, para a realização do tratamento com ^{131}I é necessário que previamente a tiróide tenha sido totalmente retirada (Sapienza, Endo, Neto, Tavares).

A localização do NIS na membrana plasmática não só é importante para o transporte de iodo na glândula da tiróide, mas também é essencial para a terapia com iodo radioativo. A diminuição da absorção de iodo na maioria dos carcinomas da tiróide e os casos refratários ao ^{131}I colocam problemas práticos importantes, tornando-se clinicamente relevante a identificação de mecanismos que permitam a estimulação da expressão funcional de NIS, podendo, potencialmente, otimizar-se a terapêutica destes doentes.

7. Objetivos do estudo proposto

A possibilidade de identificar mecanismos capazes de estimular a expressão de NIS no tecido neoplásico de forma a aumentar a incorporação de iodo radioativo e potenciar a sua eficácia terapêutica, afigura-se de interesse prático.

Assim, atendendo ao que já foi exposto o nosso projeto irá focar-se essencialmente em duas partes:

- 1- Investigação do impacto das GTPases RAC1/1b nos mecanismos reguladores da expressão de NIS. Para tal pretendemos:
 - Confirmar através de estudos funcionais numa linha celular de tecido tiroideu normal os resultados preliminares que apontam para um efeito modulador negativo da sobre-expressão de RAC1b na expressão NIS;
 - Determinar o efeito da sinalização RAC1/1b, na modulação da expressão de NIS, a nível transcricional;
 - Avaliar o efeito da sinalização RAC1/1b na ativação de p38;

- 2- Desenvolvimento de um sistema repórter para estudo da modulação pós-traducional da expressão funcional do NIS.

Proceder-se-à assim à construção e validação de dois vetores de expressão correspondentes à região codificante do gene NIS contendo marcas peptídicas (CFP e 3xHA) que permitam controlar a sensibilidade e especificidade da deteção e localização subcelular do NIS, em diferentes sistemas celulares e sob a ação de diferentes estímulos regulatórios. A marca CFP permitirá detetar a localização subcelular, através da sua autofluorescência, sem recorrer à utilização de anticorpos. A marca HA será inserida numa região extracelular do simportador de modo a permitir a deteção seletiva do NIS localizado na superfície celular.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Construção e clonagem dos vetores de expressão do gene *SLC5A5*



Figura II.10. Esquema representativo do método de construção e clonagem dos vetores de expressão do gene *SLC5A5*.

1.1. Construto pNIS_CFP

Clonagem da região codificante do NIS no vetor peCFP-N1 (*Clontech*). Amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do vetor pSLC5A5 (obtido comercialmente, *Genscript*, contendo a sequência codificante do gene *SLC5A5* (NIS), *Gene ID*: 6528) usando *primers* com *linkers* 5' Nhe I (5' – CTAGCTAGCATGGAGGCGGTGGAGACCG) e 3' Hind III (5' – CCCAAGCTTGAGGTTTGTCTCCTGCTGGTC), com temperatura de hibridação de 65°C, por 36 ciclos, produzindo produtos de aproximadamente 1900 pb. Os produtos de amplificação foram subclonados no vetor *TOPO TA*, através do *kit TOPO TA Cloning pCR 2.1 (Invitrogen)*, de acordo com as instruções do fabricante, procedendo-se seguidamente à transformação de bactérias quimicamente competentes *E. coli* DH5α (*Nzytech*), à amplificação dos clones positivos selecionados em minicultura em meio LB líquido, contendo canamicina 1x, e ao isolamento de DNA plasmídico, recorrendo ao *kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)* de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento Nhe I – Hind III foi inserido nos locais de restrição correspondentes no vetor peCFP-N1 – hidrólise enzimática seguida de ligação usando os enzimas de restrição Nhe I (*Thermo Fisher Scientific*) e Hind III (*Thermo Fisher Scientific*) e T4 DNA ligase (*BioLabs*). O produto de ligação foi usado para transformar bactérias quimicamente competentes *E. coli* DH5α (*Nzytech*). Posteriormente procedeu-se novamente à amplificação dos clones positivos selecionados em minicultura em meio LB líquido, contendo canamicina 1x, e ao isolamento de DNA plasmídico, conforme anteriormente explicado. A sequência do DNA recombinante obtido foi confirmada por sequenciação automática.

1.2. Construto pNIS_HA

Iniciou-se com a produção de uma construção intermediária, semelhante ao ponto anterior, mas desta vez usando *primers* com *linkers* 5' Nhe I (5' – CTAGCTAGCATGGAGGCGGTGGAGACCG) e 3' Not I (5' – GCGGCCGCTCAGAGTTTGTCTCCTGCTGG), com temperatura de hibridação de 65°C, por 36 ciclos, de modo a remover a sequência codificante CFP. Esta construção, denominada pNIS_NheI_NotI, foi então utilizada para inserir a marca HA. Procedeu-se à transformação do plasmídeo NIS + 3xHA, em bactérias *E. coli* DH5α, seguida da amplificação dos clones positivos selecionados em minicultura em meio LB líquido, contendo ampicilina 1x, e ao isolamento de DNA plasmídico. A síntese de DNA recombinante contendo a sequência correspondente à marca peptídica flanqueada por locais de restrição Nhe I e Not I foi encomendada a uma empresa especializada (*Nzytech*). O fragmento Nhe I – Not I da região codificante do NIS no vetor pNIS_NheI_NotI foi substituído pelo fragmento Nhe I – Not I contendo a marca 3xHA, através de restrição enzimática, com os enzimas Nhe I (*Thermo Fisher Scientific*) e Not I (*Thermo Fisher Scientific*), seguida de ligação, tal como descrito no ponto anterior. Após transformação, amplificação dos clones recombinantes e isolamento de DNA plasmídico, a sequência da construção obtida foi confirmada por sequenciação automática, tal como anteriormente.

2. Cultura celular

No estudo presente foram utilizadas duas linhas celulares disponíveis comercialmente – a linha celular PCCL3 (RRID:CVCL_6712) derivada de células de tiróide normal de rato, e a linha celular HEK293 (ATCC® CRL-1573™) derivadas de células embrionárias de rim humano.

As células foram mantidas a 37°C num ambiente humidificado a 5% de CO₂. A linha celular PCCL3 cresceu no meio *F12 Coon's Modification (EuroClone)* suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS) (*Gibco*), 5 µg/mL de Apo-Transferrina (Apo-T) (*SIGMA*), 10 µg/mL de insulina (*SIGMA*) e 0.1 U/mL de TSH (*SIGMA*) (meio de manutenção). Para os ensaios de transfecção também foram utilizados os meios de privação (F12 Coon's Modification + 0.2% FBS + 2 µg/mL Apo-T) e de estimulação (F12 Coon's Modification + 5% FBS + 5 µg/mL Apo-T + 1 U/mL TSH). As células HEK293 foram mantidas com o meio DMEM 1x + GlutaMAX (*Gibco*) suplementado com 10% de FBS. Quando a confluência celular atingia os 80-100%, as células eram subcultivadas procedendo-se à dissociação das ligações célula-célula com tripsina-EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético) (*Invitrogen*).

3. Transfecção

As transfecções foram realizadas usando os reagentes de transfecção *Lipofectamine 2000 (Invitrogen)*, para as células PCCL3 e *Metafectene (Biotenx)* para as células HEK293, de acordo com as instruções do fabricante. 48 ou 24 horas antes do início do procedimento, 2x10⁶ de células de PCCL3 ou HEK293 foram cultivadas em placas de 35 mm (*Nunclon*), respetivamente. 24 horas antes da transfecção, as células PCCL3 foram colocadas, por um período de 24 horas, em meio de privação. As células HEK293 não passaram por esta fase, iniciando-se, assim, a transfecção 24 horas após serem cultivadas em placas. Consoante o ensaio, algumas placas de PCCL3 continuaram em meio de manutenção (*F12 Coon's Modification + 5% FBS + 5 µg/mL Apo-T + 10 µg/mL insulina + 0.1 U/mL TSH*) e outras foram colocadas em meio de estimulação. As células HEK293 continuaram em meio de manutenção (DMEM 1x + GlutaMAX + 10% FBS). A transfecção foi realizada a uma confluência celular de 70-80%. O DNA plasmídico (2 µg) foi diluído em 125 µL de OPTI-MEM (*Gibco*), no caso das células PCCL3, e em 150 µL de DMEM no caso das células HEK293. 8 µL do reagente de transfecção lipofectamina e 9 µL de metafectene também foram diluídos em 125 µL de OPTI-MEM ou 150 µL de DMEM, respetivamente, e incubados 5 minutos a temperatura ambiente. As duas reações foram misturadas e incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente, para a formação dos complexos DNA-lipofectamina/metafectene. Após incubação, 250 µL (300 µL no caso das HEK) da mistura de transfecção foi adicionada a cada placa de cultura e aguardou-se 24 horas até se recolherem as células. Em determinados ensaios, foi adicionado um inibidor de RAC1/1b, EHT 1864 (*Santa Cruz Biotechnology*), numa concentração de 50 µM 4 horas antes da recolha de células.

As células PCCL3 foram transfectadas com o vetor pECFP-N1 *empty vector* e com os vetores gentilmente fornecidos pelo Doutor Peter Jordan, do Instituto Nacional de Saúde Dr.

Ricardo Jorge: pEGFP-RAC1-L61, pEGFP-RAC1b-L61, pEGFP-RAC1-WT e pEGFP-RAC1b-WT. As células HEK293 foram transfectadas com os vetores anteriormente clonados pNIS_CFP e pNIS_HA. O vetor pcDNA3.1(+)- foi utilizado como *mock*.

4. Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração e a purificação de RNA total foram realizadas usando o *Rneasy Mini Kit* (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de RNA total foi quantificada pelo espectrofotômetro *NanoDrop 2000 spectrophotometer* (Thermo Scientific) e o mesmo foi guardado a -20°C.

O cDNA (DNA complementar) foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total pela transcriptase reversa *RevertAid Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific), tendo sido seguidas as instruções do fabricante. Resumidamente, o RNA total foi incubado a 65°C, 10 minutos (passo de desnaturação para remoção das estruturas secundárias de RNA que podem dificultar a síntese), com 0.1 µL de *random primers* (3 µg/µL) (Roche), 0.8 µL de deoxinucleótidos (dNTPs, 25 µM) (GE Healthcare) e água bidestilada (ddH₂O) perfazendo um volume final de 15 µL. Após esta incubação a reação foi arrefecida a 4°C, tendo-se seguidamente adicionado a mistura reacional (5µL) contendo 4 µL de *Reverse Transcriptase Buffer 5x* (Thermo Scientific), 0.5 µL de *RevertAid Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific) e 0.5 µL de *RNAse OUT (Recombinant Ribonuclease Inhibitor, 40 U/µL)* (Invitrogen). A síntese de cDNA foi realizada num termociclador *2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystems) utilizando o seguinte programa: 25°C por 10 minutos, 42°C por 1 hora (síntese de cDNA), 70°C por 10 minutos (inativação) e 4°C até as amostras serem guardadas a -20°C.

5. PCR (Reação em Cadeia da Polimerase / Polymerase Chain Reaction)

A análise da expressão de NIS, RAC1 e RAC1b foi realizada por PCR a partir do cDNA sintetizado. Para a amplificação de NIS foram utilizados os *primers* (F - *forward*, R - *reverse*) específicos NIS RAT F (5'-TCCTCACAGGCCGTATCTCA) e NIS RAT R (5' – GAAGGAACCCTGGAGGACAC), utilizando a temperatura de hibridação de 65°C e 26 ciclos, que produzem um produto de PCR de 314 pb (pares de bases). A amplificação de RAC1 e RAC1b foi realizada em simultâneo mediante a utilização dos *primers* RAC1/1b F (5' – ATGTTATGGTAGATGGAAAACCG) e RAC1/1b R (5' – CGGACATTTTCAAATGATGCAGG), comuns a ambas as variantes, que geram produtos de 154 pb e 211 pb, correspondentes a RAC1 e RAC1b, respetivamente. A amplificação teve 26 ciclos e uma temperatura de hibridação de 62°C. A mistura de reação de PCR consistiu em 25 µL de tampão de PCR 1x (diluído a partir de tampão de PCR 10x em ddH₂O, adicionando-se 20 µL de cada dNTP de 100 mM), 0.1 µL Taq Polimerase (5 U/µL) (Nzytech) e 0.5 µL do *primer forward* e *reverse* (10 µM). A um total de 23 µL desta mistura foi adicionado 2 µL de cDNA, perfazendo um volume total de 25 µL.

Os produtos de PCR amplificados foram resolvidos por eletroforese, em gel de agarose a 2% (p/v) em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 1x (diluído a partir do tampão TBE 10x, *National Diagnostics*). O DNA foi marcado com brometo de etídio (*Invitrogen*) (solução 0.05% (v/v)). A visualização foi realizada sob luz UV e a imagem adquirida num transiluminador *GenoSmart* (*VWR*).

6. PCR quantitativo (RT-qPCR)

Os níveis de expressão de NIS foram quantificados por RT-qPCR, recorrendo à metodologia de *SYBR Green* como método de deteção, utilizando *Xpert Fast SYBR (Grisp)*, de acordo com as instruções do fabricante.

As reações de amplificação foram realizadas no aparelho *Ligh Cycler 480II (Roche)* em triplicado para cada amostra e utilizando como referência o gene endógeno *HPRT1*. A mistura de reação foi preparada com 5 µL de SYBR, 3.5 µL de ddH₂O, 0.25 µL de cada *primer* e 1 µL de cDNA. Foram utilizados os *primers* NIS RAT F e NIS RAT R (NIS RAT F: 5'-TCCTCACAGGCCGTATCTCA, NIS RAT R: 5'-GAAGGAACCCTGGAGGACAC) para o gene *NIS* e os *primers* HPRT1 F e HPRT1 R (HPRT1 F: 5' – GCTGAAGATTTGGAAAAGGTG, HPRT1 R: 5' – AATCCAGCAGGTCAGCAAAG) para o gene *HPRT1*.

7. Extração proteica, Eletroforese SDS-PAGE e Western blot

O extrato proteico total foi obtido, a partir da cultura celular de PCCL3 e HEK293, recorrendo ao uso de 100 µL de tampão de lise por cada placa de 35 mm, sendo a mistura aquecida, posteriormente, a 95°C por 10 minutos, com o intuito de desnaturar as proteínas. Quantidades equivalentes de proteína total de cada amostra foram carregadas num gel de eletroforese de dodecil-sulfato de sódio (SDS) de poliacrilamida (PAGE) a 10%. A corrida eletroforética decorreu a 0.02 A por gel, por aproximadamente 1 hora e 15 minutos. As proteínas foram transferidas para uma membrana PVDF (Fluoreto Polivinidileno) (*Bio-Rad*) com um *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad)*, a 100 V por 1 hora. Uma solução de leite desnatado em pó diluído em Solução Salina Tris-Tamponada 0.05% Triton X-100 (TBST *milk*) foi usada para bloquear ligações não específicas à membrana (1 hora à temperatura ambiente), quando usados os anticorpos primários específicos anti-RAC1, anti-p38, anti-GFP e anti-HA. Os anticorpos primários específicos foram aplicados com as seguintes diluições: anti-p38 1:1000 (*BD Biosciences*), anti-RAC1 1:2000 (*Millipore*), anti-GFP 1:3000 (*Abcam*), anti-Pp38 1:750 (*BD Biosciences*) e anti-HA 1:1000 (*Roche*), e foram incubados a 4°C, *overnight* com agitação. No dia seguinte a membrana foi incubada por 1 hora, a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário *anti-mouse IgG (Bio-Rad)* para os anticorpos primários anti-p38, anti-RAC1, anti-Pp38 e anti-HA, e o anticorpo secundário anti-rabbit IgG (*Bio-Rad*) para o anticorpo primário anti-GFP, a uma diluição de 1:5000 em TBST *milk*. A deteção e a observação de bandas foram

realizadas através de quimioluminescência do substrato ECL por revelação em chapa autoradiográfica.

8. Imunofluorescência

Cultivaram-se lamelas de 10x10mm em placas de 35 mm com 2x10⁶ células HEK293 segundo as condições descritas no ponto 3 “Transfecção”. As lamelas, após 24 horas da transfecção, foram lavadas duas vezes com 1 mL de solução PBS 1x (*Gibco*) e colocadas em poços individuais devidamente identificados, de uma placa de 24 poços. As células foram fixadas com 500 µL de paraformaldeído (PFA) a 4% (v/v) por 30 minutos, à temperatura ambiente. De seguida, as mesmas foram permeabilizadas com PBS 1x + 0.5% Triton X-100, por 15 minutos. Após três lavagens com 500 µL de solução PBS 1x + 0.05% Triton X-100 por 5 minutos com agitação as lamelas foram incubadas 2 horas com o anticorpo primário rabbit-anti-HA (*Sigma*) na diluição de 1:50 (diluição em PBS + 0.01% Triton X-100), em atmosfera húmida. Posteriormente à incubação, as lamelas foram lavadas três vezes com PBS 1x + 0.05% Triton X-100 e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG Alexa 488 (*Life Technologies*) - diluição 1:500 (diluição em PBS + 0.01% Triton X-100). Nesta incubação incluiu-se uma solução de faloidina conjugada com o fluoróforo TRITC (*Invitrogen*) de forma a marcar os filamentos de actina. Após 3 lavagens com PBS 1x + 0.05% Triton X-100 por 5 minutos com agitação, as células foram novamente fixadas com PFA 4% por 10 minutos e lavadas duas vezes com PBS 1x + 0.05% Triton X-100. Uma primeira lavagem rápida e uma segunda de 5 minutos com agitação. As lamelas foram montadas em lâminas de vidro com 4 µL de meio de montagem (sem DAPI) Fluoromount (*SouthernBiotech*). As imagens foram recolhidas utilizando no microscópio confocal *Leica TCS-SPE* e processadas no *software Image J*.

9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o software *GraphPad Prism 5* (San Diego, EUA). Sempre que apropriado, os valores são expressos como média ± DP (desvio padrão). Comparações de rácios e proporções foram feitas utilizando o teste *t Student* de duas caudas. A significância estatística dos resultados foi aceite a um valor-p < 0.05.

III. RESULTADOS

Parte 1

1. Otimização das condições de estimulação da TSH na expressão de NIS

A expressão de endógena de NIS está bem documentada na linha celular PCCL3, derivada de células de tiróide normal de rato, sendo os níveis de NIS responsivos ao estímulo com TSH.

Numa primeira abordagem, procedemos à otimização das condições de cultura celular para aferir os níveis de expressão de NIS, na presença e ausência de TSH, de modo a permitir a posterior análise do impacto da sobre-expressão de RAC1/1b na expressão deste simportador. Testámos assim diferentes tempos de incubação nos meios de privação (P), manutenção (M) e estimulação (E). Os níveis de expressão de NIS foram avaliados através de RT-PCR, numa abordagem semi-quantitativa (Figura III.11.).

Das diferentes condições analisadas, foram selecionadas como representativas da ausência e presença de estimulação com TSH, respetivamente, as seguintes condições: incubação em meio de privação por 24h seguida de 24h em meio de manutenção e incubação em meio de privação por 24h seguida por 24h em meio de estimulação.

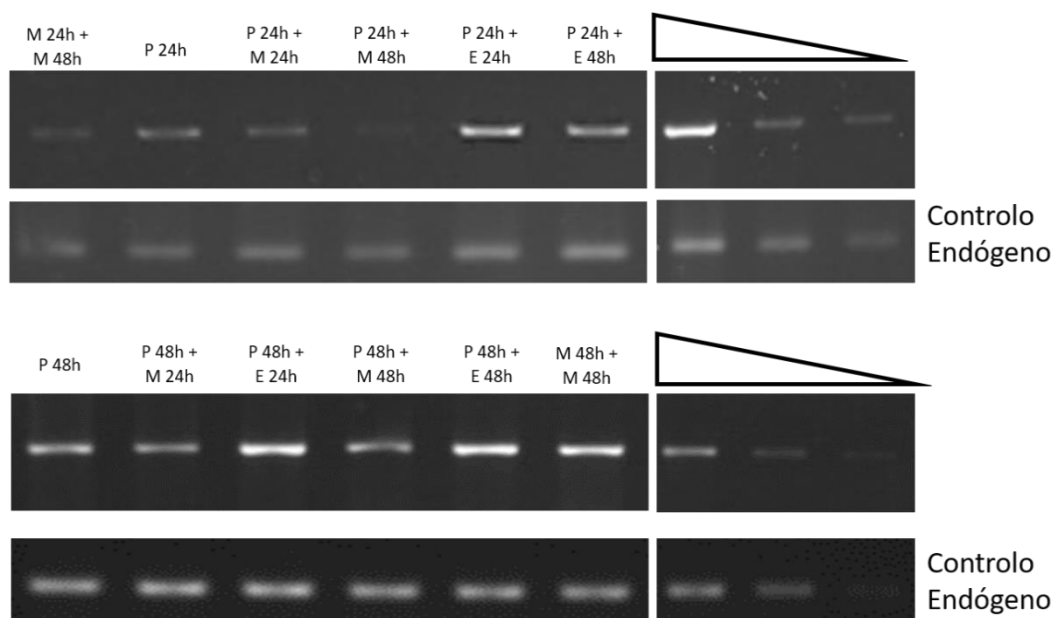


Figura III.11. Imagens representativas de RT-PCR semiquantitativo para avaliação da expressão de NIS. Reacção de RT-PCR com 26 ciclos, utilizando a deteção de actina como controlo endógeno e diluições seriadas para confirmar condições semi-quantitativas.

2. Efeito da sobre-expressão de RAC1/1b na expressão de NIS

No presente trabalho os níveis de expressão de NIS (a nível transcricional), foram quantificados por RT-qPCR, e comparados entre células transfectadas com pECFP-N1 *empty vector* (*mock*), RAC1 *wt*, RAC1b *wt*, RAC1 L61 ou RAC1b L61, na ausência e na presença de estimulação com TSH e na ausência e presença do inibidor EHT 1864.

Numa primeira abordagem, observou-se qualitativamente os níveis de expressão de RAC1 e de RAC1b, recorrendo-se à amplificação por PCR (Figura III.12.).

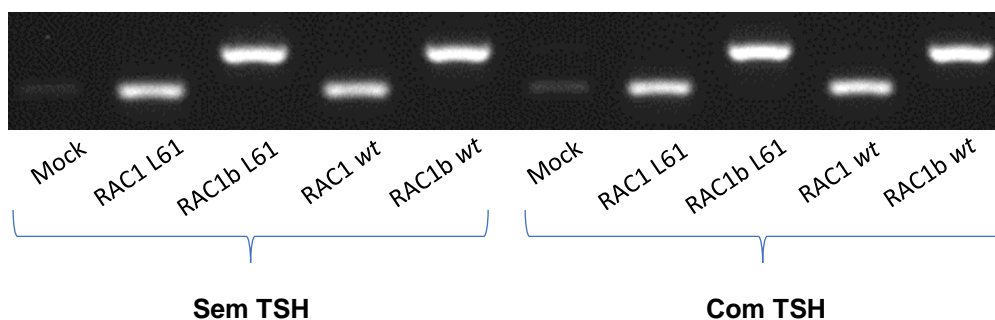


Figura III.12. Imagens representativas da reação de PCR para amplificação de RAC1/1b.

Na ausência de TSH, a expressão das variantes RAC1 L61, RAC1b L61 e RAC1 *wt* não induziu diferenças estatisticamente significativas nos níveis de expressão do NIS em comparação com os resultados obtidos no *mock*. Apenas se observou uma redução nos níveis de expressão do NIS (cerca de 20%) quando as células foram transfectadas com a variante RAC1b *wt* (Figura III.13. e Figura III.14.). Esta redução foi ainda mais evidente na presença de TSH: o estímulo com TSH induziu um aumento dos níveis de expressão de NIS de cerca de 80% na ausência das variantes RAC1/1b (comparação dos ensaios *mock* na presença e na ausência de TSH) e na presença de RAC1b *wt* observou-se uma redução acentuada de aproximadamente 50%. O efeito da sobre-expressão das outras variantes foi igualmente não significativo, mesmo na presença do estímulo com TSH. Normalizando os resultados obtidos para RAC1b *wt* aos respectivos ensaios *mock* nas diferentes condições de estimulação com TSH, é notório o efeito inibidor desta variante na expressão de NIS, em ambas as condições (Figura III.13. e Figura III.14.). Estes resultados suportam a hipótese de que RAC1b possa exercer um papel na inibição dos níveis de expressão de NIS nas células PCCL3.

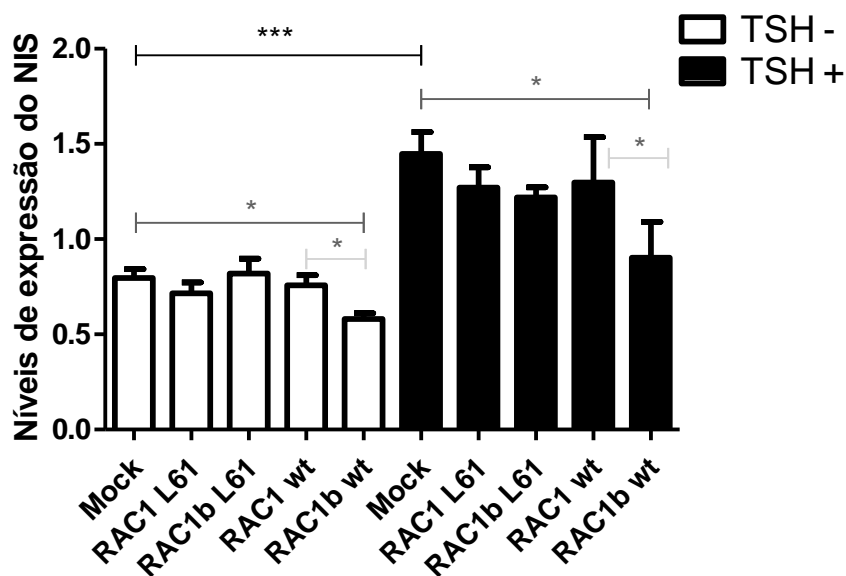


Figura III.13. Efeito da sobre-expressão de RAC1/1b na regulação da expressão de NIS em células PCCL3. Os níveis da expressão de NIS foram analisados por RT-qPCR em células transfectadas com variantes RAC1/1b *wt* e com as variantes constitutivamente ativas RAC1/1b L61, na presença e na ausência de TSH. Resultados normalizados a um calibrador externo. * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$.

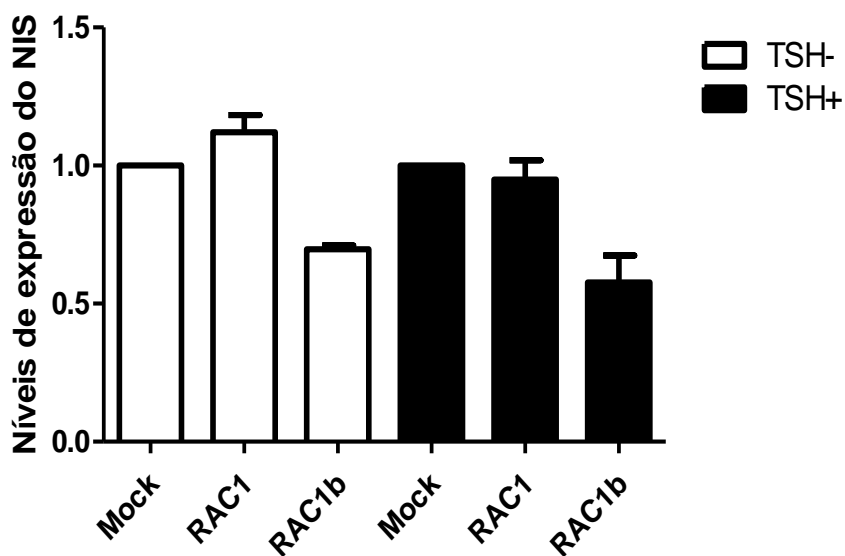


Figura III.14. Efeito da sobre-expressão de RAC1/1b na regulação da expressão de NIS em células PCCL3. Os níveis da expressão de NIS foram analisados por RT-qPCR em células transfectadas com RAC1 *wt* ou RAC1b *wt*, na presença e na ausência de TSH. O gráfico representa valores normalizados aos ensaios *mock*, na ausência e presença de TSH, respetivamente.

A sobre-expressão das variantes de RAC1 consequente da transfecção foi igualmente monitorizada, ao nível da proteína, por *Western blot*. As proteínas GFP-RAC1 e GFP-RAC1b foram detetadas como bandas de aproximadamente 48 kDa e 50 kDa, tendo sido confirmada a sua sobre-expressão (Figura III.15.).

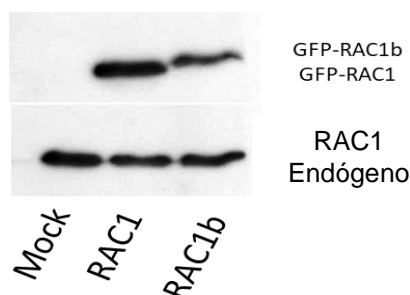


Figura III.15. Expressão de RAC1/1b em células PCCL3 transfectadas. *Western blot* representativo da expressão de GFP-RAC1 e GFP-RAC1b, utilizando a deteção de RAC1 endógeno como controlo.

3. Efeito da sobre-expressão de RAC1b wt com o inibidor EHT 1864 na expressão de NIS

Para se confirmar que o efeito na expressão de NIS observado na presença de RAC1b foi devida de facto à ação desta variante, os ensaios foram repetidos na presença do inibidor EHT 1864, um potente inibidor das GTPases RAC, com alta afinidade para ambas as variantes RAC1 e RAC1b.

Quer na presença, quer na ausência de TSH, o inibidor EHT 1864 levou à reversão da redução da expressão de NIS induzida pela sobre-expressão de RAC1b *wt*. É ainda de notar que na ausência de RAC1b (ensaios *mock*) foi observada uma redução de cerca de 35% nos níveis de expressão de NIS na presença de TSH (Figura III.16.), indicativo do efeito da inibição de RAC1 endógeno nos níveis de expressão de NIS induzidos pela TSH.

Estes resultados são assim indicativos de RAC1 ter efeito estimulador na expressão de NIS (uma vez que a inibição de RAC1 endógeno leva à redução dos níveis de NIS) e da sobre-expressão RAC1b induzir o efeito oposto.

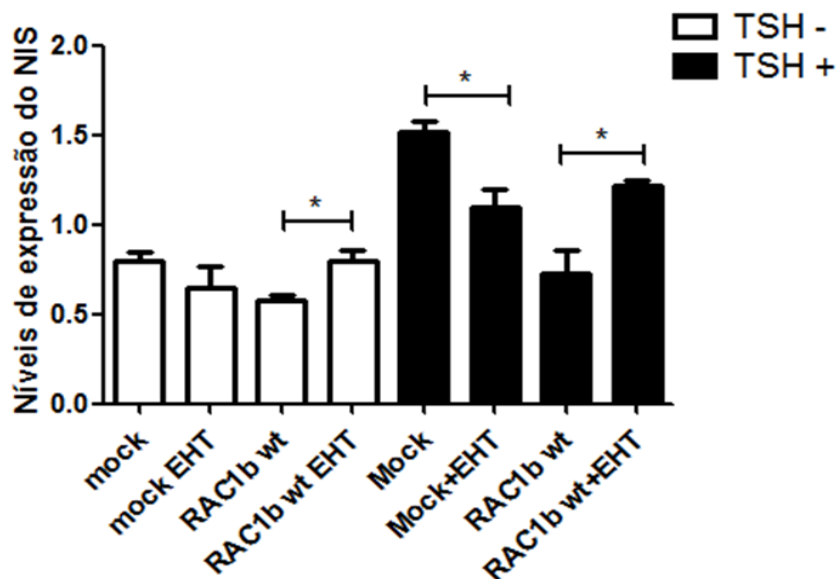


Figura III.16. Efeito da sobre-expressão de RAC1b wt com o inibidor EHT 1864 na regulação da expressão de NIS em células PCCL3. Os níveis da expressão de NIS foram obtidos através de PCR quantitativo (RT-qPCR) em células transfectadas com RAC1b wt, na presença ou ausência de EHT 1864, na presença e na ausência de TSH. Os valores foram normalizados a um calibrador externo. * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$.

4. Efeito da sobre-expressão de RAC1/1b na expressão de p38 e fosfo-p38

O efeito da sobre-expressão das variantes de RAC1 na ativação da proteína p38 foi analisado por *Western blot*. A proteína p38 e a sua variante fosforilada foram detetadas como bandas de aproximadamente 40 kDa. Como controlo endógeno foi usada a deteção de RAC1 endógeno, com aproximadamente 21 kDa.

Ao analisar o efeito da sobre-expressão de RAC1/1b na ativação da cinase mitogénica p38 (Figura III.17.), apenas foi notório o efeito da presença da variante RAC1 L61. Tanto na ausência, como na presença de TSH, a variante RAC1 L61 parece induzir a ativação de p38, não sendo visível o mesmo efeito com a expressão das outras variantes. Nos restantes casos os níveis da proteína fosfo-p38 aparentam ser equivalentes aos níveis do *mock*.

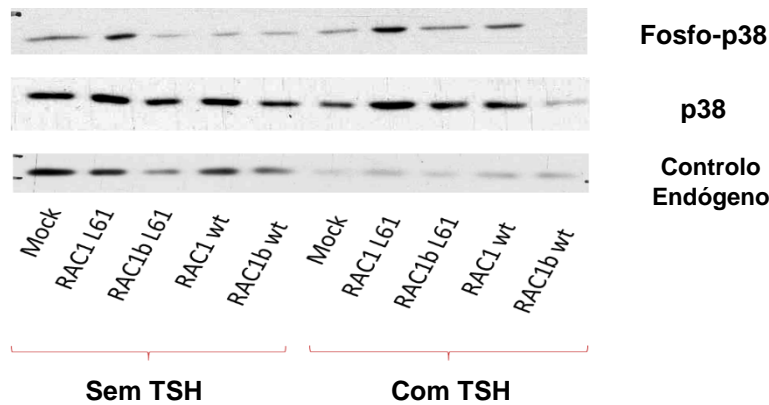


Figura III.17. Expressão da cinase mitogénica p38 e fosfo-p38 em células PCCL3 transfectadas. *Western blot* representativo da expressão da proteína p38 e fosfo-p38, na ausência e presença de TSH, utilizando a detecção de RAC1 endógeno como controlo.

Parte 2

1. Construção e Validação funcional dos vetores de expressão pNIS CFP e pNIS HA

Para se superar as limitações técnicas inerentes à deteção de NIS dada a sua baixa expressão nos carcinomas da tiróide e de igual modo tornar a sua deteção e localização subcelular sensível e específica, iniciou-se ainda no âmbito deste trabalho de mestrado o desenvolvimento de um sistema repórter para estudo da modulação pós-traducional da expressão funcional do NIS. Foram construídos dois vetores de expressão correspondentes à região codificante do gene NIS contendo marcas peptídicas (CFP e 3xHA) (Figura III.18.), com características distintas, que permitem controlar a sensibilidade e especificidade da deteção e localização subcelular deste simportador.

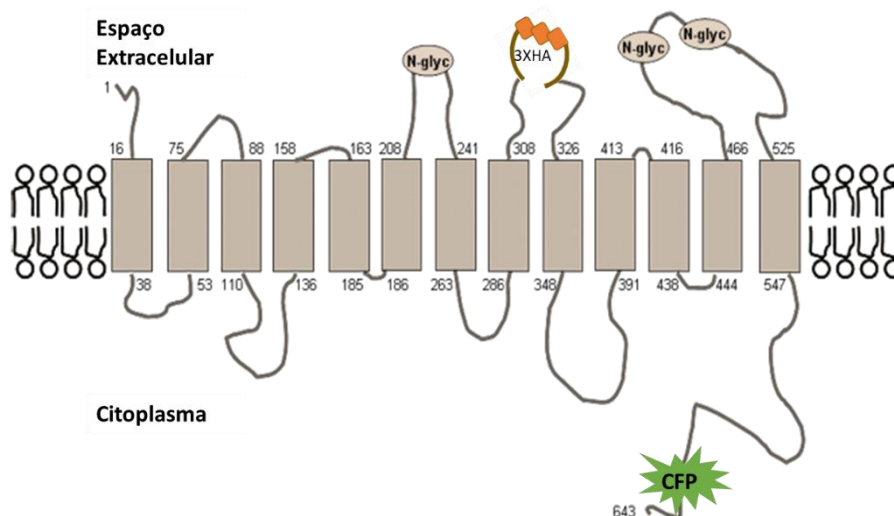


Figura III.18. Modelo esquemático da estrutura secundária de NIS com as marcas peptídicas CFP e 3xHA.

Para validar os vetores de expressão do NIS desenvolvidos, procedemos à sua transfecção nas células HEK293, por ser possível com esta linha obter elevadas eficiências de transfecção. Foram assim transfectados nesta linha celular os vetores pcDNA3_EV (*mock*), pNIS_CFP ou pNIS_HA tendo sido a expressão de NIS avaliada por imunofluorescência e *Western blot*. Na técnica de imunofluorescência os filamentos de actina foram marcados com faloidina conjugada com um fluoróforo (vermelho) e a discriminação entre células transfectadas e não transfectadas foi possível devido à utilização do anticorpo anti-HA (verde), no caso da transfecção com pNIS_HA e devido ao sinal de fluorescência emitido pelo CFP (também verde), no caso da transfecção com pNIS_CFP.

Conforme se pode observar na Figura III.19. foi possível a deteção das proteínas transfectadas quer por imunofluorescência quer por *Western blot*, validando a expressão de NIS a partir dos vetores de expressão produzidos. Nas imagens de microscopia confocal de fluorescência (Figura III.19. (A)) observa-se marcação verde tanto na transfecção com pNIS_HA, como com pNIS_CFP, estando esta ausente no controlo negativo (*mock*). Através desta análise é ainda possível observar que a proteína expressa a partir de ambos os vetores apresenta localização membranar (para além da intra-citoplasmática), parecendo esta ser, no entanto, mais intensa no caso da proteína expressa a partir do construto pNIS-HA (Figura III.20.). Na análise por *Western blot* (Figura III.19. (B)) observa-se a presença de várias bandas relativas à expressão de ambos os construtos pNIS_HA e pNIS_CFP, através da deteção com os anticorpos anti-HA e anti-GFP, respetivamente. Este padrão está, no entanto, ausente no controlo negativo (*mock*), sendo isto indicativo da especificidade do sinal detetado. A presença de múltiplas bandas poderá ser indicativo da presença de diversas formas da proteína transfectada, correspondentes a alterações pós-traducionais.

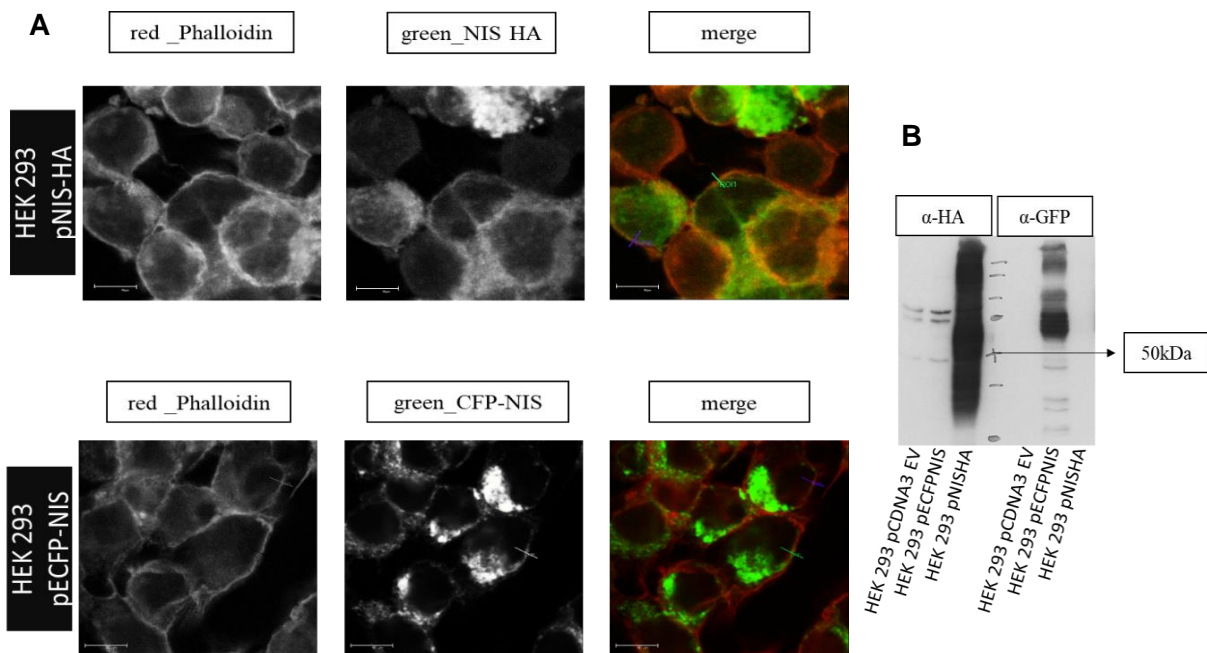


Figura III.19. Validação dos construtos pNIS_CFP e pNIS_HA. A linha celular HEK293 foi transfectada com pcDNA3-NIS (*mock*), pNIS_CFP ou pNIS_HA. (A) Microscopia confocal de imunofluorescência usando o anticorpo anti-HA. Os filamentos de actina foram marcados com faloidina conjugada com um fluoróforo. São mostradas imagens da sobreposição de HA, CFP e faloidina. (B) *Western blot* representativo da expressão de HA e CFP, utilizando os anticorpos anti-HA e anti-GFP.

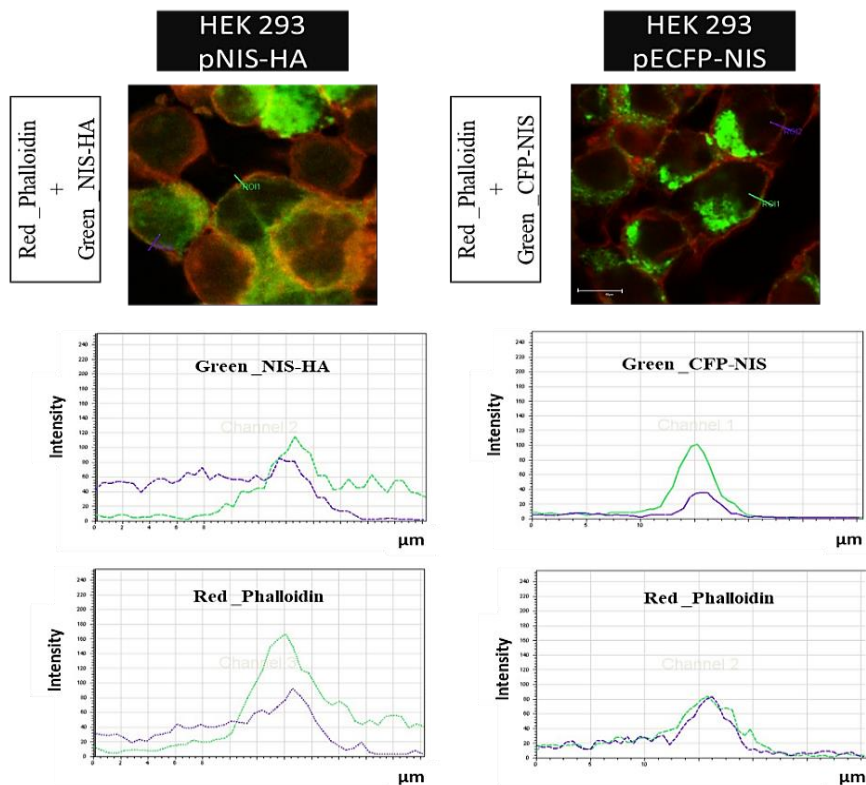


Figura III.20. Localização subcelular e intensidade dos construtos pNIS_CFP e pNIS_HA. A linha celular HEK293 foi transfectada com pcDNA3-EV (*mock*), pNIS_CFP ou pNIS_HA. Microscopia confocal de imunofluorescência usando o anticorpo anti-HA. Os filamentos de actina foram marcados com faloidina conjugada com um fluoróforo. São mostradas imagens da sobreposição de HA, CFP e faloidina e gráficos das suas respectivas intensidades.

IV. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

O cancro da tiróide é a neoplasia endócrina mais comum (cerca de 90%) e surgem anualmente, em Portugal, cerca de 400 novos casos. A maioria dos carcinomas da tiróide que deriva das células foliculares são bem diferenciados, sendo os principais subtipos histológicos o carcinoma papilar (CPT) e o carcinoma folicular (CFT) (DeLellis, Lloyd, Heitz & Eng, 2004; Muro-Cacho & Ku, 2000; Maciel, 1998). A maioria (mais de 70%) dos carcinomas da tiróide bem diferenciados retém a expressão funcional de NIS, permitindo o uso de iodo radioativo como terapia adjuvante para eliminar células tumorais remanescentes e metástases de carcinomas da tiróide (Castro, Bergert, Goellner, Hay, & Morris, 2001; Wapnir et al., 2003). No entanto, os níveis de expressão de NIS e a absorção de iodo no carcinoma de tiróide são reduzidos quando comparados ao tecido normal, colocando sérios problemas práticos no tratamento destes doentes (Soares et al., 2014; Nguyen et al., 2015).

RAC1 é um membro da família Rho das GTPases de baixo peso molecular, que regula várias funções celulares. Estudos demonstraram que a GTPase RAC1 tem a capacidade de estimular a expressão de NIS, através da atividade da cinase p38 (Kogai & Brent, 2012; Kogai et al., 2012).

Matos e seus colaboradores (2003; 2006) mostraram que RAC1b (uma forma hiperativa de RAC1), comparativamente com RAC1 possui propriedades únicas: existe predominantemente na sua forma ativa e favorece vias de sinalização específicas. Recentemente, o nosso grupo relatou que a sobre-expressão de RAC1b está significativamente associada a um desfecho mais desfavorável, tanto em CPT como em CFT. A sobre-expressão também foi encontrada num subconjunto de CPT positivos para a mutação BRAF V600E (Silva et al 2013), que por sua vez se demonstrou estar associada a uma redução dos níveis de expressão de NIS (Riesco-Eizaguirre & Santisteban, 2006). Isto suporta a hipótese de uma potencial correlação inversa entre a sobre-expressão de RAC1b e os níveis de expressão de NIS. De facto, um estudo recente do nosso grupo numa série de carcinomas da tiróide de origem folicular revelou a existência de uma correlação inversa entre a sobre-expressão de RAC1b e os níveis de expressão de NIS (Figura I.9.) (Faria et al., 2016).

Apesar da TSH ser o principal regulador positivo da expressão de NIS em tecido tiroideu normal (atuando quer a nível transcricional, quer pós-traducional), outros mecanismos podem também ter um papel relevante neste processo (Dohán et al., 2003; Vieja, Dohan, Levy, & Carrasco, 2000). De facto, outras vias de sinalização tais como a mediada por RAC1/p38 poderá atuar em sinergia potenciando a expressão de NIS, após a estimulação pela TSH ou AMPc, tal como descrito por Kogai e colaboradores (Kogai et al., 2012; Kogai, Taki, & Brent, 2006), uma vez que o mesmo observou que a inibição de p38 reduzia significativamente a expressão de NIS em células FRTL-5. Devido aos mecanismos regulatórios presentes nas células normais de tiróide e nas células cancerígenas afetarem diferencialmente a regulação da expressão de NIS,

esta tem sido muito difícil de caracterizar. E embora existam vários fatores associados à indução de NIS, ainda não foi possível relacioná-los com a capacidade de absorção de iodo em estudos clínicos, pois o aumento da expressão de NIS a nível transcricional não se traduz necessariamente num aumento da absorção de iodo. Isto sugere que a localização do NIS na membrana plasmática não só é importante para o transporte de iodo na glândula da tiróide, mas também é essencial para a terapia com iodo radioativo (Kogai, Sajid-Crockett, Newmarch, Liu & Brent, 2008; Kogai, Taki & Brent, 2006).

A necessidade de identificar novos moduladores da expressão funcional do NIS levou-nos a investigar no presente trabalho o papel das GTPases RAC1 e RAC1b na modulação transcricional deste simportador. Numa segunda abordagem, pretendemos desenvolver um sistema repórter que venha a possibilitar a análise da modulação pós-traducional do NIS em diferentes sistemas celulares e ultrapassando limitações experimentais relacionadas com os baixos níveis de expressão deste simportador nos carcinomas da tiróide, superar limitações relacionadas com a especificidade dos anticorpos disponíveis para a deteção de NIS e facilitar a análise da sua localização subcelular.

Primeiramente, para avaliação do efeito da sobre-expressão de RAC1/1b nos níveis de expressão de NIS a nível transcricional, a linha celular PCCL3 foi transfectada com as variantes *wild-type* e as variantes constitutivamente ativas de RAC1/1b e comparadas aos ensaios desenvolvido na ausência das variantes (*mock*).

Nos ensaios em que as células foram transfectadas com as variantes RAC1/1b *wild-type* e com as variantes constitutivamente ativas RAC1/1b L61, na ausência da estimulação com TSH, não se observou diferenças estatisticamente significativas nos níveis de expressão do NIS com a sobre-expressão das variantes RAC1 L61, RAC1b L61 e RAC1 *wt*, comparativamente com o observado no ensaio *mock*. Nestas condições, apenas se destacou a redução em cerca de 20% dos níveis de expressão do NIS induzida pela variante RAC1b *wt*. Na presença de TSH, o efeito da sobre-expressão da variante RAC1b *wt* foi ainda mais evidente, induzindo uma redução de aproximadamente 50% dos níveis de NIS, sugerindo assim um papel na inibição da expressão do NIS por parte de RAC1b. Tal como na ausência de estimulação com TSH, as restantes variantes não induziram efeitos estatisticamente significativos na expressão de NIS (Figura III.13 e III.14.)

Apesar de a sinalização de RAC1 ter sido descrita como potenciadora da expressão de NIS, no presente estudo não foi observado uma alteração significativa nos níveis deste simportador com a sobre-expressão de RAC1 ou da sua variante constitutivamente ativa RAC1 L61, na linha celular PCCL3. Esta situação pode ser devida à capacidade de RAC1 interagir com efetores específicos, induzindo a ativação de numerosas vias de sinalização, com diferentes resultados fisiológicos (Silva, Faria, Capinha & Bugalho, 2016; Wennerberg & Der, 2004). Possivelmente, a sobre-expressão de RAC1 e de RAC1 L61 além de estimular a expressão de NIS, pela indução da cinase mitogénica p38, poderão igualmente ativar outras vias que contrariem este efeito. Assim, no balanço final, qualquer efeito do simportador de sódio e iodo acabaria por ficar

escamoteado. No entanto, a inibição de RAC1 endógeno pelo inibidor EHT 1864 induziu uma diminuição significativa na expressão de NIS estimulada pela TSH (Figura III.16.), confirmando os resultados de Kogai e colaboradores (Kogai, Liu, Mody, Shamsian, & Brent, 2012). Os resultados obtidos vão assim de encontro com o esperado, observando-se uma redução da expressão de NIS após a inibição de RAC1, apontando para o seu possível envolvimento na estimulação do simportador.

Relativamente a RAC1b, por este possuir uma sinalização mais seletiva e demonstrar um efeito antagonista em relação a RAC1 inibindo a sua atividade endógena em diversas vias de sinalização (Matos et al., 2008; Silva et al., 2013), e atendendo aos resultados preliminares do grupo relativos à avaliação da expressão de NIS em tumores da tiróide de origem folicular (Faria et al., 2017) colocou-se a hipótese desta variante funcionar como um modulador negativo da expressão de NIS. Seria assim espectável uma redução significativa dos níveis de NIS após a sobre-expressão de RAC1b ou de RAC1b L61. Estes resultados foram efetivamente observados com a sobre-expressão da variante selvagem, mas não com a variante constitutivamente ativa. Isto poderá dever-se ao facto de RAC1b L61 levar a uma hiperestimulação da sinalização de RAC1b, que poderá eventualmente ativar mecanismos inibitórios da expressão de NIS.

A modulação negativa de RAC1b *wt* na expressão de NIS foi ainda confirmada pela reversão do efeito inibitório da sobre-expressão desta variante na presença do inibidor EHT 1864 (Figura III.16.), que possui elevada afinidade para as isoformas de RAC1, incluindo RAC1b, deixando as GTPases num estado inerte e inativo (Shutes et al., 2007).

Com o objetivo de corroborar os estudos que demonstram que a estimulação da expressão de NIS, embora desencadeada por diferentes vias de sinalização intracelular, envolve a indução da atividade da cinase mitogénica p38 pela GTPase RAC1, após a estimulação de TSH ou de AMPc (Kogai & Brent, 2012; Pomerance et al., 2000, Kogai et al., 2012) e que, por outro lado, a variante RAC1b demonstra poder competir com RAC1, inibindo a sua atividade endógena em diversas vias de sinalização, incluindo a via que leva à ativação da cinase p38 (Matos et al., 2008; Silva, Carmo & Bugalho, 2013), quantificámos os níveis da cinase p38 e da sua variante fosforilada, após a sobre-expressão de RAC1/1b. Os resultados obtidos demonstraram apenas um efeito significativo quando a linha celular PCCL3 foi transfectada com a variante RAC1 L61. RAC1 L61, tanto na ausência, como na presença de TSH, demonstrou estimular a ativação de p38, havendo um aumento dos níveis da proteína fosfo-p38. Apesar de aparentar existir diferenças nos níveis de fosfo-p38 no caso da variante RAC1b *wt*, na presença de TSH, este resultado não parece ser relevante dada a diferença existente também nos níveis da proteína p38 total (Figura III.17.). Assim, apenas se pode considerar o efeito estimulatório de RAC1 L61 na ativação da proteína p38, efeito este que não foi observado com a sobre-expressão das variantes RAC1b.

Numa segunda parte deste trabalho, procedemos à construção de dois vetores de expressão do NIS contendo marcas peptídicas específicos para permitir a análise da modulação pós-traducional deste simportador. Com o objetivo de validar a expressão dos dois construtos

produzidos, recorreu-se à transfecção num sistema heterólogo extratiroideu, a linha celular HEK293 por ser possível com esta linha obter elevadas eficiências de transfecção. Através da análise por imunofluorescência e *Western blot* foi possível confirmar a expressão destes construtos, através da utilização de anticorpos específicos para as marcas CFP e HA (Figura III.19). Com base na imunofluorescência, foi também possível confirmar a localização membranar do NIS proveniente da expressão de ambas as construções (Figura III.20.), sugestivo de que o tráfego do simportador transfectado se encontra preservado, pelo menos neste sistema celular.

V. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

No presente trabalho investigámos o papel das GTPases RAC1 e RAC1b na expressão de NIS num sistema celular representativo de tecido tiroideu normal, responsivo à estimulação com TSH. Contribuímos igualmente para o desenvolvimento de sistemas repórter para que numa segunda abordagem possamos proceder a estudos da modulação pós-traducional do NIS, que permitam superar os baixos níveis de expressão de NIS observados nos carcinomas da tiróide e de facilitar e tornar a deteção da localização subcelular do NIS sensível e específica.

Os resultados obtidos neste trabalho suportam um papel da sinalização RAC1/1b na regulação da expressão do NIS. Na linha celular PCCL3 encontramos uma correlação inversa entre a sobre-expressão de RAC1b e os níveis de mRNA de NIS, evidenciando para um possível papel de RAC1b na inibição dos níveis de expressão do NIS. Contrariamente ao esperado, o efeito da sobre-expressão de RAC1 sobre os níveis de NIS não foi notório nos nossos ensaios. Porém, quando se inibiu a expressão endógena desta GTPase observou-se uma diminuição dos níveis do simportador de sódio e iodo, suportando a hipótese de que RAC1 possa ter um papel na estimulação transcricional de NIS. Os resultados deste estudo apontam também para um efeito na estimulação da ativação da proteína fosfo-p38 induzido por RAC1. Será interessante em trabalhos futuros testar se a expressão de NIS envolve a indução da atividade da cinase mitogénica p38 por parte da GTPase RAC1 e em que medida RAC1b poderá interferir nesta via.

Relativamente aos construtos produzidos neste trabalho, será relevante obter níveis de eficiência de transfecção mais elevados nos sistemas celulares de tecido da tiróide, utilizando, por exemplo, a metodologia de transdução viral ou transfecção estável. Posteriormente, será bastante interessante analisar em que medida a sinalização de RAC1/1b poderá também afetar a regulação pós-traducional de NIS, nomeadamente a sua localização subcelular. Numa segunda abordagem, também seria interessante avaliar alterações nos níveis de expressão de NIS após o silenciamento da expressão de RAC1b, em linhas celulares primárias de tiróide RAC1b positivas, através da metodologia de RNA de interferência específica para RAC1b, e verificar o efeito da sinalização RAC1/1b na captação de iodo.

Assim, esperamos que este trabalho represente um início da compreensão do mecanismo regulatório da expressão de NIS, e que possa contribuir para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos no tratamento de carcinomas derivados de células foliculares da tiróide.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Aboelnaga, E. M., & Ahmed, R. A. 2015. Difference between papillary and follicular thyroid carcinoma outcomes: an experience from Egyptian institution. *Cancer Biology & Medicine*, 12, 53–59.
- Ahn, B.-C. 2012. Sodium Iodide Symporter for Nuclear Molecular Imaging and Gene Therapy: From Bedside to Bench and Back. *Theranostics*, 2(4), 392–402.
- Arturi, F., Russo, D., Schlumberger, M., Villard, J. D. U., Caillou, B., Vigneri, P., Suarez, H. G. (1998). Iodide Symporter Gene Expression in Human Thyroid Tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(7), 2493–2496.
- Ashkenazi, R., Gentry, S. N., & Jackson, T. L. 2008. Pathways to Tumorigenesis — Modeling Mutation Acquisition in Stem Cells and Their Progeny, 10(11), 1170–1182.
- Balani, S., Nguyen, L. V., & Eaves, C. J. 2017. Modeling the process of human tumorigenesis. *Nature Communications*, 8(May), 1–10.
- Baldwin, K. M. Papillary Thyroid Carcinoma. 2016. Disponível em: < <https://emedicine.medscape.com/article/282276-overview>>. Acesso em: 2 de Agosto de 2017.
- Bhajjee F., Nikiforov Y. E. 2011. Molecular analysis of thyroid tumors. *Endocr Pathol* 22:126-133.
- Cancro da Tiroide. Disponível em: < <http://www.normaseregras.com/normas-abnt/referencias/>>. Acesso em: 2 de Agosto de 2017.
- Castro, M. R., Bergert, E. R., Goellner, J. R., Hay, I. A. N. D., & Morris, J. C. 2001. Immunohistochemical Analysis of Sodium Iodide Symporter Expression in Metastatic Differentiated Thyroid Cancer: Correlation with Radioiodine Uptake. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(11), 5627–5632.
- Chung, J., Youn, H. W., Kang, J. H., Lee, H. Y., & Kang, K. W. 2010. Sodium Iodide Symporter and the Radioiodine Treatment of Thyroid Carcinoma. *Korean Society of Nuclear Medicine*, 4–14.
- Chung, J., & Cheon, G. J. 2014. Review Article Radioiodine Therapy in Differentiated Thyroid Cancer: The First Targeted Therapy in Oncology. *Endocrinology and Metabolism*, 233–239.
- Cooper, G.M. 2000. The Development and Causes of Cancer. In *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>.
- Costamagna, E., García, B., & Santisteban, P. 2004. The Functional Interaction between the Paired Domain Transcription Factor Pax8 and Smad3 Is Involved in Transforming Growth Factor- β Repression of the Sodium/Iodide Symporter Gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(5), 3439–3446.

- Dai, G., Levy, O., Carrasco, N. 1996. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature*. 379(6564):458-60.
- Darrouzet, E., Lindenthal, S., Marcellin, D., Pellequer, J., Pourcher, T. 2014. The sodium/iodide symporter: State of the art of its molecular characterization. *BBA - Biomembranes*, 1838(1), 244–253.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B.A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J.W.C., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Weber, B.L., Seigler, H.F., Darrow, T.L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C.J., Wooster, R., Stratton, M.R. and Futreal, P.A. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949-954.
- DeLellis, R.A., Lloyd, R.V., Heitz, P.U., and Eng, C. 2004. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon France.
- Dohán, O., Carrasco, N. 2003. Advances in Na⁺/I⁻ symporter (NIS) research in the thyroid and beyond. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 213(January 2004), 59–70.
- Dohán, O., Vieja, A. D. La, Paroder, V., Riedel, C., Artani, M., Reed, M., Carrasco, N. 2003. The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Characterization, Regulation, and Medical Significance. *Endocrine Reviews*, 24(1), 48–77.
- Dotto J, Nosé V. Familial thyroid carcinoma: A diagnostic algorithm. *AdvAnatPathol* 2008; 15(6):332-49.
- Durante, C., Haddy, N., Baudin, E., Leboulleux, S., Hartl, D., Travagli, J. P., Schlumberger, M. 2006. Long-Term Outcome of 444 Patients with Distant Metastases from Papillary and Follicular Thyroid Carcinoma: Benefits and Limits of Radioiodine Therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(8), 2892–2899.
- Ellis, H. 2003. Anatomy of the thyroid, parathyroid and suprarenal(adrenal) glands. *Surgery*, pp. 289-291.
- Faria, M., Capinha, L., Simões-Pereira, J., Bugalho, M. J., & Silva, A. L. 2016. Extending the Impact of RAC1b Overexpression to Follicular Thyroid Carcinomas. *International Journal of Endocrinology*, (December).
- Fiegen, D., Haeusler, L., Blumenstein, L., Herbrand, U., Dvorsky, R., Vetter, I. R., & Ahmadian, M. R. 2004. Alternative Splicing of Rac1 Generates Rac1b, a Self-activating GTPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4743–4749.

- Filetti, S., Bidart, J., Arturi, F., Caillou, B., Russo, D., & Schlumberger, M. 1999. Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism. *European Journal of Endocrinology*, 141, 443–457.
- García, B., & Santisteban, P. 2002. PI3K Is Involved in the IGF-I Inhibition of TSH- Induced Sodium / Iodide Symporter Gene Expression. *Molecular Endocrinology*, 16(September), 342–352.
- Graf, H. 2005. Carcinoma de Tireóide Pouco Diferenciado: Novas Considerações Terapêuticas, 49, 711–718.
- Grizzi, F., Ieva, A. Di, Russo, C., Frezza, E. E., Cobos, E., Muzzio, P. C., & Chiriva-internati, M. 2006. Theoretical Biology and Medical Cancer initiation and progression: an unsimplifiable complexity, 6, 1–6.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2000. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. *Cell*, 100, 57–70.
- Ho, A. L., Grewal, R. K., Leboeuf, R., Sherman, E. J., Pfister, D. G., Deandreis, D., Fagin, J. A. 2013. Selumetinib-Enhanced Radioiodine Uptake in Advanced Thyroid Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 368(7), 623–632.
- Jordan, P., Brazão, R., Boavida, M. G., Gespach, C., & Chastre, E. 1999. Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene*, 18, 6835–6839.
- Jordan, P., Gonçalves, V. e Matos, P. 2006, Alternative splicing changes regulation and signalling properties of the small GTPase Rac1. In: *Alternative Splicing and Cancer*, (Ed) J. P. Venables, Transworld Research Network, Kerala (India), pp. 45-65.
- Kawano, Y., Kaneko-Kawano, T., & Shimamoto, K. 2014. Rho family GTPase-dependent immunity in plants and animals, 5(October), 1–12.
- Klausner, R. D. 2002. The fabric of cancer cell biology — Weaving together the strands, 1(February).
- Klubo-gwiezdzinska, J., Burman, K. D., Nostrand, D. Van, Mete, M., Jonklass, J., & Wartofsky, L. 2012. Radioiodine Treatment of Metastatic Thyroid Cancer: Relative Efficacy and Side Effect Profile of Preparation by Thyroid Hormone Withdrawal Versus. *THYROID*, 22(3), 310–317.
- Kogai, T., Brent, G. A. 2012. The Sodium Iodide Symporter (NIS): Regulation and Approaches to Targeting for Cancer Therapeutics. *Pharmacol Ther*, 135(3), 355–370.

- Kogai, T., Endo, T., Saito, T., Miyazaki, A., Kawaguchi, A., & Onaya, T. 1997. Regulation by Thyroid-Stimulating Hormone of Sodium/Iodide Symporter Gene Expression and Protein Levels in FRTL-5 Cells. *Endocrinology*, 138(6), 2227–2232.
- Kogai, T., Liu, Y., Mody, K., Shamsian, D. V, & Brent, G. A. 2012. Regulation of Sodium Iodide Symporter Gene Expression by Rac1 / p38 β Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Pathway in MCF-7 Breast Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(5), 3292–3300.
- Kogai, T., Sajid-Crockett, S., Newmarch, L. S., Liu, Y., & Brent, G. A. 2008. Phosphoinositide-3-kinase inhibition induces sodium/iodide symporter expression in rat thyroid cells and human papillary thyroid cancer cells. *Journal of Endocrinology*, 199, 243–252.
- Kogai, T., Taki, K., & Brent, G. A. 2006. Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 13, 797–826.
- Kondo, T., Ezzat, S., and Asa, S.L. 2006. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nature Reviews Cancer* 6: 292-306.
- Levy, O., Dai, G., Riedel, C., Ginter, C.S., Paul, E.M., Lebowitz, A.N., Carrasco, N., 1997. Characterization of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 5568–5573.
- Levy, O., Vieja, A. De La, Ginter, C. S., Riedel, C., Dai, G., & Carrasco, N. 1998. N-linked Glycosylation of the Thyroid Na⁺/I⁻ Symporter (NIS). *The Journal of Biological Chemistry*, 273(35), 22657–22663.
- Loeb, L. A., Loeb, K. R., & Anderson, J. P. 2003. Multiple mutations and cancer, 100(3), 776–781.
- Lopes, M. S., Castro, J. J. de, Marcelino, M., Oliveira, M. J., Carrilho, F., Limbert, E., & Tiróide, G. de E. da. (2012). Iodo e Tiróide: O que o Clínico Deve Saber. *Acta Med Port*, 25(3), 174–178.
- Macconail, L. E., & Garraway, L. A. 2010. Clinical Implications of the Cancer Genome. *Journal of Clinical Oncology*, 28(35), 5219–5228.
- Maciel, R. M. B. 1998. Carcinoma Diferenciado da Tiróide (Papilífero e Folicular): Diagnóstico e Conduta. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 42(4).
- Matos, P., Collard, J. G., & Jordan, P. 2003. Tumor-related Alternatively Spliced Rac1b Is Not Regulated by Rho-GDP Dissociation Inhibitors and Exhibits Selective Downstream Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50442–50448.
- Matos, P., Jordan, P. 2008. Increased Rac1b Expression Sustains Colorectal Tumor Cell Survival, 1(July), 1178–1185.
- Matos, P., Jordan, P. 2006. Rac1, but Not Rac1B, Stimulates RelB-mediated Gene Transcription in Colorectal Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(19), 13724–13732.

- Matos, P., Oliveira, C., Velho, S., Gonçalves, V., Costa, L. T. da, Moyer, M. P., Jordan, P. 2008. B-RafV600E Cooperates With Alternative Spliced Rac1b to Sustain Colorectal Cancer Cell Survival. *Gastroenterology*, (May).
- Matos, P., Skaug, J., Marques, B., Beck, S., Verissimo, F., Gespach, C., Boavida, M.G., Scherer, S.W. and Jordan, P. 2000. Small GTPase Rac1: Structure, Localization, and Expression of the Human Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 277: 741-751.
- Matsuo, S. E., Martins, L., Leoni, S. G., Hajjar, D., Ricarte-Filho, J. C. M., Ebina, K. N., & Kimura, E. T. (2004). Marcadores Biológicos de Tumores Tiroidianos. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 48, 114–125.
- Muro-Cacho, C.A. and Ku, N.N.K. 2000. Tumours of the thyroid gland: histologic and cytologic features – part 1. *Cancer Control* 7 (3): 276-287.
- Nguyen, Q. T., Lee, E. J., Huang, M. G., Park, Y. I., Khullar, A., & Plodkowski, R. A. 2015. *Diagnosis and Treatment of Patients with Thyroid Cancer*, 8(1).
- Nikiforov, Y.E. and Nikiforova, M.N. 2011. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nature Reviews Endocrinology* 7: 569-580.
- Nussey, S. and Whitehead, S. 2001. *Endocrinology: An integrated approach*. Oxford: BIOS Scientific Publishers.
- Pinto, W. de J., Áreas, M. A., Marialva, J. E. de, & Cardoso, S. M. G. 2010. Topologia do importador tireoideano sódio/iodeto. *Rev. Ciênc. Méd.*, 19, 53–63.
- Pomerance, M., Abdullah, H., Kamerji, S., Corrèze, C., & Blondeau, J.-P. 2000. Thyroid-stimulating Hormone and Cyclic AMP Activate p38 Mitogen-activated Protein Kinase Cascade. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(51), 40539–40546.
- Riedel, C., Levy, O., Carrasco, N. 2001. Post-transcriptional Regulation of the Sodium / Iodide Symporter by Thyrotropin. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 21458–21463.
- Riesco-Eizaguirre, G., Rodríguez, I., Vieja, A. De La, Costamagna, E., Carrasco, N., Nistal, M., Santisteban, P. 2009. The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer Res.* 69 (21): 8317–25.
- Riesco-Eizaguirre, G., & Santisteban, P. 2006. A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications. *European Journal of Endocrinology*, 155, 495–512.
- Sahai, E. and Marshall, C.J. 2002. Rho–GTPases and Cancer. *Nature Reviews Cancer* 2: 133-142.
- Santacroce, L. Follicular Thyroid Carcinoma. 2016. Disponível em: <<https://emedicine.medscape.com/article/278488-overview>>. Acesso em: 2 de Agosto de 2017.

Sapienza, M. T., Endo, I. S., Neto, G. C. C., Tavares, M. G. M. 2005. Tratamento do Carcinoma Diferenciado da Tireóide Com Iodo-131: Intervenções Para Aumentar a Dose Absorvida de Radiação, 49, 341–349.

Seeley, R. R., Stephens, T. D., Tate, P. 2003. Glândulas Endócrinas. In: Seeley, R. R., Stephens, T. D., Tate, P. Anatomia & Fisiologia 6ª ed. pp. 609-625.

Serpa, J., & Dias, S. 2011. Metabolic cues from the microenvironment act as a major selective factor for cancer progression and metastases formation Metabolic cues from the microenvironment act as a major selective factor for cancer progression and metastases formation, Cell Cycle, 10:2, 180-181.

Seyfried, T. N., & Shelton, L. M. 2010. Cancer as a metabolic disease. Nutrition & Metabolism, 1–22.

Shen, D. H. Y., Kloos, R. T., Mazzaferri, E. L., & Jhiang, S. M. 2001. Sodium Iodide Symporter in Health and Disease. THYROID, 11(5).

Shutes, A., Onesto, C., Picard, V., Leblond, B., Schweighoffer, F., & Der, C. J. 2007. Specificity and Mechanism of Action of EHT 1864 , a Novel Small Molecule Inhibitor of Rac Family Small GTPases. The Journal of Biological Chemistry, 282(49), 35666–35678.

Silva, A. L., Carmo, F., & Bugalho, M. J. 2013. RAC1b overexpression in papillary thyroid carcinoma: a role to unravel. European Journal of Endocrinology, 168, 795–804.

Silva, A. L., Faria, M., Capinha, L., & Bugalho, M. J. 2016. RAC1b: A New Player in the Scenario of Thyroid Tumorigenesis?. Advances in Molecular Diagnostics, 1(1), 1–5.

Smith, V. E., Read, M. L., Turnell, A. S., Watkins, R. J., Watkinson, J. C., Lewy, G. D., Fong, J. C. W., James, S. R., Eggo, M. C., Boelaert, K., Franklyn, J. A., McCabe, C. J. 2009. A novel mechanism of sodium iodide symporter repression in differentiated thyroid cancer. Journal of Cell Science, 122(18), 3393–3402.

Soares, P., Celestino, R., Melo, M., Fonseca, E., Sobrinho-Simões, M. 2014. Prognostic biomarkers in thyroid cancer. Virchows Archiv 464: 333-346.

Soares, P., Lima, J., Preto, A., Castro, P., Vinagre, J., Celestino, R., Sobrinho-Simões, M. 2011. Genetic Alterations in Poorly Differentiated and Undifferentiated Thyroid Carcinomas. Current Genomics, 12(8), 609–617.

Souza, E. C. L. de, Padrón, Á. S., Braga, W. M. O., Andrade, B. M. de, Vaisman, M., Nasciutti, L. E., Carvalho, D. P. de. (2010). mTOR downregulates iodide uptake in thyrocytes. Journal of Endocrinology, 206, 113–120.

Tennant, D. A., Durán, R. V., Boulahbel, H., & Gottlieb, E. 2009. Metabolic transformation in cancer. Carcinogenesis, 30(8), 1269–1280.

- Trapasso, F., Iuliano, R., Chiefari, E., Arturi, F., Stella, A., Filetti, S., Russo, D. (1999). Iodide symporter gene expression in normal and transformed rat thyroid cells. *European Journal of Endocrinology*, 140, 447–451.
- Vaisman, M., Rosenthal, D., & Carvalho, D. P. 2004. Enzimas Envolvidas na Organificação Tireoideana do Iodo. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 48, 7–13.
- Vieja, A. D. La, Dohan, O., Levy, O., & Carrasco, N. 2000. Molecular Analysis of the Sodium/Iodide Symporter: Impact on Thyroid and Extrathyroid Pathophysiology, 80(3), 1083–1105.
- Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., Guo, C. 2017. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8, 761–773.
- Wapnir, I. L., Goris, M., Yudd, A., Dohan, O., Adelman, D., Nowels, K., & Carrasco, N. 2004. The Na⁺/I⁻ Symporter Mediates Iodide Uptake in Breast Cancer Metastases and Can Be Selectively Down-Regulated in the Thyroid. *Clinical Cancer Research*, 10, 4294–4302.
- Wapnir, I. L., Rijn, M. Van De, Nowels, K., Amenta, P. S., Walton, K., & Carrasco, N. 2003. Immunohistochemical Profile of the Sodium / Iodide Symporter in Thyroid, Breast, and Other Carcinomas Using High Density Tissue Microarrays and Conventional Sections. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(4), 1880–1888.
- Wartofsky, L., Nostrand, D. V. 2006. *Thyroid Cancer – A Comprehensive Guide to Clinical Management*. Second Edition, 122.
- Wennerberg, K., Der, C. J. 2004. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *Journal of Cell Science*, 117, 1301–1312.
- Wennerberg, K., Rossman, K. L., & Der, C. J. 2005. The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science*, 118, 843–846.
- Wolff J, Chaikoff IL, Goldberg RC, Meier JR. 1949. The temporary nature of the inhibitory action of excess iodide on organic iodine synthesis in the normal thyroid. *Endocrinology*. 45(5):504-13.
- Zhang, Z., Liu, D., Murugan, A. K., Liu, Z., & Xing, M. 2014. Histone deacetylation of NIS promoter underlies BRAF V600E-promoted NIS silencing in thyroid cancer. *BRAF Mutation and NIS Histone Deacetylation*, 161–173.
- Zhou, C., Licciulli, S., Avila, J. L., Cho, M., Troutman, S., Jiang, P., Kissil, J. L. 2013. The Rac1 splice form Rac1b promotes K-ras-induced lung tumorigenesis. *Oncogene*, 32(7), 903–909.

VII. ANEXOS

Tabela VII.1. Soluções e concentrações finais para o *Western blot*.

Soluções	Concentração final
Sample buffer	1 U/ μ L Benzonase (<i>Sigma</i>); 5 mM MgCl ₂ ; 200 mM Tris-HCl, pH 6.8; 5% Glicerol; 2% SDS; 100 mM DTT; 0.1% (v/v) Azul de Bromofenol
SDS-PAGE gel de resolução	Tampão de gel de resolução (375 mM Tris/HCl pH 8.8); 10% Acrilamida; 0.1% (v/v) SDS; 0.05% (v/v) TEMED; 1% (v/v) APS
SDS-PAGE gel de concentração	Tampão de gel de concentração (62.5 mM Tris/HCl pH 8.8); 4% Acrilamida; 0.1% (v/v) SDS; 0.05% (v/v) TEMED; 1% (v/v) APS
Blot buffer	25 mM Tris-HCl (pH 7.6); 192 mM Glicina; 20% Metanol; 0.03% SDS
Solução Destain	10% (v/v) Ácido Acético; 45% (v/v) Metanol
TBST	50 mM Tris-HCl pH 7.5; 150 mM NaCl; 15 mM Triton X-100
Solução 1 ECL	100 mM Tris pH 8.8; 3,75 mM Luminol; 450 μ M Ácido Cumárico
Solução 2 ECL	100 mM Tris pH 8.8; 0.1% (v/v) Peróxido de Hidrogénio