

HERIKA SANTINON D. ARMOND

*AValiação CLÍNICA DO ESTUDO DA EXPRESSÃO DE NIS
EM TECIDO TIROIDIANO, DA DETECÇÃO DE NIS EM
SANGUE PERIFÉRICO E DE MUTAÇÕES DO GENE.*

CAMPINAS

2002

i

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNISAMP

HÉRIKA SANTINON DUARTE ARMOND

***AValiação CLÍNICA DO ESTUDO DA EXPRESSÃO DE NIS
EM TECIDO TIROIDIANO, DA DETECÇÃO DE NIS EM
SANGUE PERIFÉRICO E DE MUTAÇÕES DO GENE.***

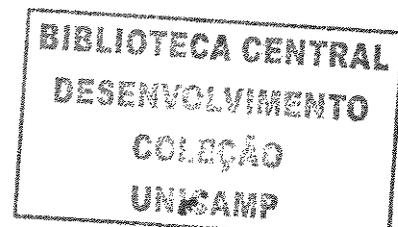
*Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Mestre em Clínica Médica, Área de
Clínica Médica.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. LAURA STERIAN WARD

CAMPINAS

2002

ii



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	J/UNICAMP
	Ar55a
V	EX
TOMBO BC/	69198
PROC.	16.122.06
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11.00
DATA	29.06.06

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Bib ID 383029

Ar55a Armond, Hérika Santinon Duarte
Avaliação clínica do estudo da expressão de nis em tecido tiroidiano,
da detecção de nis em sangue periférico e de mutações do gene /
Hérika Santinon Duarte Armond. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Laura Sterian Ward
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

I. Carcinoma. 2. Tireóide. I. Hérika santinon Duarte Armond.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.

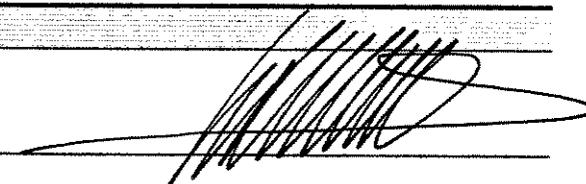
Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): *Profa. Dra. Laura Sterian Ward*



Membros:

1. Professor Doutor Wilson Araújo da Silva Júnior



2. Professora Doutora Edi Lúcia Sartorato



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

Data: 28.02.2002

200 613620

DEDICATÓRIA

“ Aos meus pais, que me deram a oportunidade de conhecer o medo, o trabalho, a solidão, a amizade..., enfim pude aprender o que é viver, que sempre lutaram para que nada me faltasse, quem sabe até seus sonhos renunciaram, para que muitas vezes pudesse realizar os meus, como este que se concretiza.” Obrigada!!!

A Deus MARAVILHOSO, pelo dom da vida, pelos ensinamentos, pelo amor...

A Deus (no sentido mais amplo da palavra- afinal Deus não precisa de nome...nós é que necessitamos nomeá-lo) pois “ O senhor é o meu Pastor e nada me faltará”

As minhas amadas filhas CATHARINA E GABRIELA, que fazem a razão principal da minha luta, obrigada meus amores, por entender tanta ausência, mal humor, enxugar minhas lágrimas, escutar minhas aulas...AMO VOCÊS!!!!!! ♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥

Ao meu querido Pai Ivan, você chegou em um momento muito difícil da minha vida, e me deu e dá a maior força (literalmente a maior de todas) para continuar firme, você é muito importante e Maravilhoso, obrigada pelo seu carinho e o seu amor! AMO VOCÊ!!!! ♥♥♥♥

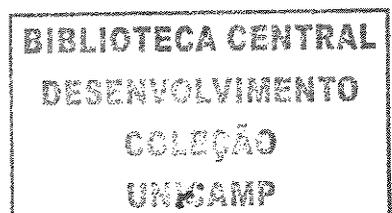
A Inês, Linda! Obrigada pelo seu carinho, sempre solícita, amiga, interessada nas minhas coisas, na minha tese, obrigada pelo ombro, ouvido.... Te adoro!!!!♥ ♥

Aos meus pais Márcia e Luiz, obrigada por me proporcionar o estudo e a compreensão do ser humano, através de lutas, sacrifícios, sonhos... Com seu amor, vocês foram companheiros, confortando e participando de todo momento e me incentivando a prosseguir... Esta conquista devo a vocês, ninguém merece tanto! AMO VOCÊS!!!!!! ♥♥♥♥

Ao Wladi, por todo seu apoio em tudo que precisei, obrigado por “brigar” por mim, por me ouvir quando preciso....Adoro Você!!!!!! ♥♥

Ao queridos, César, Renata, Isa e Baby, amo vocês. ♥♥....obrigada por tudo que vocês tem feito na minha vida, carinho, ajuda, palavras, força....

Ao meu querido e amado” HABIBI” ☺, William a você que chegou em um momento muuuuuito importante da minha vida, e deu a maior força, paz, tranquilidade, felicidade, para continuar firme na tese e terminá-la, obrigada pelo seu carinho,” risos”, “corrida”, “estrelas”.... Obrigada de coração! ♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥



A Dra. Laura, pessoa maravilhosa, inteligente, dedicada, corajosa, que me recebeu há alguns anos atrás, confiou em uma recém formada (desesperada) e me deu a chance de conhecer o fascinante mundo da Genética, obrigada Mami!!!

A profa. Dra. Edi, pelo curso maravilhoso onde todo meu conhecimento começou, pela inestimável ajuda, por participar da minha banca, pela amizade, pelo ombro e pelos risos, valeu Edi!!!! Te adoro!!!! Sucesso!!!

À equipe da Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Unicamp, e todos os residentes e funcionários pela colaboração com as amostras de tecido à fresco.

À equipe da Cirurgia de Tórax do Hospital das Clínicas da Unicamp, e todos os residentes e funcionários pela colaboração com as amostras de tecido à fresco.

Ao Dr. Wilson Araújo Silva Jr, pela paciência de me ensinar, e pela inestimável ajuda que me deu num momento muito delicado do meu trabalho e por participar da minha banca Obrigada!!!

A Meire e a Beatriz do Hemocentro da USP de Ribeirão Preto, muito obrigada pela ajuda e ensinamentos.

A Dra. Janete Cerruti, e Dra. Rosa Biscolla, pelos ensinamentos preciosos, pelos primers que sempre funcionaram, Obrigada!!!

A prof.dra. Ligia por participar da minha banca de qualificação, obrigada pelos comentários e elogios..

A prof. Dra. Olga por participar da minha banca de qualificação, pelos comentários, elogios e participar do meu strogonoff,.....

Ao Dr. Câmara Lopes , Dra Kátia, Cláudia , Elaine e a todos do laboratório de Patologia do Hospital Sírio Libanês, obrigada pela ajuda de vocês, pelo uso do laboratório, pelos tumores , os bolos de aniversário (Deliciosos!!!) tudo foi de fundamental importância para meu trabalho....

Ao Dr. Alfio e Dr. Gilson, queridos, sem a ajuda de vocês, seria impossível colher os tumores, a dedicação de vocês foi imprescindível, obrigada também por me fazer sorrir, mesmo que dentro de um centro cirúrgico..valeu!!!!

Ao Mestre, amigo, irmão e maravilhoso Diotto, por todo ensinamento, você me ensinou a vencer, enfrentar águas turvas, meu muito obrigado é pela luta e amizade, forças que me acompanharão quando essas águas chegarem a mim!!

Adoro Você!!!!!!!!!!!!!!♥

A mestra com carinho, Miralva, por tudo que é, por tudo que ensina e como ensina, obrigada pelo livro maravilhoso (em português ☺) pelo carinho!!! Um beijo! Te adoro!!!! ♥

Ao Marcos Alves, você foi o início de tudo, obrigada por ter confiado em mim, seus ensinamentos foram imprescindíveis, para que eu me apaixonasse pela pesquisa Valeu!!!

Ao dr. João Ernesto, pela amizade, carinho, confiança, por ter me recebido no seu laboratório, pelos congressos... Obrigada!!!!

A minha irmã “Galvão”, Elaine obrigada pelos risos, pelas “brigas”, pelos “porquês?”, pela caminhada, pelas descobertas que fizemos juntas, por tudo que vivemos, Ah! Pela divisão até dos lanches, por alegrar o laboratório, já estou com saudades....

As amigas (os) do laboratório (GEMOCA), que sempre me ajudaram quando foi necessário (Patrícia, Fabí, Janaína, Gabriela, Márcia,Lilian, Nilton e Rafael) ficará na minha memória os momentos que passamos juntos... os bons principalmente, não se apagarão e ouviremos por muito tempo ainda o eco de nossos risos....Obrigada gente!!!!!!

A Simone, amiga, companheira, obrigada pelos empréstimos, pelos socorros, pela companhia nos congressos (eterna amiga de quarto) você é demais!!!! ☺☺☺

Ao meu querido, amado e homólogo amigo Jefferson (Jhé), seu incentivo, carinho, paciência,amor, respeito me fez chegar até aqui! Você foi importante em TUDO!!!!!! Sem você tenho certeza que seria “impossível” você é maravilhoso!!!! OBRIGADA por todos os anos de dedicação!!!!!!

Ao Gustavo, amigo, profissional, você foi” maravilhoso” em todas as horas.... obrigada pelas “taqs” e todo material que utilizei na minha tese que sempre exigia URGÊNCIA (desculpa!!!!☺) , pelos churrascos, happy hour e lógico pela chácara! Obrigada!!!

A Viviane, pelos empréstimos, pelos risos na copinha, pela sua amizade, que tal um friozinho de 20°C? ☺☺

Ao Antonio e Jefferson , por todo serviço burocrático, pelos xerox, pela amizade e pelos risos, vocês são demais ☺

A Neli, pelo sorriso de toda manhã, pelo companheirismo, pelo cuidado com minha salinha de RNA, Ah! E pelo maravilhoso café de todo dia! Obrigada Neliiii!!! saudades....

A d. Ione, minha” mãezona”, amiga, ajudadora de todas as horas, obrigada por cuidar das meninas na minha ausência, obrigada pelas orações que me sustentaram, elas foram realmente todo o meu sustento, amo a senhora!!!! ♥

Ao Aparecido (AP),” meu grande amigo” que me recebeu no Centro de Pesquisas (CPQBA), obrigada por tanto carinho, respeito, dedicação, elogios...pelas ajudas imprescindíveis (telefone, inglês... você sabe...) ♥

Ao pessoal do CPQBA por tudo que me ensinaram, pela força, amizade, viagens...

(Marcia, Ana, Luciana, Érika, Patrícia...) vocês são muito importantes, obrigada por poder contar com vocês sempre!

A realização deste trabalho contou com apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

“Certa vez alguém chegou no céu e pediu pra falar com Deus, porque, segundo o seu ponto de vista, havia uma coisa na criação que não tinha nenhum sentido...

Deus o atendeu de imediato, curioso por saber qual era a falha que havia na Criação.

- Senhor Deus, sua criação é muito bonita, muito funcional, cada coisa tem sua razão de ser... mas no meu ponto de vista, tem uma coisa que não serve para nada – disse a pessoa para Deus.

- E que coisa é essa que não serve para nada? Perguntou Deus.

- É o horizonte. Para que serve o horizonte? Se eu caminho um passo em direção ao horizonte, ele se afasta um passo de mim. Se caminho dez passos, ele se afasta outros dez passos.

- Se caminho quilômetros em direção ao horizonte, ele se afasta os mesmos quilômetros de mim...

Isso não faz sentido! O horizonte não serve pra nada.

Deus olhou para aquela pessoa, sorriu e disse:

- Mas é justamente para isso que serve o horizonte...

“para faze-lo caminhar”

	PÁG
RESUMO.....	<i>xvi</i>
INTRODUÇÃO.....	19
OBJETIVOS.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
RESULTADOS.....	49
DISCUSSÃO.....	58
CONCLUSÕES.....	65
SUMMARY.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

CF	-	Carcinoma Folicular
CP	-	Carcinoma Papilífero
DGGE	-	Gel com gradiente desnaturante
EDTA	-	Ácido Etilenodiaminotetra acético
NEM	-	Neoplasia endócrina múltipla
NIS	-	Transportador de sódio/iodo
pb	-	Pares de bases
PCI	-	Pesquisa de corpo inteiro com radiodo
PCR	-	Reação de Polimerase em Cadeia
SDS	-	Dodecil sulfato de sódio
T4l	-	Tiroxina livre sérica
Tg	-	Tiroglobulina sérica
Tg Ac	-	Anticorpo anti-tiroglobulina
TSH	-	Tirotrofina sérica

	PÁG
Tabela 1: Classificação simplificada dos tumores da tiróide.....	25
Tabela 2: Pacientes estudados: nº de casos de cada diagnóstico anátomo-patológico.....	36
Tabela 3: Reagentes utilizados na extração de leucócitos.....	39
Tabela 4: Primers utilizados para amplificação do gene NIS.....	40
Tabela 5: Primers utilizados na amplificação do gene da β -actina.....	43
Tabela 6: Primers utilizados para amplificação do gene NIS para DGGE.....	45
Tabela 7: Reagentes utilizados no gel de poliacrilamida para DGGE.....	46
Tabela 8: Primers utilizados para amplificação do gene NIS em sangue periférico.	47
Tabela 9: Resumo dos dados relativos a metástases e/ou recidiva.....	55

	PÁG
Figura 1: Esquema Simplificado da base molecular do Câncer.....	24
Figura 2: Representação esquemática da biossíntese dos hormônios tireoidianos...	28
Figura 3: Desenho esquemático do gene humano NIS-co transportador de sódio/iodo.....	30
Figura 4: Esquema do NIS, mostrando vias de splicing alternativo da molécula...	31
Figura 5: Ciclo utilizado na amplificação dos exons 1, 4, 5, 6 e 8 do gene NIS a partir de Cdna.....	41
Figura 6: Ciclo utilizado na amplificação dos exons 1, 4, 5, 6 e 8 do gene NIS através do Nested PCR.....	42
Figura 7: Ciclo utilizado na amplificação dos exons 2 e 3 do gene da β actina.....	44
Figura 8: Ciclo utilizado na amplificação dos exons 4, 5 e 6 do gene NIS para DGGE.....	46
Figura 9: Ciclo utilizado na amplificação dos exons 4 e 6 do gene NIS em sangue periférico.....	48
Figura 10: Gel de agarose a 2% de produtos de PCR da β actina.....	50
Figura 11: Gel de agarose a 2% de produtos de PCR do gene NIS de casos normais.....	51
Figura 12: Gel de agarose a 2% de produtos de Nested PCR do gene NIS de casos tumorais.....	52
Figura 13: Gel de agarose a 2% de produtos de PCR do exon 4 do gene NIS em sangue periférico.....	53

Figura 14: Gel de agarose a 2% de produtos de PCR do exon 6 do gene NIS em sangue periférico.....	54
Figura 15: Gel de agarose a 2% de produtos de PCR de DNA de sangue periférico de um paciente.....	54
Figura 16: Gel de agarose a 2% de produtos de Nested PCR do gene NIS, painel A e painel B.....	56
Figura 17: Gel de poliacrilamida dos exons 4 e 6 para DGGE.....	57



RESUMO

A captação de iodo é um passo fundamental no metabolismo da célula folicular normal, que o utiliza na fabricação de hormônios tireoidianos. O tratamento cirúrgico, seguido de radioiodoterapia, possibilita a cura de grande parte dos pacientes com câncer bem diferenciado da tiróide que possuem a característica de manter a capacidade de captar iodo. Infelizmente, cerca de 20% dos casos de câncer de tiróide que não são bem diferenciados, além de uma parte dos próprios tumores bem diferenciados, não responde bem e, apesar dos esforços cirúrgicos e radioterápicos, evolui com recidivas e culmina com a morte do paciente. Com a identificação do gene que codifica a glicoproteína intramembranosa responsável pelo transporte de iodo para a célula folicular, chamado NIS, tem-se tentando relacionar a falta de captação de iodo com a não expressão do gene e, portanto, pior prognóstico de alguns casos

Estudamos um total de 77 tecidos tireoidianos comparando 27 carcinomas (21 carcinomas papilíferos e 6 carcinomas foliculares) com 8 tumores benignos (adenomas foliculares). Também incluímos 39 bóciós benignos (33 bóciós multinodulares, 4 casos de doença de Hashimoto e 2 casos de Graves). Foram ainda estudados 3 carcinomas medulares da tiróide. Utilizando a técnica *nested-PCR*, que inclui o gene β -actina como controle de DNA na reação, identificamos a expressão do gene NIS em todos os casos, inclusive nos carcinomas medulares de tiróide. A expressão do gene NIS foi encontrada mesmo no tecido tumoral de 2 casos que não apresentavam captação de radioiodo na pesquisa de corpo inteiro (PCI) apesar de apresentarem evidências de metástase com níveis séricos de tiroglobulina (Tg) elevados e/ou ultrassom positivo para neoplasia. A razão pela qual esses pacientes não captam iodo apesar de expressarem o gene NIS, poderia ser a ocorrência de mutações. Para verificar tal possibilidade, padronizamos a técnica de *screening* de mutações pela técnica de DGGE para estudo dos exons 4, 5 e 6 do gene. Não foram encontradas mutações nesses exons nos 57 casos investigados, sugerindo que, caso ocorram, as mutações do gene não devem ser as principais responsáveis pelas alterações na função da proteína NIS.

Como a proteína é produzida preferencialmente por células foliculares tireoidianas, pressupõe-se que indivíduos com câncer poderiam apresentar níveis séricos de NIS mais elevados do que indivíduos livres da doença. Assim, desenvolveu-se um ensaio

de PCR simples para detecção dos exons 4 e 6 de NIS em sangue periférico no intuito de verificar a possível utilidade deste parâmetro no acompanhamento de portadores de carcinomas diferenciados da tiróide. Em sangue periférico de 13 pacientes que possuíam o gene NIS expresso no tumor inicial e retornaram 6, 12 e 24 meses após a cirurgia, verificou-se que o gene NIS não era detectável em 4 casos: 2 carcinomas foliculares, 1 carcinoma papilífero e 1 caso de Graves. No entanto, o exon 6 de NIS foi positivo em todas as amostras com exceção de 1 caso que, apesar de apresentar metástases durante o seguimento, manteve NIS sérico indetectável. Assim, pode-se concluir que a pesquisa da expressão do gene NIS circulante não tem valor para seguimento clínico, não apresentando correlação com a presença de metástases e/ou recorrência.



INTRODUÇÃO

O CÂNCER

O câncer é conhecido desde o tempo em que as sociedades humanas aprenderam a registrar as suas atividades. Era bem entendido pelos antigos egípcios e as civilizações subseqüentes e, atualmente, rivaliza com as doenças cardiovasculares como principal causa de morte nos países desenvolvidos (LANDIS *et al*, 1998). A probabilidade de cada indivíduo desenvolver um câncer é expressa pela incidência nacional e pelas taxas de mortalidade. Assim por exemplo, os moradores dos Estados Unidos da América apresentam atualmente uma probabilidade em 5 de morrer de câncer. A cada ano, nos Estados Unidos, mais de 1 milhão de indivíduos descobrem que são portadores de algum tipo de câncer. Muitos desses tumores podem ser curados. Entretanto, de acordo com as estimativas da *American Cancer Society*, o câncer causou aproximadamente 564.000 mortes em 1998, sendo responsável por cerca de 23% de todos os casos de óbito (LANDIS *et al*, 1998).

Dados epidemiológicos sugerem que novos casos poderiam ser evitados, desde que estratégias preventivas fossem implementadas, já que 80 a 90% dos casos de câncer humano podem ser atribuídos a fatores ambientais, incluindo a dieta e aspectos sociais e culturais (OSBORNE *et al*, 1997). Existem notáveis diferenças nas taxas de mortalidade de formas específicas de câncer ao redor do mundo, sugerindo a influência de fatores geográficos e ambientais. Por exemplo, a taxa de mortalidade por carcinoma de estômago em ambos os sexos no Japão é sete a oito vezes maior do que nos Estados Unidos, onde a taxa de mortalidade por carcinoma de pulmão é mais que o dobro do que no Japão, e na Bélgica é maior que nos Estados Unidos .

O câncer ocorre por causa do dano genético herdado e/ou adquirido, alterando a expressão ou as propriedades bioquímicas de genes envolvidos na regulação do crescimento e diferenciação celular (BISHOP, 1987; KNUDSON, 1993; WARD, 1997). O câncer de pulmão, por exemplo, está na maioria dos casos, claramente relacionado com um fator adquirido, no caso, o fumo de cigarros, embora se tenha demonstrado que a mortalidade por câncer de pulmão é quatro vezes maior entre parentes não-fumantes (genitores e irmãos) de pacientes com câncer de pulmão do que entre parentes não-fumantes de controles (PANDER, 1997). As formas hereditárias incluem vários

cânceres bem definidos nos quais a herança de um único gene mutante aumenta acentuadamente o risco de desenvolver a doença. Assim, na síndrome de neoplasia endócrina múltipla do tipo 2, em que os pacientes desenvolvem o carcinoma medular da tireóide eventualmente associado a feocromocitoma, podem-se identificar mutações no gene *ret* em praticamente todos os portadores da doença (THAKKER, 2001).

BASES MOLECULARES DO CÂNCER

Sabe-se que o câncer ocorre devido a danos genéticos, adquiridos ou herdados, que conferem uma vantagem a uma célula, a qual consegue transmitir às suas células filhas esta vantagem, dando origem a um clone de células que escapa dos controles normais de crescimento e diferenciação (NAMBA *et al*, 1990). Essa alteração genética, ou mutação, pode ser adquirida pela ação de determinados agentes ambientais ou pode ser herdada na linhagem germinativa. Os agentes ambientais que danificam nossa bagagem genética podem ser grosseiramente divididos em:

- eventos químicos, como os clássicos ésteres de forbol, o benzeno nas leucoses, etc
- agentes físicos, como a radiação ultra-violeta, por exemplo, no câncer de pele ou a radiação ionizante e o câncer de tireóide, etc
- agentes biológicos como o Papilomavirus no câncer de colo de útero, etc.

Anormalidades tanto nos genes estimuladores de divisão celular (chamados de oncogenes), como nos protetores ou bloqueadores do ciclo celular (chamados de genes supressores tumorais), podem conferir a uma célula vantagens de crescimento e desenvolvimento sobre as células normais (WARD *et al*, 1998). Os genes que controlam o tempo de vida ou a morte celular, como o gene da telomerase, os genes envolvidos na apoptose e os genes de reparo do DNA também intervêm diretamente no processo de tumorigênese. Quanto mais tempo uma célula viver, maior será sua chance de adquirir mutações vantajosas em termos de crescimento e diferenciação. Os genes de reparo do

DNA controlam a proliferação ou sobrevivência das células indiretamente ao influenciarem a capacidade do organismo de reparar as lesões não letais em outros genes, incluindo os proto-oncogenes, genes supressores tumorais e genes que regulam a apoptose. Qualquer anormalidade nos genes de reparo do DNA pode causar mutações no genoma, levando assim, a uma transformação neoplásica. No entanto, para que um tumor progrida, vários outros genes devem se alterar. Sabemos que o processo de metástase é seletivo para as poucas células que conseguem produzir vasos (angiogênese), mover-se vencendo barreiras e invadindo as células vizinhas, cápsulas etc, que embolizam e sobrevivem na corrente sanguínea, param em leitos capilares distantes e extravasam e se multiplicam dentro do parênquima de outros órgãos. Todos estes passos requerem ativação e/ou desativação de uma série de genes. Existem vários genes envolvidos no reconhecimento, reparo ou programação da morte celular (apoptose), assim como genes envolvidos no controle imunológico de reconhecimento e reparo/destruição das células danificadas, genes capazes de interferir na capacidade de multiplicação à distância (p.ex. o gene nm23), invadir tecidos circunjacentes (p.ex. o gene da ialoproteína, o gene da MUC1 mucina), fatores angiogênicos capazes de prover aporte nutricional a estas células de crescimento acelerado (p.ex. o gene VEGF) e vários outros, fundamentais para a progressão de um clone tumoral primário para fenótipos mais agressivos com invasão e metastatização à distância (FIDLER, 1997).

Outro conceito fundamental para a compreensão da tumorigênese tireoidiana é o de instabilidade genômica. Quando a célula sofre grandes danos que sobrepujam a sua capacidade de reparação, torna-se sujeita a sofrer alterações grosseiras, como translocações, perdas de material cromossômico, ampliações, etc. Também sabemos que existe uma relação entre o agente causador deste dano e o grau de heterogeneidade do clone celular que se desenvolverá, o que, por sua vez, guarda estreita relação com a capacidade de algumas destas células adquirirem resistência terapêutica e, portanto, definirem pior prognóstico ao tumor (WARD, *et al*, 1998). Estas anormalidades, evidenciadas por estudos citogenéticos, existem com maior frequência nos tumores menos diferenciados da tireóide, como o carcinoma folicular e o anaplásico (WARD, 1997).

O PROCESSO DE CARCINOGENÊSE

A carcinogênese é, felizmente, um processo lento e difícil, que se compõe de múltiplas etapas, tanto do ponto de vista fenotípico quanto genético. Uma neoplasia maligna possui atributos fenotípicos, como crescimento excessivo, invasão local e capacidade de formar metástases. Todas estas características são adquiridas de modo gradativo, sendo que, a cada etapa, as células transformadas vão adquirindo vantagens. Este fenômeno é denominado progressão tumoral, e resulta do acúmulo de lesões genéticas, que em alguns casos, são favorecidas por defeitos no reparo do DNA (figura 1). Os genes que causam o câncer, ou os oncogenes, derivam dos proto-oncogenes, que são genes celulares que promovem o crescimento e diferenciação celular normais.

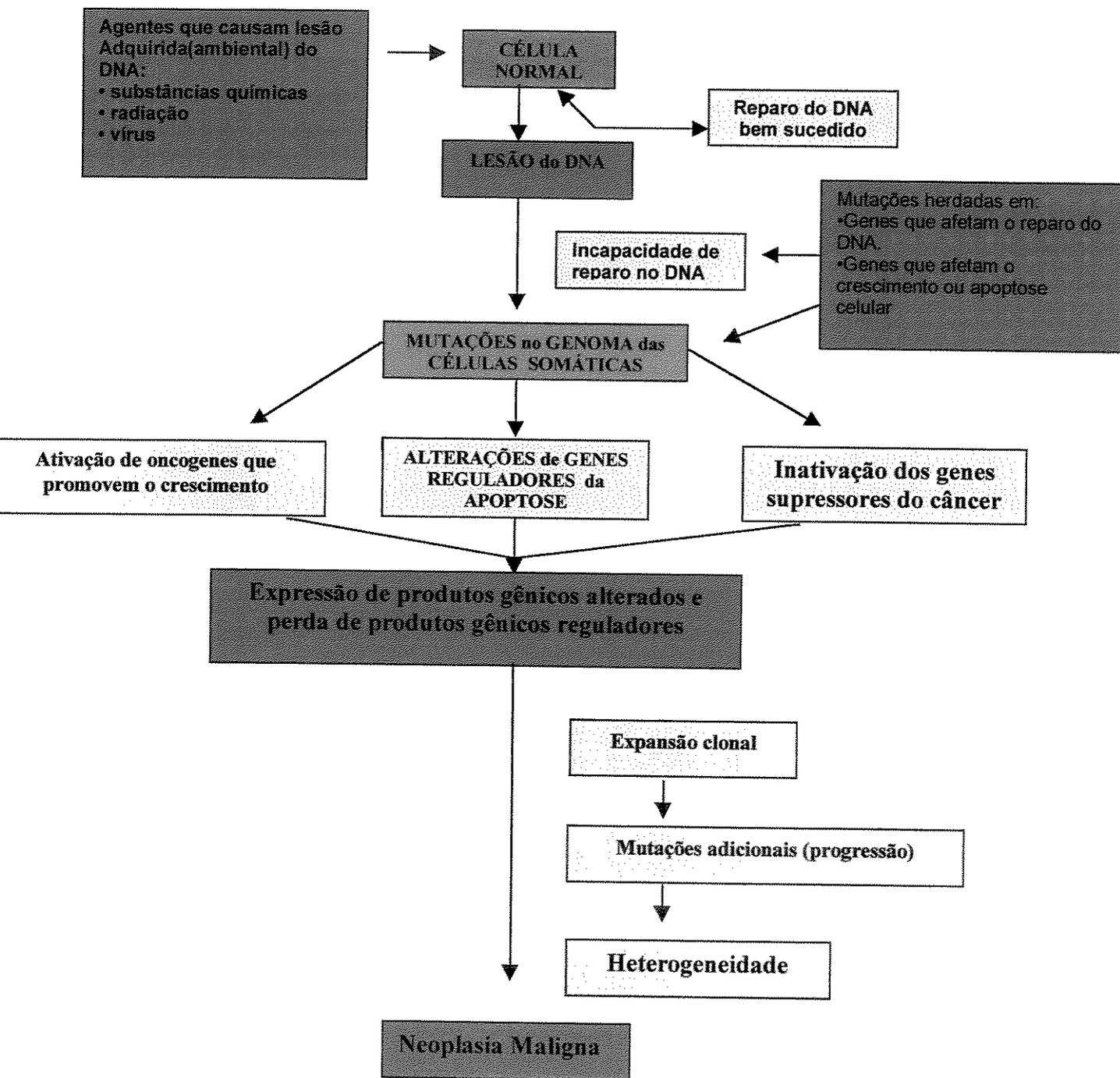


FIGURA 1: Esquema simplificado da base molecular do câncer.

O CÂNCER DE TIRÓIDE

O câncer de tiróide é o mais comum entre os cânceres de glândulas endócrinas, representando cerca de 90% destes e respondendo por 63% das mortes por neoplasias endócrinas. O câncer de tiróide responde por cerca de 1% de todos os cânceres que acometem o ser humano. A incidência é maior nos países onde o bócio é endêmico. Nestes países também existe maior prevalência das formas tumorais menos diferenciadas, como o carcinoma folicular e o anaplásico (WARD, 2000).

Se o câncer da tiróide é relativamente pouco freqüente, nódulos de tiróide, por outro lado, são extremamente prevalentes. Estima-se que 10% dos indivíduos adultos desenvolverão um nódulo durante a sua vida, e, embora a grande maioria seja benigna, surgem cerca de 12.000 novos casos de câncer de tiróide por ano nos Estados Unidos (SILVERBERG & LUBERA, 1989; KNUDSON, 1993).

O câncer de tiróide ocorre em todas as idades, com dois picos: o menor entre 7 e 20 anos, o maior entre 40 e 65 anos. A relação entre a população masculina e feminina é de 1:2. Cerca de 25% dos casos tem uma história prévia de bócio nodular (SHERMAN, 1993).

Os tumores da tiróide são classificados, de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde, em epiteliais, não epiteliais, miscelâneos, metástases de outros tumores e lesões pseudotumorais, podendo ser benignos e malignos (HEDINGER & SOBIN, 1974; WILLIANS & WILLIANS, 1989) (tabela 1).

TABELA 1: Classificação simplificada dos tumores da tiróide.

BENIGNOS	MALIGNOS
1. Bócio endêmico	1. Carcinoma folicular
2. Bócio esporádico	2. Carcinoma papilífero
3. Adenoma Folicular	3. Carcinoma medular
4. Outros	4. Carcinoma Anaplásico
	5. Outros

Os tumores benignos da tiróide são denominados adenomas. São raros, de origem epitelial, bem encapsulados, não invadem os tecidos vizinhos e não produzem metástases. Os tumores malignos da tiróide são raros e apresentam quadros clínicos extremamente variáveis, desde aqueles com crescimento muito lento e compatível com uma expectativa de vida normal, até aqueles com péssima evolução e que levam ao óbito em períodos de semanas ou meses. Têm como origem três diferentes tipos de células: as foliculares, as parafoliculares e as de origem não-tiroidiana. Os tumores diferenciados, que são a maioria absoluta dos derivados das células foliculares (mais de 80%), são subdivididos em 2 grupos, os papilíferos e os foliculares. Os indiferenciados ou anaplásicos constituem apenas 5 a 10% dos carcinomas tiroidianos. As células parafoliculares, produtoras de calcitonina, são responsáveis por cerca de 5% dos carcinomas tiroidianos, dando origem aos carcinomas medulares. Outras células parafoliculares não tiroidianas causam diversos tumores malignos da tiróide, que também não ultrapassam 5% do total. Entre eles se destacam os linfomas da tiróide, os carcinosarcomas, as lesões metastáticas, os teratomas e os hemangioendoteliomas.

A GLÂNDULA TIRÓIDE E O SISTEMA TRANSPORTADOR DE IODO

A tiróide é uma glândula endócrina de papel central no metabolismo intermediário de todos os tecidos e é de fundamental importância para o desenvolvimento do sistema nervoso central nos fetos e recém-nascidos. A glândula trabalha basicamente na biossíntese e secreção de dois únicos hormônios, triiodotironina (T3) e tiroxina (ou tetraiodotironina - T4). O iodo é um componente essencial de ambos (Figura 2). Assim, a função tiroídiana como um todo e todas as funções sistêmicas correlacionadas a ela, dependem de um adequado suprimento de iodo para a glândula. São eventos básicos para biossíntese dos hormônios tiroidianos:

► O transporte ativo de iodo via NIS contra um gradiente eletroquímico através da membrana plasmática basolateral para as células foliculares, e então sua translocação passiva via canais de iodo da membrana apical para dentro do colóide.

► Em uma reação complexa chamada de organificação do iodo, catalisada por uma peroxidase na interface entre célula e colóide, o iodo é oxidado e incorporado em resíduos específicos junto com uma molécula de tirosina. Tireoglobulina (Tg) iodada é armazenada no colóide e vai fornecendo resíduos iodados, que são destacados por hidrólise da molécula de Tg e endocitados, em resposta à demanda por hormônios da tiróide. Esses hormônios (T3 e T4) são secretados na circulação e as iodotirosinas não secretadas são metabolizadas a tirosina I-. Esse processo facilita a reutilização de iodo.

A concentração de iodo na glândula é muito superior à concentração plasmática (DEGROOT, 1995; WERN & INGBER, 1991). Um notável sistema, eficiente e especializado, garante que a maior parte do iodo ingerido na dieta seja acumulado na glândula e, dessa maneira, fique disponível para a biossíntese do T3 e T4. A importância deste sistema torna-se mais evidente quando considera-se que o iodo pode estar escasso no meio ambiente. Bócio endêmico e cretinismo, causados primariamente por insuficiência no suprimento de iodo, subsistem como importantes problemas de saúde em muitas partes do mundo, afetando milhões de pessoas (DELANGE, 1994; TYLER, 1996).

A habilidade das células foliculares em concentrar iodo foi reportada pela primeira vez em 1915 (MARINE *et al*, 1915). Para ser capaz de concentrar iodo 30 a 40 vezes mais do que no plasma, a glândula possui uma proteína intrínseca da membrana plasmática que efetua o transporte de iodo, juntamente com o de sódio para a tiróide. Algumas das propriedades desta proteína e do gene que a codifica foram elucidadas nestes últimos anos (CARRASCO, 1993; LEVY *et al*, 1997; SCHMUTZLER *et al*, 1998; SPITZWEG *et al*, 1998). Resumidamente, o acúmulo de iodo na tiróide ocorre por um transporte ativo, contra um gradiente eletroquímico, estimulado por tirotrófina (TSH) e bloqueado por inibidores competitivos, os ânions tiocianato e perclorato.

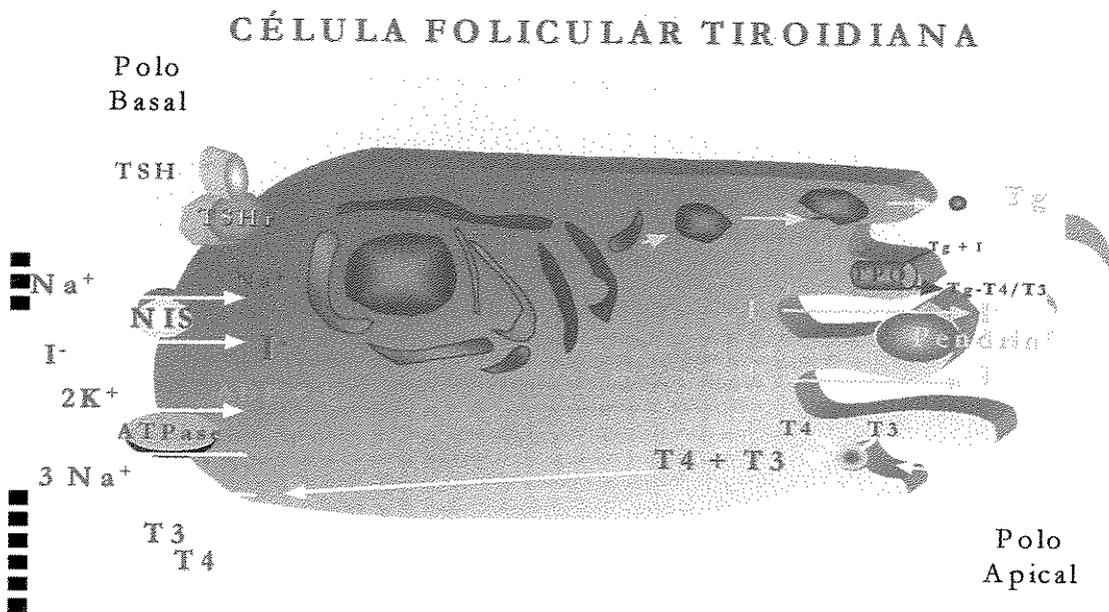


FIGURA 2: Representação esquemática da biossíntese dos hormônios tireoidianos.

O gene NIS é essencial para a produção de hormônios tireoidianos, de forma que qualquer alteração que resulte em modificação da sua expressão e/ou função resultará em uma disfunção tireoidiana, freqüentemente identificada pela ocorrência de hipotireoidismo congênito. Já existem várias descrições de defeitos genéticos do gene NIS implicados em casos de hipotireoidismo por disormonogênese (FUJIMARA *et al*, 1997; KOSUGI *et al*, 1998).

Além da função na produção hormonal, a via de incorporação e metabolização do iodo permite o diagnóstico e terapêutica de várias condições patológicas da glândula. Com o uso de iodo radioativo, desenvolveram-se métodos cintilográficos, muito utilizados no diagnóstico de tecido tireoideano hiperfuncionante ou não, tóxico ou ectópico. Doses farmacológicas de radioiodo podem destruir tecido tireoideano ou indicar sua presença, no caso das metástases, sendo utilizadas amplamente na radioiodoterapia do hipertireoidismo e do câncer de tiróide (TYLER, 1996).

O GENE NIS

Este gene foi inicialmente caracterizado no rato e posteriormente no homem, sendo denominado *sodium iodide symporter* ou NIS, pois o transporte de íons de iodo depende do co-transporte de íons de sódio (DEGROOT, 1995; DAÍ *et al*, 1996) (figura 3). Para a identificação do gene NIS, inicialmente construiu-se uma biblioteca de cDNA de rato a partir da linhagem celular FRTL-5. Determinou-se assim que o transporte de iodo ocorria na célula folicular do rato graças a uma proteína de 618 aminoácidos, com uma massa molecular de 65-196 kd. Em seguida, o gene do transportador de sódio-iodo foi clonado a partir de uma biblioteca de cDNA de tiróide humana (DAÍ *et al*, 1996, SMANIK *et al*, 1996).

O gene NIS humano está localizado no cromossomo 9p12-13.2, e codifica uma glicoproteína de 643 aminoácidos com uma massa molecular de aproximadamente 70-90 kd. A região codificante do gene NIS humano contém 15 exons, interrompidos por 14 introns e codifica 39 kd de mRNA (SMANIK *et al*, 1997). Como um membro da família de transporte sódio dependente, NIS é uma proteína de membrana intrínseca com 13 domínios transmembrana, um domínio extracelular amino terminal e um domínio intracelular carboxi-terminal (figura 3). A tirotrófina (TSH) estimula todas as etapas do metabolismo do iodo assim como seu transporte através do AMPc. A captação do iodo tanto *in vivo* como *in vitro*, assim como a expressão do gene NIS em cultura de células, são controladas pelo TSH.

O transportador de sódio-iodo media o transporte ativo de iodo na glândula tiróide mas também em outros tecidos, como as glândulas salivares, mucosa gástrica, glândulas lacrimais, glândulas mamárias em lactação, plexo coróide, corpo ciliar do olho, pele e placenta (STRUM *et al*, 1983; CARRASCO, 1999). O transporte de iodo em tecidos não tiroidianos, apesar de não ser dependente de TSH, de forma similar ao que ocorre na tiróide, sofre inibição por tiocianato e perclorato .

O gene Nis é uma molécula chave na patofisiologia da tiróide por traçar a rota pela qual o iodo atinge a glândula para biossíntese de hormônios e como um meio para diagnóstico cintigráfico de imagens da tiróide com radioiodo e tem servido como um meio

efetivo para doses farmacológicas de radioiodo para destruir tecidos hiperfuncionantes da tiróide, como em doença de Graves ou transporte de iodo em câncer de tiróide e suas metástases (DEGROOT, 1995, WERN *et al*, 1991). A captação de iodo pelas células tiroidianas é a pedra fundamental para o acompanhamento e tratamento de pacientes com câncer de tiróide. Uma vez diagnosticado, o câncer é extirpado por cirurgia e, a seguir, com o auxílio de ^{131}I , pesquisa-se e elimina-se eventuais restos tumorais ou áreas de metástases. A incapacidade em concentrar o iodo torna a terapia com ^{131}I ineficaz e, portanto, péssimo o prognóstico do paciente.

Co-transportador Humano Sódio/Iodo- NIS

adaptado de Levy et al, JBC 98

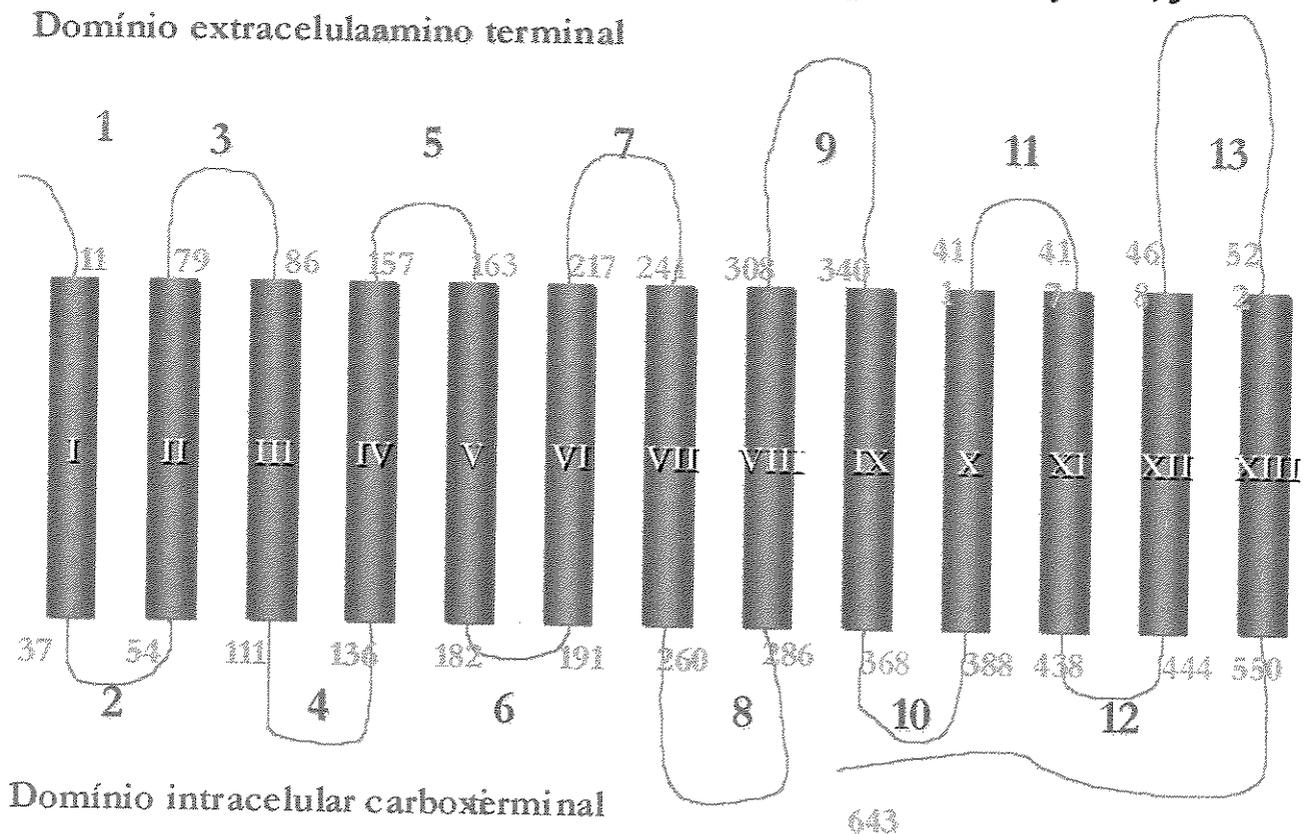


FIGURA 3: Desenho esquemático do gene humano NIS - co-transportador de sódio/iodo

DESCRIÇÃO DO SPLICING ALTERNATIVO

Foi descrito um *splicing* alternativo no gene, provavelmente responsável por alguns casos de hipotireoidismo congênito (SMANIK *et al*, 1997). Esta variante da transcrição do RNA mensageiro do gene poderia levar a uma parada prematura na transcrição do exon 6, conforme ilustra a figura 4. Aventa-se ainda uma função fisiológica do *splicing* alternativo na regulação do gene NIS em diferentes tecidos (SMANIK *et al*, 1997; SMANIK *et al*, 1996).

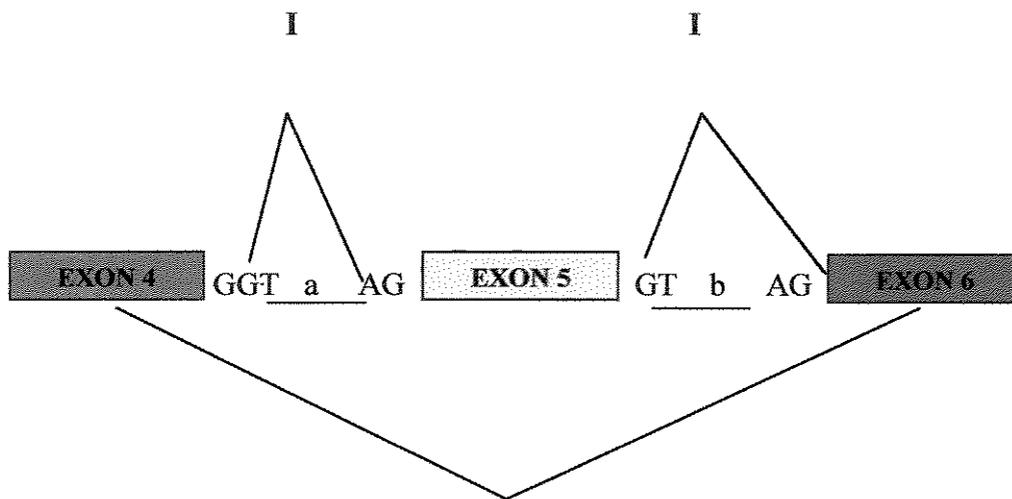


FIGURA 4: Esquema do NIS mostrando vias de *splicing* alternativo da molécula.

II

A – intron com 1.2 Kb

B – intron com 1.5 Kb

I – *Splicing* alternativo que resulta na codificação de transcrição do NIS inteiro;

II – *Splicing* alternativo que resulta na codificação de transcrição de NIS truncado, sem 155 pares de bases do exon 5, o que causa alteração da leitura de “frame shift” e um “stop códon” prematuro, indicando parada de transcrição no exon 6.



OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho :

- 1 . Determinar a expressão do gene NIS em:
 - ◆ Tecido normal
 - ◆ Tecidos com hiperplasia difusa (doença de Graves)
 - ◆ Tecidos com doença inflamatória (tiroidite de Hashimoto)
 - ◆ Nódulos tiroidianos benignos e malignos
2. Rastreamento de mutações, pela técnica de DGGE, no gene NIS em tumores tiroidianos benignos e malignos.
3. Estabelecer uma possível correlação entre a presença ou ausência de expressão do gene NIS e a evolução clínica dos portadores de neoplasias tiroidianas.



MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Os tecidos frescos foram coletados no Hospital das Clínicas FCM/UNICAMP, no Centro Médico de Barão Geraldo, no Hospital Sírio Libanês (SP) e no Hospital Amaral Carvalho (Jaú- SP). Todos os pacientes submetidos à cirurgia da tireóide foram contatados, devidamente informados deste projeto de pesquisa e assinaram termos de consentimento.

Durante os procedimentos intra-operatórios, uma fração de tecido tumoral da região central do tumor foi retirada, procurando-se a região mais homogênea e menos necrosada possível. Concomitantemente, outra porção de tecido tireoidiano proveniente de parênquima normal, assim como eventual tecido metastático ganglionar ou de outros tecidos cervicais foram separados do material enviado para estudo anátomo-patológico. Os tecidos obtidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80° C até a sua utilização. Uma amostra de sangue periférico também foi coletada durante a cirurgia, em tubo de polipropileno contendo EDTA 10% como anticoagulante. Logo após a coleta, o material foi mantido sob refrigeração a -4° C.

Todos os pacientes tiveram seus dados clínicos revistos e foram seguidos em seus retornos ambulatoriais normalmente agendados nos serviços de origem. Uma alíquota de sangue foi colhida a cada retorno ambulatorial, procurando-se obter amostras dos retornos ambulatoriais após 6, 12 e 24 meses da cirurgia. Todos os casos foram examinados cuidadosamente para definição do diagnóstico anátomo-patológico. Os casos de diagnóstico duvidoso ou nos quais o comportamento clínico do paciente não condizia com seu anátomo-patológico, foram revistos pela Profa Dra Patrícia Sabino Matos – Anatomia Patológica da FCM-UNICAMP.

CASUÍSTICA

Foram estudadas 77 amostras de portadores de lesão tireoidiana, conforme descrição da tabela 2. Também foram obtidos tecidos normais da tireóide de 22 pacientes.

TABELA 2: Pacientes estudados: número de casos de cada diagnóstico anátomo-patológico.

<i>DIAGNÓSTICO</i>	<i>TOTAL DE CASOS</i>	<i>SEXO</i>		<i>IDADE</i>
		<i>F</i>	<i>M</i>	
Ca. Papilífero	21	16	5	42±13
Ca. Folicular	6	5	1	57±17
Ca. Medular	3	3		33± 2
Basedow Graves	2	2		43± 1
Adenoma Folicular	8	6	2	36±24
Tiroidite de Hashimoto	4	4		42±16
Bócio	33	29	4	45±26
TOTAL	77			

DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos através de consultas aos prontuários de cada indivíduo ou por fornecimento do médico acompanhante . Os dados levantados foram: diagnóstico anátomo-patológico; níveis séricos de TSH e de T4 livre; níveis séricos de Tiroglobulina (Tg); presença ou ausência de metástases na pesquisa de corpo inteiro (PCI) com radiodo e/ou tecnécio, com ultrassom, RX ou outro método de imagem.

MÉTODOS

1. EXTRAÇÕES

Extração de RNA

Tecido fresco (~100mg) foi homogeneizado em 1ml de Trizol (*Life Technologies*) ainda congelado com nitrogênio líquido. O procedimento de extração de RNA consiste das seguintes etapas :

O homogeneizado foi incubado por 15 minutos a 30° C, seguido da adição de 200µl (0,2 ml por ml de Trizol) de clorofórmio, incubado 10 minutos a 30° C sob agitação e posteriormente centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos a 4° C, obtendo-se a separação de 2 fases: aquosa e orgânica. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa. Esta fase é então transferida para um novo tubo para a próxima etapa. Na terceira etapa, utilizou-se o álcool isopropílico 0,5 ml por ml de Trizol, incubou-se por 10 minutos a 30° C sob agitação, centrifugou-se a 14.000 rpm por 20 minutos a 4° C. O *pellet* formado no fundo do tubo foi lavado com álcool 90% (1ml de álcool por ml de Trizol) agitado e centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos a 4° C. O RNA foi secado por inversão dos tubos e ressuspensão em água DEPC (dietil pirocarbonato) livre de Rnase, sendo armazenado a -80° C. O RNA foi quantificado através de análise espectrofotométrica com medida de densidade óptica (OD) em 260-280nm.

Extração de DNA de tecido

Cerca de 50mg de tecido a fresco ainda congelado foram maceradas e o DNA foi extraído pelo método do Fenol/Clorofórmio com modificações.

Os tecidos foram digeridos com Proteinase K, incubados a 55° C durante 16 horas. A seguir, foram adicionados 430µl de fenol/clorofórmio (1:1), o tubo foi centrifugado a 12000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Esta fase foi repetida por mais 2 vezes. Na etapa seguinte foram adicionados 430µl de clorofórmio-álcoolisoamílico (24:1), o tubo foi centrifugado a 12000 rotações por minuto

(rpm) por 30 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Esta etapa foi repetida por mais 2 vezes. Posteriormente foram adicionado acetato de amônio (10mM) e etanol (100%) em volume correspondente à quantidade do sobrenadante obtido, o tubo foi centrifugado a 12000rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado, adicionando-se 500µl de etanol 70% gelado ao *pellet* no fundo do tubo. O DNA foi seco por inversão dos tubos e re-suspenso em 50µl de água deionizada duplamente filtrada.

Extração de DNA de leucócitos

O processo, consiste nos seguintes procedimentos:

O sangue periférico (3 ml) coletado em tubos contendo EDTA 10% foi centrifugado por 10 minutos a 2500rpm em temperatura ambiente. O plasma foi desprezado e a interfase foi transferida para um novo tubo, acrescentando-se tampão de lise de hemácias até completar 12 ml, centrifugado por 15 minutos a 2500rpm em temperatura ambiente (esta fase foi repetida por mais 3 vezes). A relação dos reagentes utilizados no procedimento se encontra na tabela 3. O tampão foi retirado e adicionado tampão de lise de leucócitos (10ml de tampão de lise de leucócitos com 4,2g de uréia). Após homogeneização foram adicionados 250µl de SDS 20%, o tubo foi agitado por inversão e incubado em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, foi acrescentado 2ml de fenol/clorofórmio saturado e 2ml de clorofórmio-álcoolisoamílico, o tubo foi centrifugado por 20 minutos a 3000rpm em temperatura ambiente. A fase superior foi então transferida para um novo tubo, acrescentado fenol-clorofórmio-álcoolisoamílico e centrifugado. O sobrenadante foi de novo transferido para um novo tubo, acrescentado 2ml de clorofórmio-álcool-isoamílico e centrifugado por 15 minutos a 300rpm. O DNA foi precipitado adicionando-se acetato de sódio 3M e etanol absoluto gelado e armazenado no freezer -20°C durante a noite. O DNA foi pescado com uma ponteira e transferido para um novo tubo e acrescentado etanol absoluto 500µl, centrifugado por 5 minutos a 13000rpm. O etanol foi retirado e acrescentou-se 500µl de etanol 70% gelado, centrifugou-se novamente 1 minuto a 13000rpm. O etanol foi desprezado e o DNA foi seco em temperatura ambiente por 20 minutos e ressuspenso em TE.

TABELA 3: Reagentes utilizados na extração de leucócitos

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO
	NaCl (10mM); MgCl ₂ (5mM); Tris-HCl
Tampão de lise de hemácias	(10mM, pH 7,5)
	NaCl (5N); EDTA (0,2M); Tris-HCl
Tampão da lise de leucócitos	(10mM, pH 7,5); Uréia
SDS	20%
Fenol Saturado com Tris	Fenol; Tris (10mM, pH 8)
Clorofórmio-álcool-isoamílico	24:1
Acetato de Sódio	3M
Etanol	100%
Etanol	70%
TE	Tris (10mM); EDTA (1mM)

2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

RT-PCR - Transcriptase Reversa

A análise da expressão do gene NIS nos diferentes tecidos tiroidianos foi feita através da técnica de RT-PCR, usando-se o kit SUPERSRIPT First Strand Synthesis System RT-PCR (*Life Technologies*). A técnica, foi realizada segundo etapas descritas a seguir, com amplificação em um volume final de 20 μ l. Os RNAs, obtidos na quantidade de 3 μ g, foram incubados com “random hexamers” (50ng/ μ l); dNTP mix (10mM); água DEPC para 10 μ l, seguidos por 2 minutos a 25°C em RT buffer (10X); MgCl₂ (25mM) e RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (1 μ l). Adicionado posteriormente 1 μ l (50 unidades) de SuperScript II, incubada a 25°C por 10 minutos e adicionado 1 μ l de Rnase H incubada a 37°C por 20 minutos. Para cada PCR, foram utilizados 2 μ l do cDNA. Um *primer* que acompanha o Kit foi usado para comprovar o sucesso da reação de RT-PCR.

Após a amplificação inicial, foi necessário realizar uma nested- PCR, pois o produto inicial obtido não era suficientemente claro para tornar o resultado confiável. Nested-PCR é uma reação feita com um primer desenhado internamente à seqüência da primeira reação, e ao invés de usar material original como base para a reação, é usado o produto de PCR da primeira reação como molde para a segunda.

Para comprovar a presença de cDNA ou de DNA genômico nas reações, utilizou-se concomitantemente β -actina na reação de PCR, como controle positivo. Em todas as reações de RT-PCR, assim como em todas as reações de PCR, usou-se um controle negativo da reação a partir de sobressalente da mistura empregada no preparo dos demais tubos (“mix”) porém sem o acréscimo de DNA. Reações em que havia evidência ou mesmo suspeita de contaminação foram desprezadas.

PCR

O gene NIS e o gene da β -actina foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se um termociclador Perkin Elmer 9600.

Os exons 1, 4, 5, 6 e 8 do gene NIS foram amplificados a partir de cDNA, pela técnica de PCR utilizando-se *primers* cujas seqüências são mostradas na tabela 4.

TABELA 4: Primers utilizados para amplificação do gene nis a partir de cDNA, com sua seqüência respectiva, o exon amplificado, o número de pares de bases (pb) obtidos e a temperatura de anelamento (annealing) correspondente a cada reação.

PRIMER	SEQUENCIA 5'-3'	EXON	PB	ANNEALING
RW33	TATCGCTATGGCCTCAAG	1	495	61°C
NISR1	TCTTCGAAGATGTCCAGCAC	8	495	61°C
RW31	ACCGGAATTATCTGCACC	4	203	62°C
NISR2	GGGTCAGGGTTAAAGTCCAT	5/6	203	62°C

A reação inicial de amplificação do gene NIS se deu nas seguintes condições:

5µl	10X PCR buffer [200mM tris-HCl (pH8.4), 500mM KCl]
3 µl	50mM MgCl ₂
1µl	10mM dNTP Mix
1µl	amplification primer sense (40pmol)
1µl	amplification primer antisense (40pmol)
1µl	taq DNA polymerase (5U/ul)
2µl	cDNA
36µl	H ₂ O destilada, autoclavada

Volume final da reação de 50µl

A figura 5 representa esquematicamente o ciclo utilizado nesta reação.

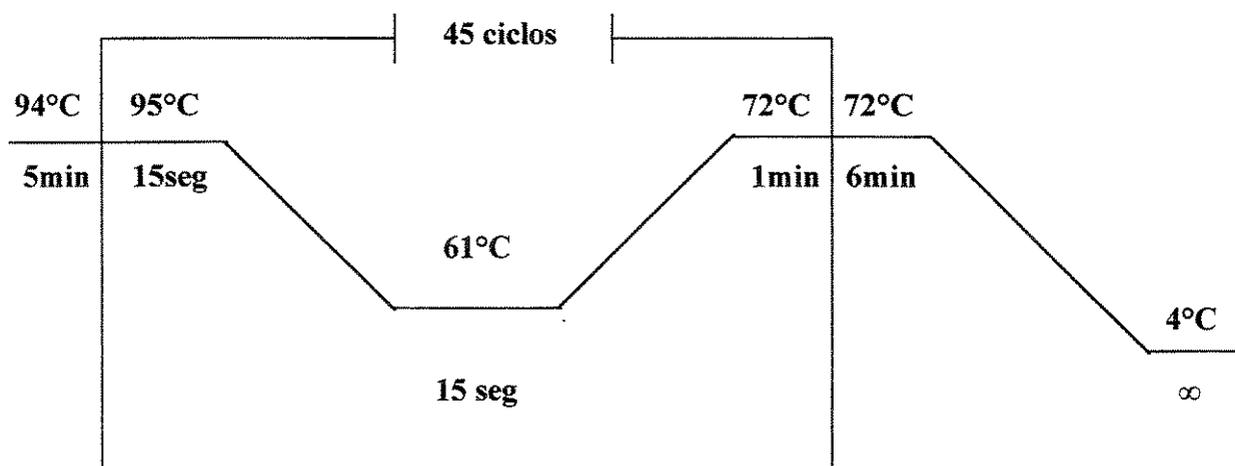


FIGURA 5: Ciclo utilizado na amplificação dos exons 1, 4, 5, 6 e 8 do gene NIS a partir de cDNA.

As condições utilizadas na amplificação de DNA a partir do produto de PCR anterior estão esquematizadas abaixo e na figura 6.

5µl	10X PCR buffer [200mM tris-HCl (pH8.4), 500mM KCl]
3 µl	50mM MgCl ²
1µl	10mM dNTP Mix
1µl	amplification primer sense (40pmol)
1µl	amplification primer antisense (40pmol)
1µl	<i>Taq</i> DNA polymerase (5U/ul)
2µl	Produto da reação de PCR
36µl	H ₂ O destilada, autoclavada

Volume final da reação de 50µl

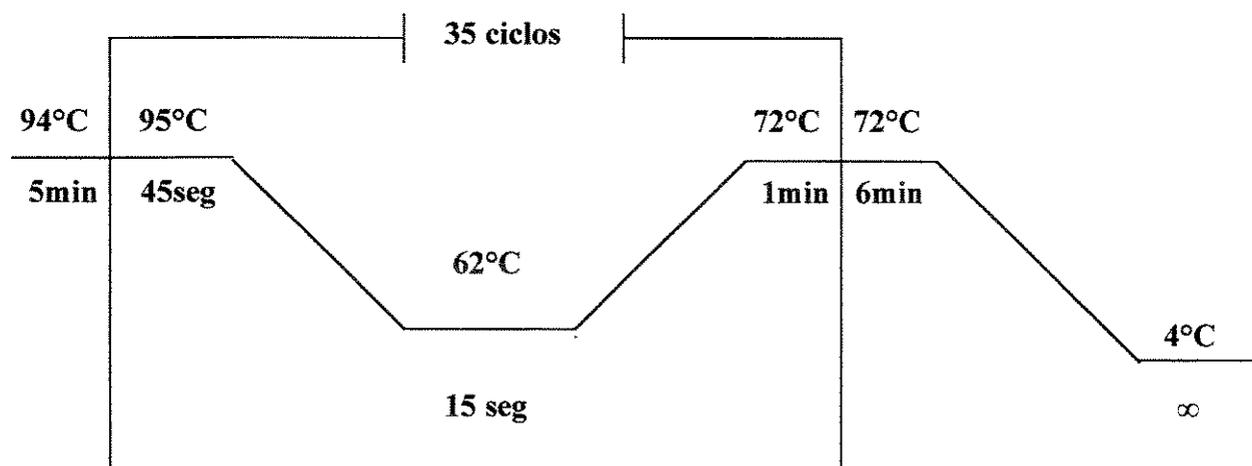


FIGURA 6: Ciclo utilizado na amplificação dos exons 1, 4, 5, 6 e 8 do gene NIS por nested PCR a partir de produto de PCR da reação anterior.

O gene da β -actina, um gene ubíquo, foi utilizado como controle da reação de PCR. Sua amplificação foi obtida a partir dos primers descritos na tabela 5 e com as condições apresentadas abaixo, estando o ciclo correspondente mostrado na figura 7.

TABELA 5: Primers utilizados para amplificação do gene β -actina, com sua respectiva sequência, o exon amplificado, o número de pares de bases (pb) obtidos e a temperatura de anelamento (*annealing*) correspondente a cada reação.

PRIMER	SEQUENCIA 5'-3'	EXON	PB	ANNEALING
β -actina	GCGAGAAGATGACCCAG	2	508	61°C
β -actina	GCCTGGATAGCAACGTA	3	508	61°C

As condições utilizadas na amplificação de DNA do gene da β actina estão esquematizadas abaixo e na figura 7.

2,5 μ l 10X PCR buffer [200mM tris-HCl (pH8.4), 500mM KCl]

0,75 μ l 50mM MgCl²

0,5 μ l 10mM dNTP Mix

1 μ l primer 1 sense (20pmol)

1 μ l primer 2 antisense (20pmol)

1 μ l *Taq* DNA polymerase (5U/ μ l)

1 μ l DNA

17,25 μ l H₂O destilada, autoclavada

Volume final da reação de 25 μ l

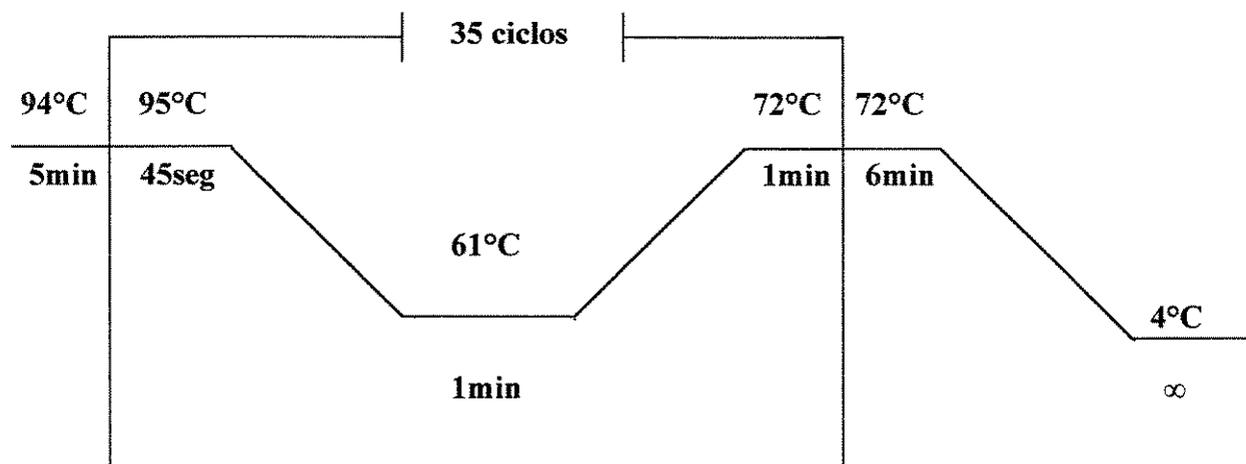


FIGURA 7: Ciclo utilizado na amplificação dos exons 2 e 3 do gene da β -actina.

ELETROFORESE

Os produtos resultantes da técnica de *nested* PCR e o controle β -actina foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio (8mg/ml) em tampão TBE (Tris 2M; EDTA 0,2M e ácido bórico). Aliquotas de 8 μ l de cada reação de amplificação por PCR foram homogeneizadas com 2 μ l de azul de bromofenol (0,25%), sacarose (40%) e visualizados sob UV. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (*Life Technologies*) para determinação dos tamanhos amplificados.

3. RASTREAMENTOS DE MUTAÇÕES NO GENE NIS

Para a pesquisa de possíveis mutações do gene NIS, padronizou-se a técnica para rastreamento, por DGGE (*Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis*). O método de DGGE vem sendo cada vez mais utilizado como principal abordagem metodológica para rastreamento de mutações pontuais e tem como fundamento o fato de que fragmentos de DNA que diferem por uma simples alteração de base (substituição, deleção ou inserção), podem ser separados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo um gradiente desnaturante de DNA ascendente (uréia e formamida). Na tabela 6 são descritas as seqüências utilizadas como primers para amplificação. Foram colocados em destaque os *clamps* de GC com sua localização.

TABELA 6: *Primers* utilizados para amplificação dos exons 4, 5 e 6 do gene NIS a partir de DNA, com sua sequência respectiva, o número de pares de base (pb) obtidos e a temperatura de anelamento (*annealing*) correspondente a cada reação. Em destaque, Clamp de GC, para a técnica de DGGE.

PRIMER	SEQUENCIA 5'-3'	EXON	PB	ANNEALING
HNISEX4	5' GCCCGCCGTCCCGGCCCGACCCCGCG S CGTCCGGCGCCCGGGAAGAGAAAGGGAGGGAGA3' 5' CTC CCC ACA AGA GAC ACA GT 3' AS	4	256	58,3°C
HNISEX6	5' CCCGCCCCCGCCCCCTCCCGCCCCGTCCCC S CTGGCGCCCCGCCCCCTATAAGGTCCAGAAGCGCT3' 5'GGG CAG CAT GTC CCA GAA A 3' AS	6	331	56,3°C
HNISEX5	5'CTGAGGCATAGAAGGGCATC 3' S 5' CGCCCCCGCGGGGCGGGTGGCGCCCGTC CCGGCCCGACCCCGCGCGTCCGGCGCCCGGCTGGA GTATCCTCTGCATT3' AS	5		53,0°C

A amplificação dos exons 4, 5 e 6 do gene NIS para DDGE se deu nas condições abaixo e o ciclo de PCR utilizado está representado na figura 8.

5µl	10X PCR buffer (200mM Tris-HCl (pH 8,4, 500mM KCl)
1,5µl	50mM MgCl ²
1µl	10mM dNTP Mix
3,4 µl	primer 1 sense (1µM)
1,9µl	primer 2 anti-sense (1µM)
1µl	DNA
0,8µl	taq DNA polymerase (5U/µl)
45,4µl	H2O destilada, autoclavada
Volume final da reação de 50µl	

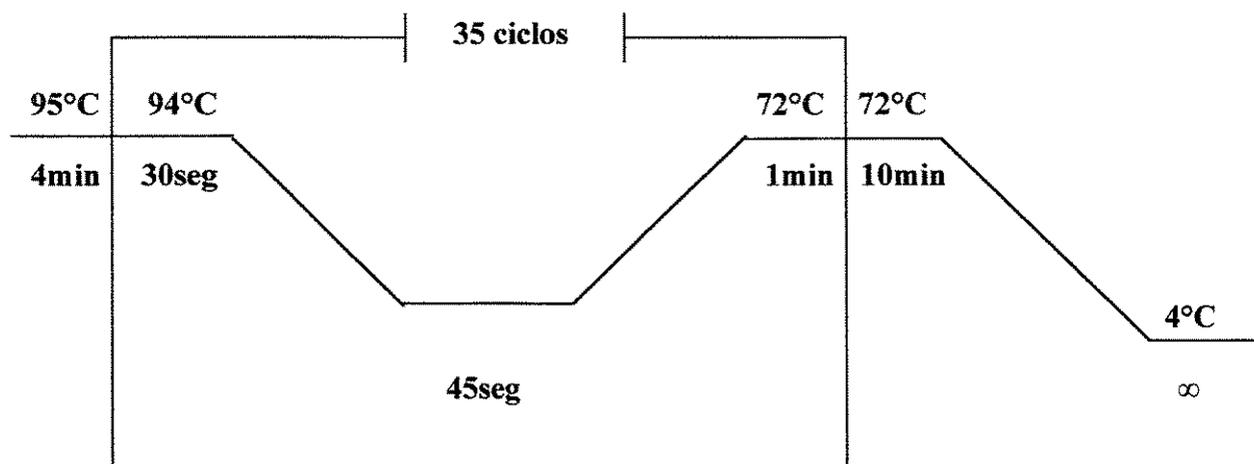


FIGURA 8: Ciclo utilizado na amplificação dos exons 4, 5 e 6 do gene NIS. A temperatura de annealing foi de 58,3°C (exon 4), 53°C (exon 6) e 59°C (exon 5)

A técnica de DGGE foi realizada utilizando o aparelho DCode System (BIO RAD), de acordo com as instruções do fabricante. O gel de poliacrilamida foi feito num gradiente decrescente de 0% a 80% utilizando-se os reagentes descritos na tabela 7.

TABELA 7: Reagentes utilizados no gel de poliacrilamida para DGGE.

REAGENTES	0%	80%
Uréia	–	100,8g
Formamida Deionizada	–	96ml
Acrilamida (40%)	45ml	45ml
TAE (50X)	6ml	6ml
H ₂ O q.s.p destilada	300ml	300ml
Persulfato de amônia (10%)	100µl	100µl
Temed	10µl	10µl

4. PESQUISA DO GENE NIS EM SANGUE PERIFÉRICO

Para verificar se a presença do gene NIS em sangue periférico poderia servir como parâmetro de seguimento clínico e se correlacionar com o aparecimento de recorrência e ou metástases à distância, estudou-se 65 casos em sangue periférico, sendo que em 27 casos foram obtidos também o tecido tumoral correspondente. O sangue foi coletado à beira do leito cirúrgico e com acompanhamento a cada 6 meses por 2 anos em 13 pacientes. Os *primers* foram sintetizados para os exons 4 e 6 do gene NIS para amplificação do DNA genômico, conforme tabela 8. Estes exons foram escolhidos porque, segundo a literatura eles podem conter mutações e o exon 6 possui um “splicing” alternativo que possivelmente inativaria funcionalmente o gene, como já descrito anteriormente.

TABELA 8 - *Primers* utilizados na amplificação do gene NIS em sangue periférico com sua respectiva sequência, o exon amplificado, o número de pares de bases (pb) obtidos e a temperatura de anelamento (*annealing*) correspondente a cada reação.

PRIMER	SEQUENCIA 5'-3'	EXON	PB	ANNEALING
NISE4(S)	GGAAGAGAAAGGGAGGGAGA	4	256	58,3°C
NISE4(AS)	CTCCCCACAAGAGACACAGT	4	256	58,3°C
NISE6(S)	CTATAAGGTCCAGAAGCGCT	6	331	56,3°C
NISE6(AS)	GGGCAGCATGTCCCAGAAA	6	331	56,3°C

A amplificação se deu nas seguintes condições:

5 μ l	10X PCR buffer (200mM Tris-HCl (pH 8,4, 500mM KCl)
1,5 μ l	50mM MgCl ₂
1,0 μ l	10mM dNTP Mix
1 μ l	primer 1 sense (40pmol)
1 μ l	primer 2 anti-sense (40pmol)
1 μ l	DNA
1 μ l	<i>Taq</i> DNA polymerase (5U/ μ l)
38,5 μ l	H ₂ O destilada, autoclavada

Volume final da reação de 50 μ l

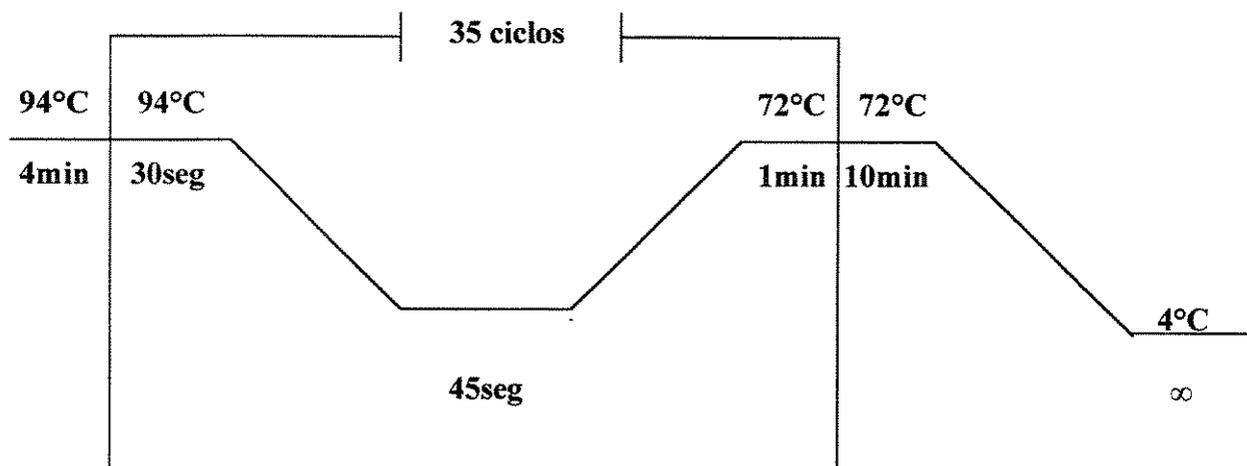


FIGURA 9: Ciclo utilizado na amplificação dos exons 4 e 6 do gene NIS em sangue periférico. a temperatura de annealing foi de 58,3° C (exon 4) e 56,3° C (exon 6).



RESULTADOS

A expressão do gene da β -actina foi obtida em todas as amostras indicando integridade do mRNA, do cDNA e do DNA do gene NIS em todos os tecidos investigados. A figura 10 mostra um resultado de PCR para β -actina realizado a partir de cDNA extraído de diferentes pacientes.

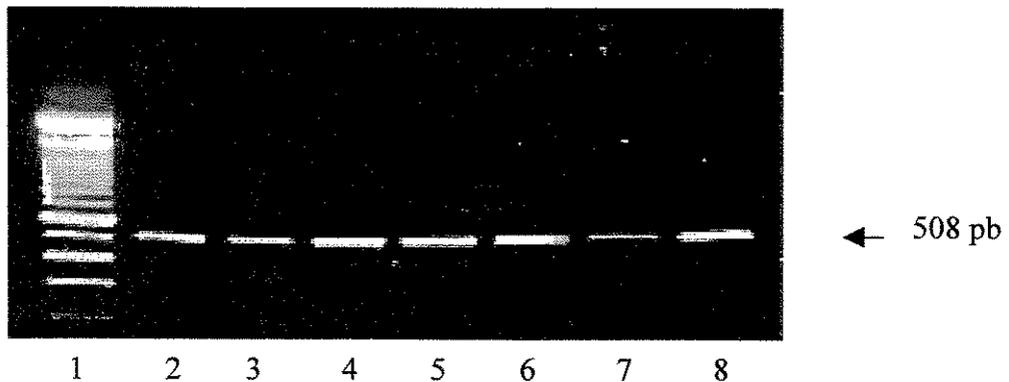


FIGURA 10: Gel de agarose 2% para visualização de produtos de PCR para amplificação de β -actina a partir de cDNA de diferentes pacientes.

Coluna 1: marcador de peso molecular para 100 pares de bases, **colunas 2 e 3:** Carcinomas Papilíferos; **colunas 4 e 5:** Carcinomas Foliculares; **coluna 6:** Carcinoma Medular da Tiróide; **colunas 7 e 8:** Bócio Multinodular Atóxico.

A análise de expressão do gene NIS foi positiva em todas as 77 amostras de tecidos estudados, incluindo os 3 casos de carcinoma medular da tiróide. Também foi positiva para todas as 20 amostras de tecido tiroidiano normal. A figura 11 apresenta o resultado da reação de PCR obtida a partir de cDNA em tecidos normais.

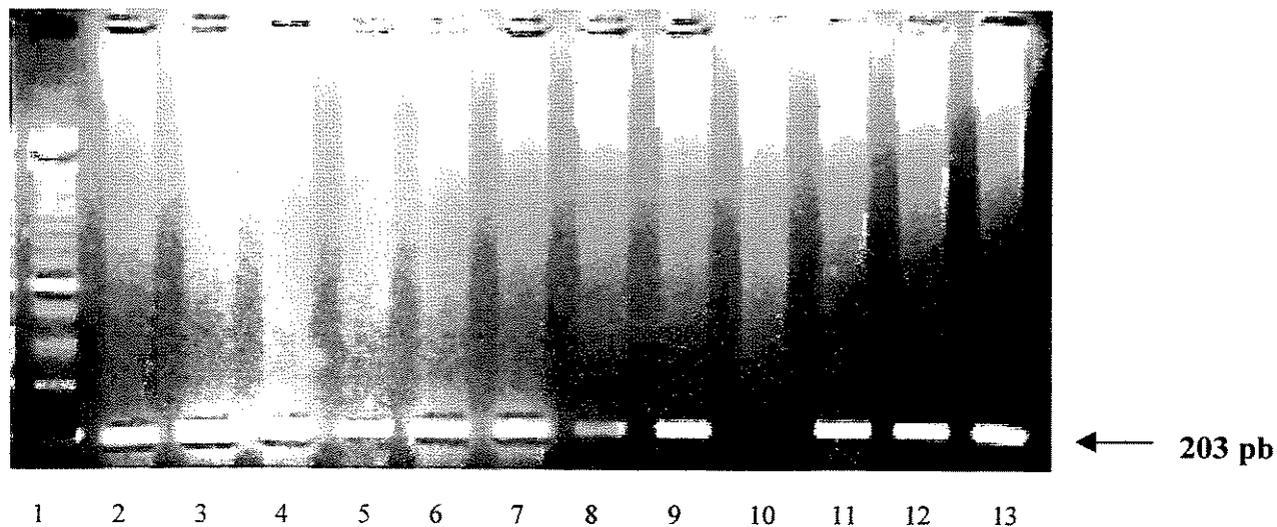


FIGURA 11: Gel de agarose 2% para visualização de produtos de nested-PCR para amplificação de parte do gene NIS a partir de cDNA de tecido tiroidiano normal de diferentes pacientes. A coluna 1 mostra um marcador de peso molecular de 100 pares de bases, colunas 1 a 9 tecido normal; coluna 10 controle negativo, colunas 11 a 13 tecido normal.

Na figura 12 é apresentado um exemplo de resultado de pesquisa de expressão do gene NIS pela técnica de *nested*-PCR realizada em tumores obtidos de diferentes pacientes

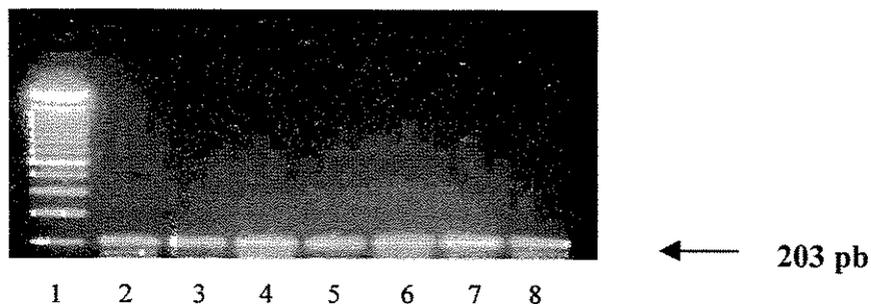


FIGURA 12: Gel de agarose 2% para visualização de produtos de nested-PCR para amplificação do gene NIS a partir de cDNA de tecido tireoidiano tumoral de diferentes pacientes.

Coluna 1: marcador molecular para 100 pares de bases, **colunas 2 e 3:** Carcinomas Papilíferos; **colunas 4 a 5:** Carcinomas Foliculares; **colunas 6 a 8:** Carcinomas Medulares da Tiróide.

Na pesquisa do gene NIS em sangue periférico, verificou-se a ausência de amplificação na PCR realizada para o exon 4 em 4 casos: 2 carcinomas foliculares, 1 carcinoma papilífero e 1 caso de doença de Graves em atividade. No entanto, 3 destes pacientes possuíam o gene NIS detectável para o exon 6. As figuras 13 e 14 demonstram os resultados obtidos com PCR para exons 4 e 6, respectivamente.

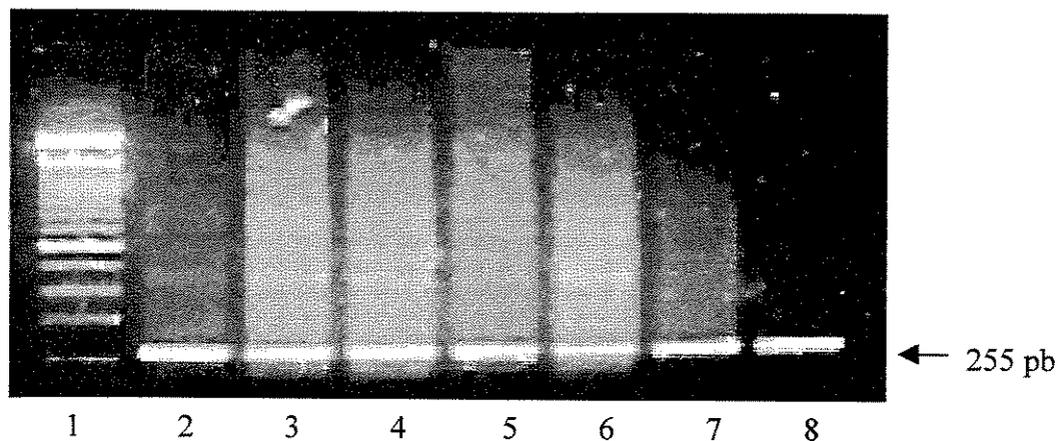


Figura 13: Exon 4: Gel de agarose 2%. Coluna 1: marcador molecular para 100 pares de bases; colunas 2, 3 e 4: sangue periférico de pacientes com carcinomas papilíferos 6 meses após a cirurgia; colunas 5 e 6: sangue periférico de pacientes operados há 12 meses; colunas 7 e 8: sangue periférico de pacientes operados há 24 meses.

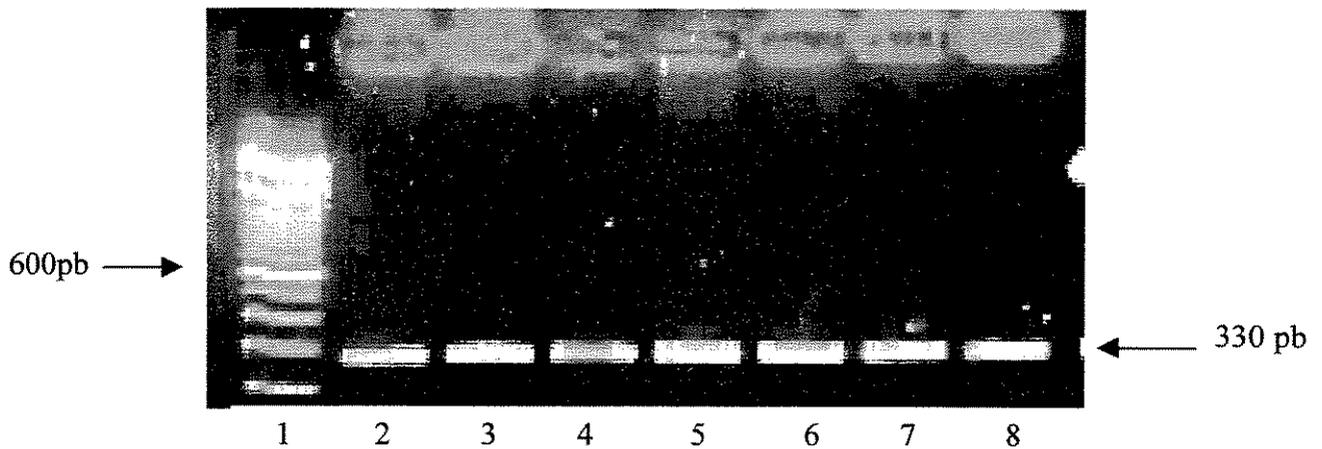


Figura 14: Exon 6: Gel de agarose 2% dos mesmos pacientes representados na figura 13. Coluna 1: marcador molecular para 100 pares de bases; colunas 2, 3 e 4: sangue periférico de pacientes com carcinomas papilíferos 6 meses após a cirurgia; colunas 5 e 6: sangue periférico de pacientes operados há 12 meses; colunas 7 e 8: sangue periférico de pacientes operados há 24 meses.

Em apenas 1 paciente (figura 15), os exons 4 e 6 não foram detectados em 3 diferentes reações de PCR realizadas com cada um dos *primers* para cada exon, embora a reação de PCR para β actina do paciente demonstrasse a integridade do DNA utilizado.

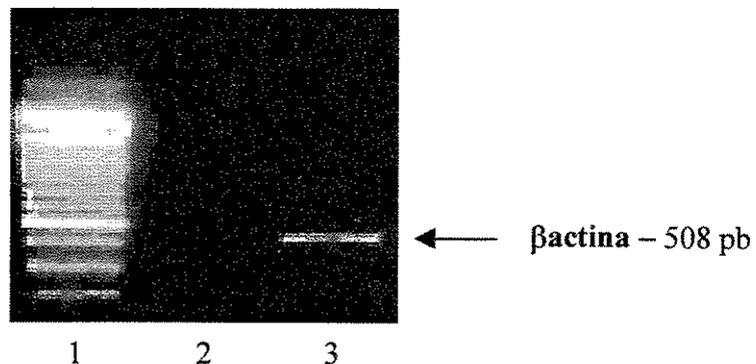


FIGURA 15: Gel de agarose 2% onde foram aplicados os produtos de PCR realizada a partir de DNA extraído de sangue periférico de um mesmo paciente. Coluna 1: marcador de peso molecular para 100 pares de bases; coluna 2: paciente com ausência de amplificação do exon 4 do gene NIS; coluna 3: controle de β actina, demonstrando a integridade do DNA utilizado.

Trata-se de caso de carcinoma papilífero, operado há cerca de 1 ano com PCI positiva para restos tiroidianos e gânglios cervicais (sub mandibulares esquerdo e vários cervicais).

Entre os outros 64 pacientes, foi verificada presença do gene NIS circulante em todos os casos, com amplificação positiva para os exons 4 e 6. Levantando os dados clínicos relativos à Pesquisa de Corpo Inteiro (PCI) com iodo radioativo, níveis hormonais e de tiroglobulina (Tg) de 13 pacientes acompanhados por um período mínimo de 24 meses (ver tabela 9), observou-se que alguns casos possuíam indícios de metástases e/ou recidiva. No entanto, NIS estava expresso no tumor primário e também no sangue periférico de todos os casos. A figura 12 mostra o estudo de alguns destes casos em particular.

TABELA 9: Resumo dos dados relativos a metástases e/ou recidiva em 13 casos acompanhados por um período mínimo de 24 meses.

TG		PCI		NIS	
+	-	+	-	+	-
7	6	5	8	13	0

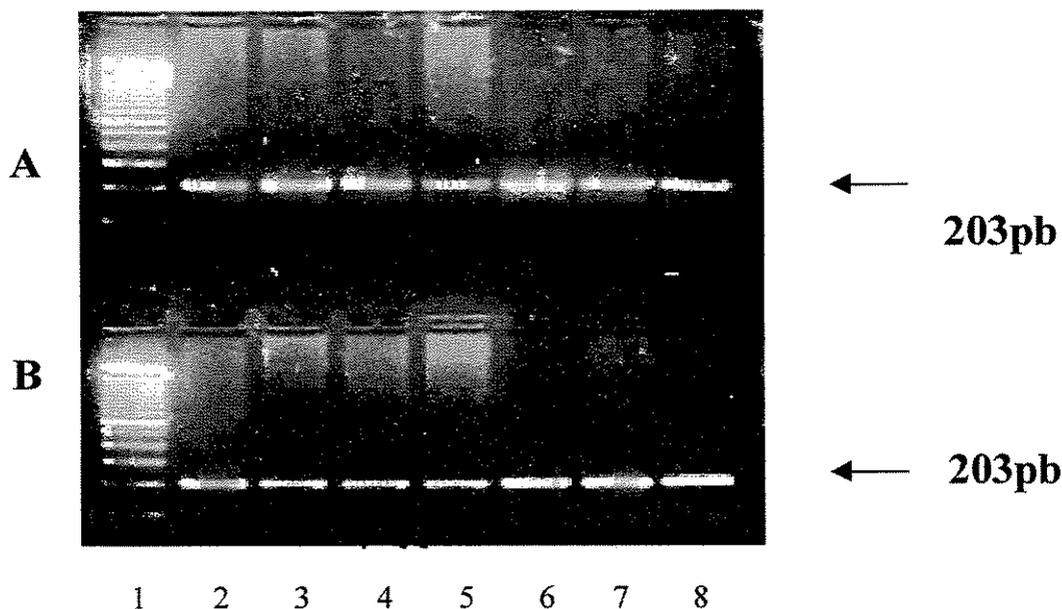


FIGURA 16: Gel de agarose 2% onde foram visualizados os produtos da nested-PCR do gene NIS obtidos a partir de tumores tiroidianos (painel A) e do sangue periférico correspondente (painel B) coletado de 8 pacientes durante o seu seguimento.

Painel A - Nested PCR para o gene NIS a partir de cDNA de tecido tumoral mostrando um produto de 203pb. Na coluna 1: está o marcador molecular para 100pb; nas colunas 2 a 5: carcinomas papilíferos; coluna 6 a 8: carcinomas foliculares

Painel B - PCR para o gene NIS a partir de DNA genômico dos pacientes do painel A Coluna 1: marcador molecular para 100pb; colunas 2 e 3, 6 e 7: indivíduos sem evidências de metástases e/ou recorrência após 2 anos de anos de seguimento.

Observou-se que havia 5 casos com Tg elevada e PCI sugestiva de metástase entre os carcinomas, após 2 anos de seguimento. Estes pacientes apresentavam expressão do gene NIS no tumor primário e também possuíam NIS detectável em sangue periférico. Outros 6 pacientes apresentavam níveis indetectáveis ou baixos de Tg e PCI negativa e, no entanto, também pôde-se detectar o gene NIS em seu sangue periférico.

Por outro lado, em 2 pacientes, os níveis de Tg eram elevados, sugerindo a presença de metástases, mas não havia evidências destas a PCI ou ao exame ultrasonográfico. Outro caso também apresentava elevação de Tg e PCI negativa porém um ultra-som cervical evidenciou lesão recorrente em leito tireoidiano. Nestes casos também houve positividade de amplificação do gene NIS em sangue periférico.

Para investigar a possibilidade do gene estar expresso porém não funcional por causa de mutações, realizou-se um rastreamento nos exons 4, 5 e 6 do gene NIS, locais apontados pela literatura como envolvidos em casos de hipotireoidismo congênito por disormonogênese.

Na figura 17 é apresentado um gel de DGGE, onde observou-se todas as bandas migrando na mesma altura, indicando que todos os casos possuem apenas a seqüência normal para NIS.

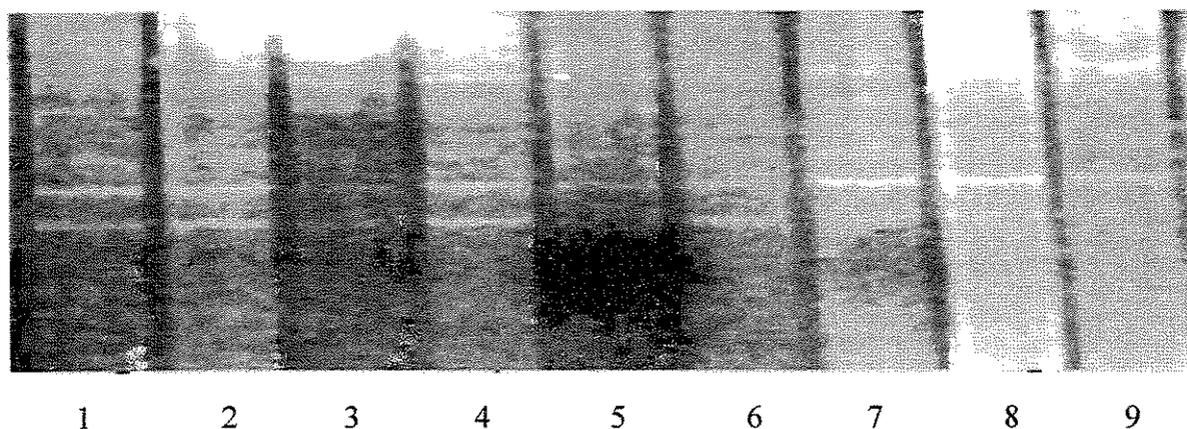


FIGURA 17: Gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante de 20 a 80% para o exon 4 do gene NIS utilizado para rastreamento de mutações através da técnica do DGGE. Coluna 1 e 2: carcinoma papilífero com metástase comprovada por ultra-som mas com PCI negativa; coluna 3: carcinoma papilífero com nível elevado de Tg mas sem captação à PCI; coluna 4: carcinoma medular da tireóide; coluna 5: adenoma folicular; coluna 6: tireoidite de Hashimoto; colunas 7 a 9: carcinomas foliculares.



DISCUSSÃO

IMPORTÂNCIA DA IDENTIFICAÇÃO DO GENE NIS PARA O CÂNCER DA TIRÓIDE

A maior parte dos tumores que se desenvolvem a partir da célula folicular é de tumores bem diferenciados, tão bem diferenciados que geralmente mantêm sua capacidade de captar iodo e de responder a estímulos fisiológicos como o TSH. Seu prognóstico é relativamente muito bom. Se bem conduzidos, 95% dos pacientes com carcinomas papilíferos têm uma sobrevida comparável com a da população normal, sem seqüelas ou grande alteração da sua qualidade de vida (WARD, 2001). O tratamento cirúrgico seguido de radioterapia com iodo radioativo possibilita a cura de grande parte dos pacientes com câncer bem diferenciado da tiróide o qual, afortunadamente, acomete cerca de 80% de nossos pacientes. Infelizmente, os outros 20%, além de uma parte dos próprios pacientes com câncer diferenciado, não responde bem e apesar dos esforços cirúrgicos e radioterápicos, evolui com recidivas que eventualmente culminarão com a morte. Tal tipo de evolução é mais freqüente no carcinoma folicular do que no papilífero (WARD, 2001).

Embora o transporte de iodo na glândula tiróide seja conhecido há décadas, sabendo-se que é um transporte dependente de sódio-iodo localizado na membrana basolateral das células foliculares da tiróide, a clonagem do gene humano NIS só foi possível recentemente, permitindo caracterizar melhor os mecanismos moleculares básicos do transporte de iodo, abrindo dessa forma, o caminho para esclarecer seu papel em doenças tiroidianas (MATSUDA & KOSUGI, 1997; POHLENZ *et al*, 1997).

EXPRESSÃO DO GENE NIS

Em câncer da tiróide, tem-se descrito diminuição de expressão do gene NIS (TRAPASSO *et al*, 1999). Isto é de fundamental importância quando pensamos nos tumores diferenciados de tireóide onde, desde a década de sessenta, a terapia com radioiodo vem sendo utilizada após o tratamento cirúrgico, tanto para identificação como para erradicação da recorrência tumoral, sendo portanto, fundamental para a eficiência terapêutica (SPITZWEG, HEUFELDER, 1998). A diminuição na concentração de iodo é variável de um tumor para outro, e a não captação de iodo radioativo ocorre em até 30% dos casos (RINGEL *et al*, 2001). Corroborando a importância de NIS em neoplasias, a

transfecção do gene para células em cultura de um tumor que primariamente não concentrava radioiodo resultou em aumento da concentração do iodo em cerca de 60 vezes *in vitro* (LAZAR *et al*, 1999). A transferência do gene do NIS usando promotores tecido-específicos promove um caminho correto para as células malignas serem atingidas pela citotoxicidade tecido-específica do radioiodo, minimizando ao mesmo tempo esses efeitos sobre as células normais. Assim, a pesquisa do transcrito deste gene poderia ser muito útil na avaliação da indicação ou não de radioiodo para o paciente operado por um carcinoma tireoidiano. Poderia, mais ainda, transformar-se num fator prognóstico, pois os pacientes que não tivessem tal transcrito, deveriam potencialmente, não responder à terapia convencional do tumor tireoidiano e, portanto, evoluir pior.

O uso de RT-PCR para o gene NIS foi considerado um bom marcador de malignidade por Arturi e col. que descreveram 20 e 26% de ausência do gene NIS em tumores papilíferos e foliculares de tireóide, respectivamente (ARTURI *et al*, 1998). Todos os adenomas tóxicos por ele examinados possuíam o gene NIS enquanto que apenas 9% dos nódulos não hiperfuncionantes expressavam NIS (ARTURI *et al*, 1998). Estes dados foram confirmados pelos achados de Lazar e col que obtiveram expressão do gene NIS em 18/18 casos de bócio tóxico, 4 de 24 bócios não-tóxicos e apenas 3 de 43 carcinomas de tireóide (LAZAR *et al*, 1999).

Assim, nosso objetivo inicial foi identificar casos em que não houvesse expressão do gene NIS no tecido tumoral procurando um marcador de mau prognóstico pois que estes pacientes seguramente não se beneficiariam do tratamento radioterápico. Infelizmente, nossos resultados mostram que o gene NIS está expresso em todos os 77 casos por nós pesquisados, incluindo os 21 casos de carcinomas papilíferos e os 6 carcinomas foliculares da tireóide. Também detectamos expressão do gene NIS em tecido tumoral de 2 casos com evidência de metástase por Tg elevada e/ou ultrassom positivo, que no entanto, não apresentavam captação de radioiodo na PCI. Estes dados contrariam a expectativa inicial, baseada em Arturi e Lazar que sugeriram que não obteríamos expressão de NIS em cerca de 1/5 a 1/4 dos carcinomas bem diferenciados da tireóide. Uma razão para nossos achados pode ser a grande sensibilidade de nossa PCR. Afastamos a possibilidade de se tratar de contaminação ou de “carry-over”, usando controles negativos e repetindo todas as reações de PCR por várias vezes em diferentes ambientes e tempos.

Segundo recentes comunicados de Elisei *et al* e Biscola *et al*, a correlação entre a captação de iodo observada na cintilografia e a expressão do gene NIS em sangue periférico e em tecido tumoral de portadores de câncer tireoidiano diferenciado, é realmente pobre (BISCOLLA *et al*, 2000; ELISEI *et al*, 1999). Expressão de NIS em tecidos metastáticos não pode ser prevista com base na expressão do gene NIS nos tumores primários correspondentes (PAPOTTI *et al*, 2000). Mais ainda, a expressão do gene NIS pode estar perdida enquanto a de Tg e do r-TSH estão ainda presentes e, ao contrário, a expressão de PAX-8 e TTF-1 pode estar perdida enquanto a expressão do gene NIS está conservada (PAPOTTI *et al*, 2000).

A razão pela qual alguns pacientes não captam iodo apesar de expressarem o gene NIS, poderia ser a ocorrência de mutações no gene que, apesar de expresso, resultaria em produtos proteicos não funcionais. Outra possibilidade seria a alteração na localização do gene, e conseqüentemente, nos seus elementos promotores (TRAPASSO *et al*, 1999). Também poderiam ocorrer mutações ou alterações na resposta transcricional do gene a algum outro sinal além do TSH, como o fator de transcrição tireoidiana 1 (TTF1) (LERMAN & SILVERSTEIN, 1987). Acredita-se que o TTF1 seja capaz de estimular a expressão do gene transportador de iodo apenas na glândula tiróide o que explicaria os baixos níveis da expressão do gene nos tecidos extra-tireoidianos (LERMAN & SILVERSTEIN, 1987). Seria possível, assim, sugerir diferentes mecanismos moleculares que poderiam afetar a expressão do gene NIS conferindo às células tireoidianas características diferentes no tecido tumoral do que no tecido normal.

MUTAÇÕES NO GENE NIS

Várias mutações inativadoras do gene causando defeitos de transporte do iodo que resultam nas alterações de captação e hipotireoidismo congênito foram descritas, inclusive no Brasil (POHLENZ, *et al*, 1997; KOSUGI, *et al*, 1998; SCHLUMBERGER, 1998). Foi descrita uma troca de adenina (A) por citosina (C), códon 354, resultando na troca de aminoácidos treonina (Thr) por prolina (Pro) (FUJIMARA *et al*, 1997). A expressão desta mutação *in vitro* revelou a perda da capacidade do transporte ativo do

iodo (FUJIMARA, *et al*, 1997). Em outro caso, identificou-se uma mutação recessiva representada pela substituição da mesma base nitrogenada anteriormente citada na posição 1060 alterando Thr por Pro, códon 354. A expressão do transportador de iodo *in vitro* confirmou marcada redução na captação, comparado com o NIS normal (ARTURI *et al*, 1998). Interessante notar nestes dois casos que a mesma mutação resulta em diferentes apresentações clínicas sugerindo que outros fatores poderão influenciar a expressão fenotípica. Em outro relato Pohenz e colaboradores descreveram, também em paciente com hipotireoidismo congênito, substituição no exon 6 - códon 267, nucleotídeo posição 1146, de uma glutamina por ácido glutâmico e uma segunda mutação localizada no códon 531 do exon 13, havendo uma substituição de citosina por guanina resultando num *stop códon*, TAG (POHLENZ *et al*, 1997). Em outra descrição de caso importante, em paciente de 36 anos com suspeita de defeito no transporte de iodo, uma mudança da citosina por adenina no nucleotídeo 1163, códon 272, produziu *stop códon* localizado exon 6, novamente sítio de mutação inativadora. Em pacientes japoneses, por outro lado, parece haver uma prevalência comum de mutação T354P com grande heterogeneidade do quadro clínico (KOSUGI *et al*, 1998).

A existência de mutações poderia ser uma interessante alternativa para explicar a expressão do gene NIS mesmo em tumores em que ele comprovadamente não é funcional, já que não há captação de iodo. Realizamos um rastreamento de mutações através da técnica de DGGE focando justamente o exon 6, local onde várias mutações foram descritas e existe descrição de *splicing* alternativo, e no exon 4 e 5. A técnica do DGGE fornece vantagens sobre o sequenciamento direto do gene, em que perdem-se as extremidades dos segmentos 5' e 3'. O gene NIS é, além disso, muito grande para ser efetivamente seqüenciado diretamente em muitos casos e existe ainda a possibilidade dele apresentar polimorfismos. A estratégia do DGGE consiste na amplificação do DNA usando dois oligonucleotídeos, onde um deles carrega na sua extremidade 5' ou 3' uma seqüência adicional de DNA (20 a 60pb) rica em GC. O segmento de DNA amplificado é submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo uma faixa de gradiente de desnaturação adequada para o fragmento de DNA teste. Fragmentos de DNA diferindo por uma única mudança de base, podendo ser uma mutação ou um polimorfismo neutro, migraria em posição diferente no gel (MYERS, and MANIATS, 1986).

Nossos dados iniciais, entretanto, mostram que mutações não ocorreram nos exons pesquisados em nossos pacientes. Devemos estudar outros exons para afastar definitivamente a possibilidade de haver mutações. Também deveremos afastar anormalidades pós-transcripcionais e de estrutura da proteína em experimentos futuros.

DEMONSTRAÇÃO DO GENE NIS EM SANGUE PERIFÉRICO

Como NIS é produzido preferencialmente por células foliculares tiroidianas, sua presença na periferia poderia ser um bom parâmetro de diagnóstico e/ou seguimento dos pacientes com câncer, pois poderíamos supor que, em pacientes livres de doença, os níveis de NIS, à semelhança da Tg sérica, se mantivessem baixos ou não detectáveis enquanto que pacientes com tecido tiroidiano neoplásico poderiam ter alta produção de NIS, tornando NIS sérico detectável. Assim, para verificar se NIS serve como parâmetro de seguimento clínico e para correlacionar a expressão de NIS com o aparecimento de recorrência ou de metástases à distância, tirando proveito do fato de possuímos sangue coletado à beira do leito cirúrgico e com 6 meses a 2 anos de acompanhamento, desenvolvemos uma PCR simples em sangue periférico. Sintetizamos primers para os exons 4 e 6 do NIS para DNA genômico. Nossos resultados demonstram que tampouco a pesquisa de NIS circulante tem valor para seguimento clínico pois não encontramos correlação entre detecção de NIS e recorrência e/ou metástases.

Interessantemente, um paciente não apresenta NIS detectável apesar de ter desenvolvido metástases. Este caso pode ilustrar as hipóteses anteriormente levantadas. Por outro lado, não podemos afastar a idéia de que nossa PCR, usando primers para exons 4 e 6, não é suficiente para assegurar sensibilidade adequada para detecção de NIS a partir de DNA genômico de sangue periférico.

EXPRESSÃO DO GENE NIS EM CARCINOMAS MEDULARES DA TIRÓIDE

De maneira inusitada, encontramos expressão de NIS também em carcinomas medulares, onde, teoricamente, o gene NIS não deveria estar expresso já que se trata de carcinomas derivados de células C, de origem totalmente diferente do da célula folicular. No entanto, a glândula tiróide compartilha a capacidade de acumular iodo ativamente com diversos tecidos, como de glândulas salivares e lacrimais, mucosa gástrica, glândulas mamárias em lactação, plexo coróide, corpo ciliar do olho, pele e placenta (VOLANTE *et al*, 1999). A expressão de TTF-1 e de PAX-8, genes envolvidos no desenvolvimento fisiológico e também na carcinogênese tiroídiana, já foi demonstrada em carcinomas medulares, e, embora não tenhamos encontrado nenhum relato de expressão do gene NIS, ele é, portanto, possível (ROS *et al*, 1999) Por outro lado, existem na literatura cerca de 40 casos de carcinomas mistos, medular-folicular, considerados raridade, e que são considerados derivados de diferentes precursores tumorais (PAPOTTI *et al*, 2000; VOLANTE *et al*, 1999).

Esperamos conseguir coletar mais amostras de carcinomas medulares para verificar tal achado, que falaria a favor de uma origem comum do carcinoma medular com o carcinoma folicular tiroídiano.



CONCLUSÃO

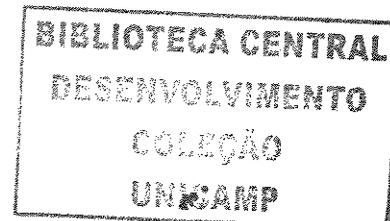
1. Implantamos e aprimoramos a técnica de RT-PCR a partir de RNA para estudo de expressão gênica em nosso laboratório. A técnica foi utilizada com sucesso na avaliação de expressão do gene NIS em diferentes tecidos tiroidianos. Entretanto, todos os tecidos investigados apresentaram expressão, não permitindo portanto distinção entre eles ou qualquer tipo de comparação.

2. Implantamos e aprimoramos a técnica do DGGE para rastreamento de mutações em nosso laboratório visando identificar possíveis mutações do gene NIS em tumores tiroidianos benignos e malignos. Não observamos nenhum caso de mutação entre os casos examinados para os exons 4, 5 e 6 do gene NIS.

3. Não foi possível estabelecer correlação entre a presença ou ausência de expressão do gene NIS e a evolução clínica dos portadores de neoplasias tiroidianas. Assim, investigamos a detecção de NIS em sangue periférico através de PCR para os exons 4 e 6. Concluímos que tal pesquisa também não possui utilidade clínica.



SUMMARY



Iodine uptake plays an important role in the metabolism of the normal follicular cell, that uses it to produce thyroid hormones. Surgery followed by radiotherapy may cure most of the patients with well differentiated thyroid cancer, that keep their ability to capture iodine. Unfortunately, about 20 per cent of the thyroid cancer cases are undifferentiated and some of the well differentiated tumors do not respond to the treatment, and end up dying. With the identification of the gene that encodes the intra-membrane glycoprotein responsible for the transportation of iodine to the follicular cell, called NIS, there has been an effort to correlate the lack of iodine uptake with a non expression of the gene, and, therefore, a worst prognosis.

We have studied a total of 77 thyroid tissue samples comparing 27 carcinomas (21 papillary carcinomas and 6 follicular carcinomas), with 8 benign tumors (follicular adenomas). We included 39 benign goiters (33 multinodular goiter, 4 cases of Hashimoto disease and two Graves diseases). Also there were 3 medullary carcinomas. Using a nested-PCR, that included β -actin as a DNA control, we identified NIS expression in all cases, even in the thyroid medullary carcinomas. NIS expression was found in tumor tissue of two cases that did not have iodine uptake in the whole body scan, even though there was evidence of metastasis with high serum levels of tiroglobulin (Tg) and ultrasound positive for neoplasia. The reason why these patients did not present iodine uptake although they expressed the gene NIS, could be a mutation. In order to test such possibility, we have set the patterns for the use of a DGGE screening of exons 4, 5 and 6 of the gene. We did not identify any mutation in the cases investigated so far, which may suggest that mutations are not the main reason for modifying the NIS protein function.

As the protein is produced preferably by follicular thyroid cells, we assumed that individuals with cancer may present higher serum levels of NIS when compared with normal individuals. In order to check the usefulness of NIS as a clinical marker, we developed a simple PCR to detect exons 4 and 6. Among the peripheral blood of 13 patients that had NIS expressed in the initial tumor and had 6, 12 and 24 months follow-up, exon 4 of NIS was not detectable in 4 cases: 2 follicular carcinomas, 1 papillary carcinoma and 1 Graves disease patient. However, exon 6 of NIS was found in all the samples but one. This last patient presented metastasis during the follow-up, maintaining serum NIS undetectable. We conclude that the detection of serum NIS has no clinical utility.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARTURI F, RUSSO D, SCHLUMBERGER M, VILLARD JA. 1998 . Iodide symporter gene expression in human thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2493-2496.
- BISCOLLA RP, CERUTTI JM, MACIEL RM. Detection of recurrent thyroid cancer by sensitive nested reverse transcription-polymerase chain reaction of thyroglobulin and sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid transcripts in peripheral blood. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:3623-7.
- BISHOP J.M. The Molecular Genetics of cancer. *Science*, 1987; 235:305-311
- CARRASCO N: The thyroid sodium-iodide symporter (NIS): Cloning and potential clinical applications. *Thyroid Today* 1999; 22(4):1-11.
- CARRASCO, N. Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim Biophys Acta* 1154:65-82, 1993.
- DAÍ, G; LEVY, O; CARRASCO, N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 379:458-460, 1996.
- DEGROOT, LJ. In *Endocrinology* (ed. De GROOT, LJ) 507-914 (Grune e Straton, Orlando, FL, 1995.
- DELANGE, F. The disorders induced by iodine deficiency . *Thyroid* 4:107-128, 1994.
- ELISEI R, VIVALDI A, MOLINARO E, ROMEI C, CAPEZZONE M, BOTTICI V, AGATE L, BASOLO F, COSCI B, PINCHERA A, PACINI F. Scintigraphic imaging of primary and metastatic thyroid tumors is not correlated with the sodium/iodide symporter gene expression. *Endocrine J* 47(S):184 [abstract].
- FIDLER IJ. Molecular biology of cancer: invasion and metastasis. In DeVita VT, Hellman S, Rosenberg AS (eds). *Cancer: principles & practice of oncology*. Lipincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997; 135-52.
- FILLET, S; BIDART, JM; ARTURI, F; CAILLOU, B; RUSSO, D, SHUMBERGER, M. Sodium iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism.

- FUJIMARA H, TATSUMI KI, MIKI K, HARADA T, MIYAI K, TAKAI SI, AMINO N.
1997 Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na/I symporter.
Nat Genet. 16:124-125.
- HEDINGER, C.& SOBIN, L.H. Histological typing of thyroid tumors . International
Histological Classification of Tumors. Geneva; *World Health Organization*, 1974.
- KNUDSON, AG Antioncogenes and human cancer. *Proc Nat Acad SCI USA*,
1993;90:10914-10921.
- KOSUGI S, SATO Y, MATSUDA A, OHYAMA Y, FUJIEDA K, INOMATA H,
KAMEYA T, ISOZAKI O, JHIANG S. High prevalence of T354P sodium/iodide
symporter gene mutatrion in japanese patients with iodide transport defect who have
heterogeneous clinical pictures. *J Cl Endo Metab* 1998; 83:4123-9.
- LANDIS SH; MURRAY, T; BOLDEN, S; WINGO, P.A. Cancer Statistes. *Cancer Jj Clin*.
48(1):6-29, 1998.
- LAZAR V, BIDART JM, CAILLOU B, MAHE C, LACROIX L, FILETTI S, et al.
Expression of the Na⁺/I⁻ symporter gene human thyroid tumors: a comparison study
with other thyroid specific genes. *J Endocrinol Metab*.84:3228-34, 1999.
- LERMAN LS, SILVERSTEIN K. Computational Simulation of DNA Melting and Its
Application to Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis. *Methods in Enzymology*
155:482-99, 1987.
- LEVY, O; CARRASCO, N. Structure and function of the thyroid iodide transporter and its
implication for thyroid disease. *Curr Opin Endocr Diabetes* 4: 364-370, 1997.
- MARINE, D; FEISS, HO. The absorpction of potassium iodide by pufused thyroid glands
and some of the factors modifying it. *J. Pharmacol* 7:557-576, 1915.
- MATSUDA, A; KOSUGI, S. A homozygous missense mutation of the sodium /iodide
symporter gene causing iodide transport defect. *J Endocrinol Metab*.82:3966-3971,
1997.

- MYERS, R. M. and MANIATIS, T. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 275-284, 1985.
- NAMBA, H; MATSUO, K; FAGIN, JA. Clonal composition of benign and malignant thyroid tumors. *J Clin Invest* . 86(1):120-125, 1990.
- OSBORNE, M; BOYLE, P.; LIPKIN, M. Cancer prevention. *Lancet*, 349 (11): 27-30, 1997.
- PANDER, BAJ. Genetic predisposition to cancer. In HOLLAND, JF, et al (eds): *Cancer medicine*, 4th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, p245, 1997.
- PAPOTTI, M; VOLANTE, M; KOMMINOTH, P; SOBRINHO-SIMÕES, M; BUSSOLATI, G. Thyroid carcinomas with mixed follicular and C-cell differentiation patterns. *Semin Diagn Pathol*.17:109-19, 2000.
- POHLENZ, J; MEDEIROS NETO, G; GROSS, JL; SILVEIRO, SP; KNOBEL, ME; REFETOFF, S. Hypothyroidism in a Brazilian kindred due to iodide trapping defect caused by a homozygous mutation in the sodium /iodide symporter gene. *Biochem Biophys Res Commun*.240:488-491, 1997.
- RINGEL, MD; ANDERSON, J; SOUZA, SL; BURCH, HB; TAMBASCIA, M; SHRIVER, CD; TUTTLE, RM. Expression of the Sodium iodide symporter and thyroglobulin genes are reduced in papillary thyroid cancer. *M Pathology* . 14: 289-96, 2001.
- ROS, P.; ROSSI, DL; ACEBRON, A; SANTISTEBAN P. Thyroid-specific gene expression in the multi-step process of thyroid carcinogenesis. *Biochimie*. 81:389-96, 1999.
- SCHLUMBERGER, M. Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 338:297-306, 1998.
- SCHMUTZLER, C; KOHRLE J. Implications of the molecular characterizations o the sodium-iodide symporter (NIS). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 106 Suppl 3:51-510. 1998.

- SHERMAN, CD, Câncer de Tiróide, *Manual de Oncologia Clínica*, 5ª ed, 208-215, Fundação Oncocentro de São Paulo, 1993.
- SILVERBERG, E. & LUBERA, JA. *Cancer Statistics*, 1989. *Cancer*. 36:9, 1986
- SMANIK, PA; LIU, Q; FURMINGER, TL; RYU, K; XING, S; MAZZAFERRI, EL; JHIANG, SM. Cloning of the human sodium iodide symporter. 226:339-345, 1996.
- SMANIK, PA; RYU, KY; THEIL, KS; MAZZAFERRI, EL; JHIANG, SM. Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology*. 138:3555-8, 1997.
- SPITZWEG, C; JOBA, W; EISENMENGER, W. Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *J Clin. Endocrinol*. 83:1746-1751, 1998.
- SPITZWEG, C; HEUFELDER, AE. The sodium iodide symporter: its emergy relevance to clinical thyroidology. *Eur J Endocrinol* 138: 374-375, 1998.
- STRUM, JM; PHELPS, PC; MCATEE, MM. Resting human female breast tissue produces iodinated proteins. *J Ultrastruct Res*. 84:130-139, 1983.
- THAKKER, RV. Multiple endocrine neoplasia. *Horm Res*; 56 Suppl 1:67-72, 2001
- TRAPASSO, F; IULIANO, R; CHIEFARI, E; ARTURI, F; STELLA, A; FILETTI, S; et al. Iodide Symporter gene expression in normal and transformed rat thyroid cells. *Eur J Endocrinol*. 140:447-51, 1999.
- TYLER, P. China confronts retardation of millions who lack iodine. *New York Times* 4, 1996.
- VOLANTE, M; PAPOTTI, M; ROTH, J; SAREMASLANI, P; SPEEL, EJ; LLOYD, RV; CARNEY, JA; HEITZ, PU; BUSSOLATI, G; KOMMINOTH, P. Mixed medullary-follicular thyroid carcinoma. Molecular evidence for a dual origin of tumor components. *Am J Pathol*. 155:1499-509, 1999.

- WARD, LS; FAGIN, JA. Molecular genetics of thyroid cancer: evidence that inactivation of tumor suppressor genes occurs at late stages of tumor progression. *In The molecular and cellular basis of pediatric endocrinology*. Humana Press Inc, Totowa, NJ, - chapter 12, 201-211, 1998.
- WARD LS. Genética Molecular do câncer: implicações no câncer da tiróide humana. *Rev Bras Clin Terap*. 23(6):212-218, 1997.
- WARD, LS. Molecular basis for the diagnosis and therapy of the thyroid cancer. *Rev Bras Clin Terap*. 26(3):103-107, 2000.
- WARD, LS. Carcinoma diferenciado da tiróide: fatores de risco clínicos X fatores de riscos genéticos. *Endo News*; 23):3-6, 2001
- WERNER, SC; INGBAR, S. In: *The thyroid: A fundamental and clinical text* (eds BRAVERMAN, LE, UTIGER, RD) 1-1362, Lippincott Philadelphia, 1991.
- WILLIAMS, D.W. & WILLIAMS, E.D. The pathology of follicular thyroid epithelial tumors. In WYNDORF THOMAS, D.E. & WILLIAMS, E. D. *Thyroid Tumors molecular Basis of Pathogenesis*. Edinburgh, Churchill, Livingstone, 1989.