

BC/25796

IB/80702

**ANÁLISE DO PAPEL DE c-MYC NO
PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO DAS
CÉLULAS FOLICULARES DA TIREÓIDE
HUMANA.**

Janete Maria Cerutti

Universidade Estadual de Campinas

**ANÁLISE DO PAPEL DE c-MYC NO PROCESSO DE
TRANSFORMAÇÃO DAS CÉLULAS FOLICULARES DA
TIREÓIDE HUMANA**

JANETE MARIA CERUTTI

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)

Janete Maria Cerutti

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao
Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção
do título de doutora em
Biologia na área de
genética

14/07/95 *Solange Bento Farah*
ORIENTADOR: Prof.^a Dr.^a Solange Bento Farah

**Campinas
1995**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

7/10/1995
C337a
F
C D
ECO
CA
CPD

CM-00077182-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Cerutti, Janete Maria

C337a Análise do papel de c-MYC no processo de transformação das células foliculares da tireóide humana / Janete Maria Cerutti. -- Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador: Solange Bento Farah.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Tireóide. 2. Proto-oncogenes. 3. Carcinoma.

4.* c-MYC. I. Farah, Solange Bento.

II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

III. Título.

**CERUTTI, J.; TRAPASSO, F.; BATTAGLIA, C. LI, Z.; MARTELLI, M.L;
BERLINGIERI, M.T. FAGIN, J; SANTORO, M. & FUSCO. The block of
c-Myc expression by antisense oligonucleotide inhibits proliferation of human
thyroid carcinoma cell lines..**

Este trabalho foi submetido a publicação na revista *Cancer Research*

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Solange Bento Farah

Prof^a. Dr^a Luisa Lina Villa

Prof. Dr. Rui Monteiro de Barros Maciel

Prof. Dr. Marcos Tambascia

Prof^a. Dr^aDenisePontes Cavalcanti

Suplentes:

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Sonati

Prof^a. Dr^a. Doris Rosenthal

Campinas, 14 de Julho de 1995

(in memoriam)

Á
Você “Binho”

Pelo irmão
que fostes e,
pela certeza
da tua
presença na
horas mais
difíceis.

Agradecimentos

A minha família que participou intensamente de todos os momentos dessa minha caminhada ... sofrendo os meus sofrimentos e sorrindo ao me ver sorrir...

A minha irmã Suzete que desde o primeiro dia de minha vida esteve literalmente ao meu lado ... obrigado pela sua presença.

A você Solange que me acolheu, me ajudou a crescer como pessoa e pesquisadora e me brindou com tua amizade...

Aos pesquisadores do grupo Vecchio que em todos os momentos me deram tanto carinho e amizade tornando minha permanência em Napoli ainda mais agradável.

Ao Prof. Fusco pela dedicação e o carinho com que conduziu o trabalho.

A Massimo Santoro pela atenção e colaboração que sempre dedicou durante a realização desse trabalho.

A Dr^a. Luisa Lina Villa pelas contribuições prestadas na análise prévia dessa dissertação, pela gentileza com que conduziu esse processo extremamente burocrático e, por aceitar o convite para participar da banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Marcos Tambascia pelas oportunidades criadas, pela correção da dissertação e por fazer parte da banca examinadora.

A Dr^a. Anete Pereira de Souza por participar da análise da tese enriquecendo-a com suas sugestões.

Ao Prof. Dr. Rui Maciel pela atenção dedicada e por sua participação como membro da banca examinadora.

A Prof^a. Dr^a. Denise Pontes Cavalcanti pelas contribuições prestadas na fase de qualificação e por aceitar o meu convite para fazer parte da banca examinadora.

A Prof^a. Dr^a. Doris Rosenthal pela participação como membro suplente da banca examinadora.

Aos Professores do Depto. de Genética Médica por terem contribuído nesse meu aprendizado.

A Dr^a. Maricilda Pallandi de Mello, pela amizade demonstrada durante estes anos de convivência.

Nina, pelo que fizeste por mim... a tua amizade foi, entre as minhas conquistas, uma das mais importantes.

Fra, os meus melhores resultados no laboratório de patologia celular e molecular foram obtidos nas nossas conversas... és especial.

Thea, Roberta, Anna Maria, Dany, Amelia, Katia, Nello, Angela, Michelle, VítorioGrazie per tutto.. vi voglio bene.

Isa e Mada pelo carinho e amizade que me ofereceram durante todo o tempo que convivi com vocês.

As gurias e ao guri do labi, vocês sem dúvida alegraram meus dias

A todos os amigos e funcionários do CBMEG e do Depto. de Genética Médica pela constante colaboração e amizade.

Bruno, por estares ao meu lado nos primeiros e mais difíceis momentos ... todo o meu respeito...

SUMÁRIO

I. Apresentação	1
II. Introdução	2
II.1 O proto-oncogene <i>c-myc</i>	3
II.1.1. Estrutura do gene <i>c-myc</i>	4
II.1.2. Regulação da expressão de <i>c-myc</i>	7
III.1.2.1. Auto-regulação	7
III.1.2.2. Regulação transcricional	8
III.1.2.3. II Regulação pós-transcricional	13
II.1.3. Mecanismo funcional: formação de heterodímeros	14
II.1.4. Propriedades funcionais do polipeptídio c-Myc	16
II.1.4.1. Ciclo celular	16
II.1.4.2. Diferenciação celular	18
II.1.4.3. Localização nuclear	19
II.1.4.4. Ligação não específica ao DNA	19
II.1.4.5. Ativação de outros genes	21
II.1.5. Myc e seu papel na transformação neoplásica	21
II.1.6. Interação de <i>c-myc</i> e genes de supressão tumoral	23
II.1.7. Mecanismos de ativação de <i>c-myc</i>	24
II.1.8. Expressão de <i>c-myc</i> em tumores humanos	25
II.2 Neoplasias da tireóide humana	26
II.2.1. Alterações moleculares envolvidas em neoplasias da tireóide humana	28
II.2.2. <i>c-myc</i> e seu papel no desenvolvimento do processo carcinogênico da tireóide humana	33

III. Objetivos	34
-----------------------------	-----------

VI. Material e Métodos

IV.1. Linhagens celulares e tumores frescos	35
IV.2. Obteção de RNA total	35
IV.3. Northern <i>blot</i>	37
IV.4. Extração de proteína	38
IV.5. Western <i>blot</i>	39
IV.6. Oligonucleotídeos utilizados	40
IV.7. Análise da síntese protéica	41
IV.8. Análise da capacidade de crescimento e formação de colônia em meio semi-sólido	41
IV.9. Análise da taxa de crescimento celular	42
IV.10. Análise da taxa de síntese de DNA	42
IV.11. Transfecção celular	42

V. Resultados

V.1. Análise da expressão do proto-oncogene <i>c-myc</i> em linhagens celulares derivadas de carcinoma da tireóide humana.	44
V.2. Análise da expressão do proto-oncogene <i>c-myc</i> em tumores da tireóide humana.	44
V.3. Níveis de <i>c-Myc</i>	48
V.4. Análise da eficiência dos oligonucleotídeos em bloquear a síntese protéica.	48
V.5. Análise das taxas de crescimento celular e síntese de DNA após o bloqueio da síntese da proteína <i>c-Myc</i>	51
V.6. Bloqueio da síntese da proteína <i>c-Myc</i> e seus efeitos na capacidade de crescimento e formação de colônia em meio semi-sólido.	51
V.7. Análise da supressão das funções de <i>c-Myc</i> através da transfecção das linhagens celulares ARO e FRO com dominantes negativos de <i>c-Myc</i>	52
V.8. Efeito de inibição diferencial das subunidades p50 e p65 de NFκB na capacidade de crescimento e formação de colônia em meio semi-sólido.	61
V.9. Bloqueio da síntese da proteína p65 do fator de transcrição NFκB e análise da taxa de síntese de DNA.	61
V.10. Análise da expressão de <i>c-myc</i> em células ARO tratadas com oligonucleotídeos específicos para a subunidade p65 do fator de transcrição NFκB.	62

VI. Discussão	67
VII. Conclusões	73
VII. Resumo	74
IX. Abstract	75
X. Referências Bibliográficas	76

Abreviaturas

- AUG - códon de iniciação para metionina
- BALB/c-3T3 - Linhagem celular derivada de fibroblasto de rato
- BL - Linfoma de Burkitt
- BR - Região básica
- BSA - Bovine serum albumine
- Colo 320*- Linhagem celular derivada de carcinoma de cólon
- cAMP - Monofosfato de adenosina ciclico
- CAMs - Moléculas de adesão celular
- c-myc* - Proto-oncogene *myc*
- c-myb* - Proto-oncogene *myb*
- c-fos* - Proto-oncogene *fos*
- CK - Caseína quinase
- CS - Calf serum
- COOH-terminal - Região carboxi-terminal
- CUG - Códon de iniciação
- DNA - Ácido desoxirribonucléico.
- DTT - Dithiotreitol
- FCS - Fetal calf serum
- FGF - Fibroblast Growth Factor.
- FUSE - Elemento de regulação localizado a cima do promotor P1 de *c-myc*.
- H4 - Gene localizado no cromossomo 10q e que se funde ao RET para a formação de RET/PTC2.
- H-L-H - Helix-Loop-Helix.
- HMG - High Mobility Group.
- HN2-terminal - Região amino-terminal.

HPC- Human Primary Culture

H-ras - Membro de uma família de multigenes primeiramente detectado no vírus de sarcoma de rato de Harvey. Os genes da família *ras* são, frequentemente, encontrados em forma mutada nos tumores..

IFN- β - Interferon- β

IgH - Cadeia pesada das Imunoglobulinas

IgL - Cadeia leve das Imunoglobulinas

Ig - Imunoglobulina

I κ B - Proteína inibitória do fator de transcrição NF κ B.

IL-2 - Interleucina 2

IRE - Intern Regulation Elements

kb- quilobase

L-*myc* - Oncogene identificado por amplificação de genes em carcinoma de pulmão. Membro da família de multigenes *myc*

LNS - Região de ligação não específica ao DNA

mA -miliampère

M1 - Polipeptídio responsável pela transferência da proteína Myc para o núcleo da célula.

M2 - Polipeptídio que funciona como segundo sinal para a localização nuclear da proteína Myc.

Mad - proteína “partner” de Max

Max - Proteína “x” associada a Myc

ME1a1 e ME1a2 - Elementos de controle localizados entre os promotores P0 e P1 de *c-myc*

min. - minuto

MPCs -Plasmocitoma de murino

mRNA - RNA mensageiro

myb - Um oncogene originalmente encontrado em dois vírus de mieloblastose aviária (leucemia mielóide). O gene foi ativado por inserção adjacente de retrovírus em várias leucemias mielóides de roedores.

myc - Um oncogene originalmente encontrado em quatro vírus de mielocitoma aviária

Myc 1 - Polipeptídio produzido a partir do códon AUG localizado no segundo exon do gene *c-myc*.

Myc 2 - polipeptídio produzido a partir do códon CUG localizado na região 3' do primeiro exon do gene *c-myc*.

Mxi - proteína codificada pelo gene *mxi*

NGF- Nerve Growth Factor

NL- Região de localização nuclear

NIH/3T3 - Linhagem celular derivada de fibroblasto de rato

N-myc - Um gene identificado por amplificação gênica em neuroblastoma. Membro da família de multigenes *myc*.

NFkB - Fator de transcrição nuclear que funciona como um regulador da transcrição via um *enhancer* associado ao gene da imunoglobulina κ .

NTRK - proto-oncogene TRK que codifica para um receptor com alta afinidade ao NGF.

P1 - Promotor 1 do gene *c-myc*

P2 - Promotor 2 do gene *c-myc*

pb - pares de bases

PC CL 3 - Linhagem celular derivada de células epiteliais de tireóide normal de rato Fischer com 18 meses.

PDGF - Platelet Derived Growth Factor

PKC - Protein Kinase C

PKA - Protein Kinase A

PMSF - Phenylmethyl-sulfonyl Fluoride

p50 - polipeptídio com peso molecular 50kd correspondente a uma das subunidades do fator de transcrição NFkB

p65 - polipeptídio com peso molecular 65kd correspondente a uma das subunidades do fator de transcrição NFkB

p53 - Gene da supressão tumoral localizado no cromossomo 17 que codifica uma proteína com peso molecular de 53kd.

pRb - Proteína produzida pelo gene pRB

PRD - Positive Regulation Domain

PRF - Plasmacytoma-specific Factor

PTC1 - Primeiro gene quimérico, resultante de um rearranjo intra-cromossomal, encontrado em pacientes com carcinoma papilífero da tireóide humana.

PTC2 - Segundo gene quimérico, resultante de um rearranjo extra-cromossomal, encontrado em pacientes com carcinoma papilífero da tireóide humana.

PTC3 - Terceiro gene quimérico, resultante de um rearranjo intra-cromossomal, encontrado em pacientes com carcinoma papilífero da tireóide humana.

PVP - Polivinilpirrolidone

pRB - Gene de susceptibilidade ao desenvolvimento de retinoblastoma

RFG - RET *fused gene*. Gene que se funde ao RET, localizado no cromossomo 10, para formação do RET/PTC3. Também denominado *ele 1*.

SCLC - Carcinoma de pequenas células do pulmão

src- Oncogene originalmente encontrado em vírus de sarcoma aviário. Seu produto tem atividade de tirosina proteína quinase.

SSCP - Single-Strand Conformation Polymorphism

ssDNA - sperm salmon DNA

TGF- β - Transforming Growth Factor β

TGF- α - Transforming Growth Factor α

TNF- α - Tumor Necroses Factor α

TPA - 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate

TMP3 - gene que codifica para a proteína tropomiosina localizado no cromossomo 1.

TRK - forma oncogênica de NTRK.

TRK-T1- gene quimérico formado pela fusão do domínio *tk* do gene NTRK com seqüências 5' do gene TRP.

TRP- gene localizado no cromossomo 1.

TSH - Thyroid-Stimulating Hormone

v-myc - gene *myc* viral

v-myb - gene *myb* viral

ZL- zíper de leucina

... A ilimitada tendência a uma proliferação rápida das células cancerosas poderia depender da predominância permanente dos cromossomos que promovem a divisão...

...Uma outra possibilidade é a presença de determinados cromossomos que inibem a divisão...

...Células tumorigênicas com crescimento descontrolado podem ser originadas se esses cromossomos inibidores fossem eliminados,.... ..uma vez que cada tipo de cromossomo é representado duas vezes na célula normal e a perda de um deles poderia passar despercebida...

BOVERI, 1914; Publicação traduzida em 1924.

Apresentação

Neoplasia é definida como o crescimento clonal no qual as células, descendentes de uma única célula progenitora, em um determinado momento, iniciam a proliferação anormal. A origem clonal das neoplasias não implica, entretanto, que o tumor maligno se origine de somente um evento transformante.

A história natural dos tumores espontâneos demonstra que a transformação neoplásica raramente ocorre em uma única etapa, mas trata-se de um processo complexo que envolve múltiplos eventos. O desenvolvimento neoplásico inicia-se com uma alteração em uma única célula que direciona a uma proliferação anormal e à gênese de uma população de células pré-neoplásicas. Em estágios posteriores, novas mutações em tais células pré-neoplásicas ou pré-malignas, conduzem a um aumento do potencial proliferativo. Podem ser necessárias mutações posteriores envolvidas na progressão de um carcinoma completamente maligno com capacidade de invadir tecidos adjacentes e metastatizar.

O fenótipo neoplásico resulta, portanto, de efeitos cumulativos de múltiplas alterações genéticas. Assim, além da perda do fenótipo diferenciado, as células neoplásicas freqüentemente diferem das normais em determinadas propriedades bioquímicas, como por exemplo: aumento da glicólise, secreção de fatores de crescimento, secreção de proteases, decréscimo dos níveis de proteínas de superfície envolvidas na adesão celular e desorganização do citoesqueleto.

Compreender o mecanismo responsável pelo desenvolvimento do câncer a nível molecular, uma vez determinada a natureza da carcinogênese, exige no entanto, que se estabeleça e se caracterize um modelo através do qual os vários estágios do processo neoplásico possam ser estudados detalhadamente. Somente com o uso de tais sistemas experimentais, nos quais o câncer possa ser reproduzivelmente induzido e sistematicamente analisado, poderemos identificar as alterações progressivas que culminam em malignidade.

Visando compreender melhor o processo que leva ao desenvolvimento dos tumores na tireóide humana, estudamos a expressão do proto-oncogene *c-myc* em tecido sólido e linhagens celulares, bem como, a sua regulação com o fator de transcrição NFκB.

Introdução

As alterações genéticas presentes em células cancerosas foram primeiramente citadas por Boveri (1914). Atualmente, tais alterações encontram-se subdivididas em dois grupos: o primeiro grupo inclui mutações do tipo dominante, pois resultam em um ganho de função do gene, e tem como alvo os genes celulares denominados proto-oncogenes; o segundo grupo inclui mutações recessivas, uma vez que, implicam na perda da função do gene mutado. Tais mutações tem como alvo os genes da supressão tumoral. Esta classificação, naturalmente, refere-se à função alterada do gene, uma vez que baseia-se na alteração patogênica provocada pelo gene, ao invés da função normal desempenhada na célula. Essa divisão reflete a forma com a qual os oncogenes e os genes da supressão tumoral foram descobertos.

O processo de transdução viral foi o primeiro fenômeno que permitiu a demonstração da existência dos oncogenes. O fenômeno de transdução se caracteriza pela recombinação do material genético por meio de uma partícula viral. O vírus isolado, pertencente a família dos retrovírus, foi detalhadamente analisado e os genes que apresentavam propriedades transformadoras foram denominados oncogenes. Assim, Peyton Rous (1966) introduziu conceitos genéticos que hoje dominam as pesquisas na área oncológica. Um grande passo foi dado através da demonstração de que genes, muito semelhantes aos oncogenes virais, estão presentes no genoma de todas as células de eucariotos. Tais genes quando mutados adquirem capacidade de transformação (VARMUS, 1982).

Entretanto, foi com a utilização de técnicas de transfecção que foram obtidas provas reais da responsabilidade dos oncogenes no desenvolvimento das neoplasias. A transfecção é uma técnica de transferência, por meios experimentais, do material genético para um sistema celular, de tal forma que, o DNA se integre ao genoma e seja expresso na célula hospedeira. Como sistema celular, utilizado para transferência do DNA obtido a partir do tecido neoplásico, foi utilizada uma linhagem de fibroblastos derivados de embrião de rato-NIH/3T3 que é altamente susceptível a transformação (COOPER, 1982).

Através da utilização desta técnica foi isolado um grande número de oncogenes. Alterações em muitos destes oncogenes foram associados a algumas neoplasias humanas, sendo que algumas dessas alterações são particularmente indicativas de alguns tipos de neoplasias específicos (BISHOP, 1991).

A caracterização bioquímica e funcional dos oncogenes isolados demonstrou que eles são responsáveis pela codificação de moléculas chaves na transmissão do sinal mitogênico extra-celular ao núcleo da célula. Os oncogenes foram, então classificados de acordo com a função dos seus produtos protéicos e, foram identificados como: fatores de crescimento, receptores para fatores de crescimento, proteínas de membrana, segundos mensageiros e proteínas nucleares. Mutações responsáveis pela ativação irregular de uma dessas moléculas podem conduzir a uma

modificação no mecanismo que controla o crescimento e a proliferação celular normal e, conseqüentemente, o crescimento tumoral (CANTLEY *et al.*, 1991).

O papel desempenhado pelos oncogenes na carcinogênese representa somente um dos fatores, sendo que, existem também os genes da supressão tumoral.

Através da realização de experimentos de fusão entre as células normais e células neoplásicas foram identificadas mutações recessivas envolvidas no processo tumorigênico. Frequentemente era observada a supressão do fenótipo neoplásico, especialmente quando a fusão ocorria entre células originadas da mesma espécie. A atividade de supressão foi atribuída a determinados cromossomos que contribuíam para o estabelecimento do padrão normal. Estas evidências levaram a crer que as células cancerosas apresentam alterações recessivas envolvidas na tumorigênese o que inspirou o termo genes supressores de tumor (HARRIS, 1988).

Atualmente sabe-se da necessidade da cooperação entre os oncogenes e da interação com os genes supressores de tumor para o desenvolvimento de um fenótipo completamente maligno. Assim, a cooperação entre os oncogenes ativa diferentes vias de sinalização. O principal efeito desta cooperação ocorre no final da cascata de transdução do sinal, a nível de transcrição, na qual estão envolvidos tanto os genes ativadores como os genes supressores de tumor.

II.1. O proto-oncogene *c-myc*

O proto-oncogene *myc* representa um importante papel na história da genética molecular das doenças neoplásicas. Muitos dos principais mecanismos pelos quais genes celulares normais tornam-se ativados em células tumorigênicas, incluindo inserção proviral (HAYWARD *et al.*, 1981), amplificação gênica (COLLINS & GRAUDINE, 1982; DALLA-FAVERA *et al.*, 1982) e translocação cromossomal (CREWS *et al.*, 1982; DALLA-FAVERA *et al.*, 1982; SHEN-ONG *et al.*, 1982; TAUB *et al.*, 1982), foram descobertos através do estudo do proto-oncogene *myc*.

O oncogene *c-myc* foi originalmente identificado em aves como uma seqüência homóloga àquela presente no oncogene retroviral MC29, sendo responsável pelo desenvolvimento de *myelocitomatosis* (mielocitomatoma aviária). O gene *v-myc* é um híbrido que consiste de elementos derivados do gene estrutural do virion com o gene *myc* de 1.6 kb (HAYWARD *et al.*, 1981).

Este foi o primeiro exemplo de mutagênese ocasionada por inserção. Assim, o gene *myc* viral (*v-myc*) ao infectar uma célula produz uma proteína com peso

molecular de 110 (p110 *gag-myc*) resultante da fusão das três proteínas Gag (p19, p10 e parte da p27) com a proteína Myc produzida a partir de seqüências codificadas pelos exons 2 e 3 do gene *myc* celular. O oncogene *v-myc* codifica seqüências *in frame* com o remanescente 5' *gag*, assim o gene é transcrito e traduzido como proteína oncogênica juntamente com seqüências *gag* amino-terminal (ABRAMS *et al.*, 1982; DONNER *et al.*, 1982; HEANEY *et al.*, 1986).

II.1.1. Estrutura do gene *c-myc*.

Localizado no cromossomo 8, o gene *c-myc*, contém três exons. O primeiro exon contém aproximadamente 500pb e apresenta funções de regulação bem definidas. O segundo e terceiro exons, altamente conservados na escala evolutiva, são responsáveis pela codificação dos polipeptídios (COLE, 1986).

O gene *c-myc* humano codifica dois polipeptídios, Myc-1 e Myc-2, de 439 e 453 aminoácidos e com respectivo peso molecular de 64000 e 67000. Os polipeptídios Myc-1 e Myc-2 apresentam 14 aminoácidos localizados na porção amino-terminal que os diferencia (MARCUS *et al.*, 1992).

O produto protéico do Myc-2, pouco maior, inicia-se no códon CUG próximo a extremidade 3' do primeiro exon do gene. A proteína Myc-1, menor e predominante, apresenta como códon de iniciação AUG, localizado no início do segundo exon (Fig. 1).

Existem algumas evidências de que o primeiro exon do gene *c-myc* humano codifica para uma terceira proteína, denominada MycHEX1. As células de murino parecem produzir um polipeptídio relacionado com MycHEX1, mas a sua localização genômica é desconhecida. O código de leitura de MycHEX1 não se sobrepõe com Myc-1 e Myc-2 e sua função ainda é desconhecida (MARCUS *et al.*, 1992).

As proteínas Myc são fosforiladas por Caseína Kinase (CK) em múltiplos sítios e apresentam domínios α -hélice e regiões ricas em aminoácidos básicos e ácidos, uma região característica de proteínas nucleares e de domínios de ligação ao DNA (Fig.1).

Uma região do polipeptídio c-Myc codificada pelo terceiro exon do gene direciona a transferência do polipeptídio para o núcleo. Os sinais de tal localização nuclear são definidos pela presença do peptídio denominado M1, representada pelos aminoácidos 320 a 328. M1 encontra-se altamente conservado entre os genes *c-myc* e assemelha-se ao sinal nuclear do *SV40 large T polypeptide* (DANG & LEE, 1988) (Fig.1).

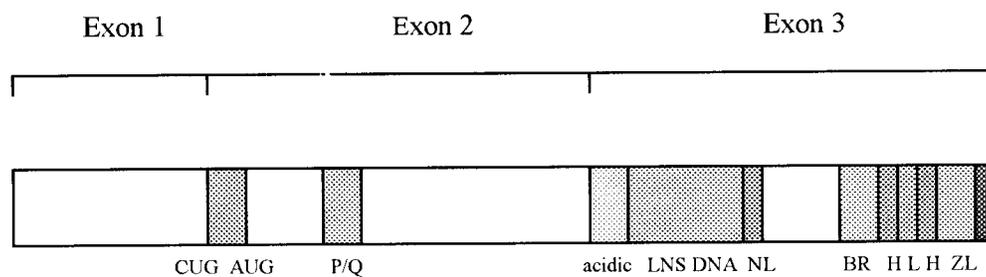


Figura 1. Estrutura do gene *c-myc* humano. **CUG, AUG**, códons de iniciação. **P/Q**, região rica em prolina e glutamina. **LNS-DNA**, região de ligação ao DNA não específica. **NL**, região para localização nuclear. **BR**, região básica. **H-L-H**, domínio helix-loop-helix de dimerização protéica. **LZ**, zíper de leucina (MARCUS *et al.*, 1992).

Um segundo peptídeo M2, aminoácidos 364 a 374, funciona como um segundo sinal de localização nuclear na ausência de M1, mas não é responsável pela distribuição da proteína na célula. M2 normalmente funciona como uma porção de um domínio responsável pela ligação ao DNA. M2, semelhante a M1 é rico em aminoácidos básicos e encontra-se altamente conservado entre os genes da família *myc* (Fig. 1).

O polipeptídeo c-Myc humano também possui um domínio de ligação não específica ao DNA, propriedade representada pelos aminoácidos 290 a 318. Esta região é altamente conservada entre os genes *c-myc* de diferentes espécies (DANG *et al.*, 1989).

Os polipeptídios Myc possui uma região, com arquitetura quimérica, que desempenha uma importante função. É representada por um domínio básico (BR) que precede aos domínios helix-loop-helix (H-L-H) e zíper de leucina (ZL). O domínio (BR)H-L-H, de aproximadamente 55 aminoácidos está localizado a 30 aminoácidos da região carboxi-terminal, sendo que estes constituem o domínio ZL. Tais domínios são necessários para a justaposição estável das regiões básicas, que mediam a formação de um complexo protéico homo ou heterodimérico, com uma sequência de DNA específica (LANDSCHULZ *et al.*, 1988; MURRE *et al.*, 1989).

Assim, a região carboxi-terminal de c-Myc contém um domínio de ligação não específica ao DNA, uma região que a transfere para o núcleo, além de uma sequência de ligação específica ao DNA que é caracterizada pelos domínios (BR)H-L-H-ZL.

Os produtos protéicos de *c-myc* apresentam um curto período de vida, de aproximadamente 20-30 minutos, que é apropriado para um gene com um importante papel na regulação da proliferação celular (HANN & EISENMAN, 1984; HANN *et al.*, 1988).

O gene *N-myc*, outro membro da família de multigenes, codifica duas fosfoproteínas de 58000 e 64000 daltons que semelhante a *c-myc* diferem na região amino-terminal. *L-myc*, codifica para uma fosfoproteínas com peso molecular de 60000 daltons (RAMSAY *et al.*, 1986).

II.1.2. Regulação da expressão de *c-myc*

II.1.2.1. Auto-regulação

A regulação da expressão do gene *c-myc* é extremamente complexa. Quando *c-myc* sofre translocação, como ocorre em linfoma de Burkitt e MPCs, a sua expressão decorre predominantemente do alelo translocado. Foram propostos dois mecanismos que tentam explicar a exclusão da expressão do alelo normal. O primeiro baseia-se no fato de que o alelo normal permanece transcricionalmente silencioso, enquanto que, o seu alelo translocado passa a ser expresso em decorrência da sua translocação para uma região da cromatina geneticamente ativa. Alternativamente, *myc* poderia estar envolvido em um processo de auto-regulação negativa de forma que a alta expressão do alelo translocado poderia regular negativamente o alelo não translocado (LEDER *et al.*, 1983).

Portanto, ou o sinal de auto-regulação normal é perdido pelo alelo que sofreu translocação ou os sinais que controlam negativamente a expressão são superados por sinais compensatórios positivos.

Alguns experimentos tentaram explicar os modelos de auto-regulação. Alguns autores utilizaram como estratégia a introdução de um gene *c-myc* exógeno e, para isso, utilizaram um plasmídeo contendo o gene *c-myc* sob o controle do promotor de SV40. Os autores demonstraram que o *c-myc* exógeno, quando super expressado, poderia regular a expressão do *c-myc* endógeno e, mostrou ser dose-dependente. Outros, utilizando a mesma metodologia, não detectaram nenhuma supressão de *c-myc* endógeno (GRIGNANI *et al.*, 1990).

Este efeito não é universal, uma vez que, em alguns sistemas celulares o gene *c-myc* perdeu a capacidade de regular normalmente a sua própria expressão.

A existência de tal mecanismo de *feedback*, denominado autossupressão, no qual *c-myc* é responsável pela regulação negativa de sua própria transcrição foi detalhadamente analisada na linhagem de células Rat 1. A utilização deste sistema celular permitiu determinar qual região da proteína c-Myc humana exógena, é necessária para suprimir o mRNA de *c-myc* endógeno, produzido pela células Rat 1 (PENN *et al.*, 1990).

Assim, os domínios importantes para a auto-supressão foram identificados. Mutações nas leucinas localizadas no zíper de leucina revelaram que os mutantes não apresentavam atividade supressora, indicando a importância de tal região para as atividades de supressão de c-Myc. Esta região se sobrepõe as regiões necessárias para colaboração com o oncogene *ras* na transformação de células embrionárias de rato

(DANG, 1991). A função supressora deve estar relacionada com a capacidade de *c-Myc* contribuir para a transformação neoplásica. De fato, muitas linhagens celulares transformadas não possuem a capacidade de autossuprimir a expressão de *c-myc* quando comparadas com linhagens não transformadas (GRIGNANI *et al.*, 1990)

Uma vez que, este domínio de dimerização da proteína Myc parece necessário para a sua auto-regulação, o complexo heterodimérico formado por Myc e Max, sua proteína parceira, poderia se ligar a um sítio na região regulatória e regular negativamente *myc*. No entanto, nenhum sítio de ligação específico para Myc/Max foi detectado nas regiões regulatórias de *c-myc* humano ou de camundongo. É possível que exista mais de uma proteína parceira para Myc. Outra alternativa é que Myc/Max regulem a expressão de outros genes diretamente envolvidos no controle negativo da transcrição de *myc*.

Um mecanismo de auto-regulação, denominado regulação cruzada, foi observado nos diferentes membros da família *myc*. Quando *N-myc* é amplificado em tumores ou em linhagens celulares transfectadas ou ainda em ratos transgênicos, *c-myc* é regulado negativamente (NISEN *et al.*, 1986; NAU *et al.*, 1986; ZIMMERMAN *et al.*, 1986).

II.1.2.2. Regulação transcricional

Com a determinação do mecanismo envolvido na regulação da transcrição do gene *c-myc* poderemos compreender o seu verdadeiro papel na transformação celular e, portanto, na resposta das células à estímulos mitogênicos.

Embora inúmeros trabalhos tenham sido realizados com o objetivo de identificar o mecanismo molecular que controla a iniciação da transcrição do gene *c-myc*, este ainda permanece um enigma. Existem inúmeras controvérsias em relação as diferentes seqüências ou ainda a variação da posição de elementos regulatórios localizados acima e dentro dos genes murino e humano.

O controle transcricional de *c-myc* pode ocorrer em diferentes níveis incluindo iniciação da transcrição, alongação, produção e transporte de RNA, estabilidade do mRNA e iniciação da tradução. Tais controles podem ser operados coordenada e especificamente para cada tipo celular, de forma que, a regulação normal da expressão de *myc* possa estar associada a estímulos mitogênicos ou a indução da diferenciação.

O gene *c-myc* é transcrito a partir de três sítios de iniciação regulados independentemente. Os três sítios foram denominados promotores P1, P2 e P3. O gene

c-myc humano, apresenta um quarto sítio, denominado P0. P0 está localizado a 550-650pb da região 5' de P1. (BENTLEY & GROUDINE, 1986) (Fig. 2A).

O promotor P2 é responsável pela produção de 70-90% do mRNA total, P1 10-25% e, P3 produz aproximadamente 5% da transcrição efetiva de *c-myc*. P0 é responsável pela transcrição de 5% do mRNA total. Os respectivos tamanhos dos mRNA maduros de P0, P1, P2 e P3 são aproximadamente 2,5-3,1kb, 2,2kb, 2,4kb e 2,3kb (BATTEY *et al.*, 1983; SPENCER *et al.*, 1990).

Uma série de experimentos de transfecção utilizando o gene *c-myc* com deleções de determinadas seqüências demonstraram que uma grande variedade de efetores positivos e negativos são localizados acima do sítio de iniciação P1. As regiões localizadas à -101 de P1 não possuem nenhum efeito enquanto que, deleções na região -350 apresentam um efeito negativo e à -353 possuem efeito positivo (MARCUS *et al.*, 1992).

Ainda com relação a P1, a região localizada entre -608 e -407 também é fonte de muitas controvérsias. CHUNG *et al.*, 1986 revelaram que tal região contém elementos de controle negativo. É importante salientar que a uma mesma região de DNA pode se associar diferentes fatores de regulação. Estes fatores podem funcionar como reguladores positivos ou negativos nos diferentes tipos celulares.

O gene *c-myc* apresenta uma região “TATA box” além de uma seqüência rica em GC localizada à -44 de P1 as quais são necessárias para a iniciação da transcrição de P1. Tais regiões são altamente conservadas tanto no gene humano como em rato (NISHIKURA & MURRAY, 1987).

Outra região de particular interesse é localizada de -142 a -115. Foi identificada nesta região uma seqüência GGGTGGG, a qual se associa o fator de transcrição PuF. Entretanto, faz-se necessário posteriores experimentos que venham confirmar estas atividades de ligação (POSTEL *et al.*, 1991) (Figura 2B).

Um grande passo foi dado com a localização, dentro do primeiro exon do gene *c-myc* murino, de um elemento de ligação do fator de transcrição NF- κ B. O sítio de localização encontra-se à +440 a +459pb do P1 do gene *c-myc*. Tal elemento é caracterizado pela presença de uma seqüência AGGAATTTT. Mutações dentro destes elementos de regulação interna (IRE) impedem a indução da transcrição mediadas por NF κ B (KESSLER *et al.*, 1992) (Figura 2B).

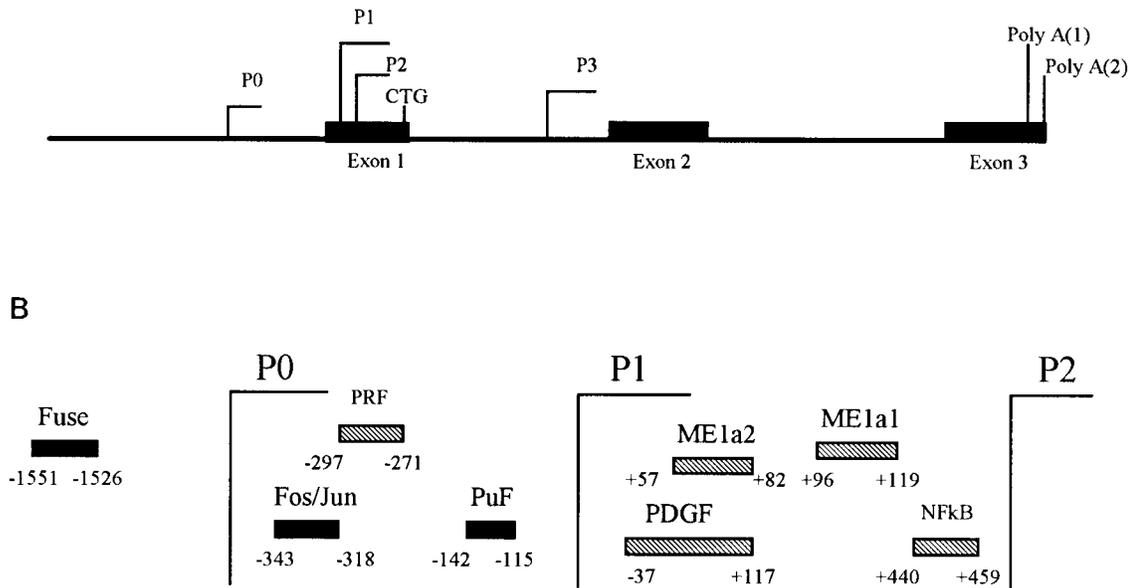


Figura 2. localização dos promotores de *c-myc* (2A) e de seqüências que controlam a iniciação da transcrição dos genes *c-myc* murino  e humano  (2B) (MARCU *et al.*, 1992).

O fator de transcrição NF κ B é um heterodímero composto de duas subunidades protéicas denominadas p50 e p65. A associação da subunidade p65 de NF κ B com a proteína inibitória I κ B resulta na formação de um complexo citoplasmático inativo. A fosforilação de I κ B libera o fator de transcrição NF- κ B e permite a sua migração do citoplasma para o núcleo. Os genes que codificam para p50 e p65 foram clonados e a porção amino-terminal de ambas as proteínas revelou que fazem parte de uma família de genes com considerável homologia com o oncogene *rel* (BAUERLE & BALTIMORE, 1989; GHOSH & BALTIMORE, 1990; NARAYANAN *et al.*, 1993).

A ativação de NF κ B pode ser mediada por diversos agentes mitogênicos (BOHNLEIN *et al.*, 1988; OSBORN *et al.*, 1989; BEG & BALDWIN, 1994). Além disso, foi verificado que estes agentes são capazes de induzir a expressão de *c-myc* em várias linhagens celulares sugerindo que em alguns casos a indução da expressão de *c-myc* esta diretamente relacionado com a ativação de NF κ B (KESSLER *et al.*, 1992).

O fator de transcrição NF κ B associa-se a elementos que controlam a expressão de vários genes, incluindo os genes da cadeia leve κ da Ig, IL-2, receptor para IL-2, e interferon β . Também foram detectados sítios de ligação de NF κ B em genes que codificam proteínas responsáveis pela adesão celular. A adesão celular entre as células, e das células com um substrato, representa um importante papel na regulação do crescimento celular normal ou neoplásico. Assim, acredita-se que o fator de transcrição NF κ B desempenha um importante papel na resposta inflamatória, tumorigenicidade e metástase (HIGGINS *et al.*, 1993).

De fato, através da inibição das funções do fator de transcrição NF κ B, pela utilização de oligonucleotídios anti-sense, foi possível observar que adesão celular de uma grande variedade de células encontrava-se fortemente comprometida (BAUERLE & BALTIMORE, 1989; LEONARDO & BALTIMORE, 1989; GHOSH & BALTIMORE, 1990).

Uma importante contribuição surgiu a partir do estudo de alguns sistemas celulares, que evidenciaram a associação entre o fator de transcrição NF κ B e proteínas de baixo peso molecular e, portanto, com grande capacidade de mobilização, denominadas HMG -*High mobility group* (THANOS & MANIATIS, 1992).

A infecção viral induz, transitoriamente, a transcrição do gene IFN- β . As seqüências de DNA necessárias para a indução viral estão localizadas a 104pb a cima do sítio de iniciação da transcrição do gene. Nessa região foram identificados quatro domínios de regulação positiva, denominados PRD I-IV, capazes de conferir a promotores heterólogos a indução viral. O elemento PRD II do gene IFN- β apresenta um elemento específico de associação do fator de transcrição NF κ B. Os autores revelaram que NF κ B desempenha um importante papel na indução viral do gene que

codifica para o IFN- β . Além disso, sugeriram que, a atividade de NF κ B depende da interação com uma proteína regulatória que se liga especificamente ao PRDII. Tal proteína é um membro da família de proteínas HMG a proteína HMG I(Y) (THANOS & MANIATIS, 1992).

Acredita-se que o fator de transcrição NF κ B desempenha um importante papel na regulação dos níveis de transcrição de *c-myc* o qual é fortemente associado a estados de crescimento alterado, bem como, de transformação neoplásica e apoptose (KESSLER *et al.*, 1992).

O primeiro exon do gene *c-myc* apresenta elementos que atuam em *cis* e acredita-se que regulam a iniciação da transcrição de P2. ME1a1 e ME1a2 foram os dois primeiros elementos identificados e estão localizados entre P1 e P2. ME1a1 (+96 à +119) e ME1a2 (+57 à +82) são os principais sítios de ligação dos fatores nucleares e são altamente conservados entre os genes humanos (MARCUS *et al.*, 1992).

Além destes elementos que atuam na regulação da transcrição de *c-myc*, sabe-se que a iniciação da transcrição de *c-myc* também pode ser regulada positiva ou negativamente em resposta a fatores de crescimento ou outros sinais mitogênicos. Fatores de crescimento tais como PDGF, IL-2 e TGF- α podem regular positivamente a iniciação da transcrição de *c-myc*. TNF- α e TGF- β inibem a transcrição de *c-myc*, sendo que, TGF- β afeta diretamente a iniciação da transcrição de *c-myc* (BUCKLER *et al.*, 1990; PIETENPOL *et al.*, 1990).

O mecanismo através do qual TNF- α inibe a iniciação da transcrição de *c-myc* permanece desconhecido. TGF- β parece interagir com um elemento próximo a P1, possivelmente via o produto de gene RB (PIETENPOL *et al.*, 1990).

A regulação transcricional de *c-myc* também é mediada pelo produto protéico de outros oncogenes - as oncoproteínas. Algumas tirosinas quinases como SRC e TRK provocam a expressão constitutiva de *c-myc* sugerindo que existe uma via de fosforilação comum (CLEVELAND *et al.*, 1989).

Uma oncoproteína analisada, que desempenha um papel duplo na ativação de *c-myc*, é a proteína E1A produzida pelo adenovirus 5. Tal proteína é capaz de trans-ativar o promotor P2 do gene *myc* humano. Entretanto, também existem dados da inibição da transcrição de *c-myc* pela E1A, novamente evidenciando as importantes contribuições do contexto celular.

EVAN *et al.* (1992), descreveram que a proteína c-Myb regula positivamente *c-myc*. Os autores identificaram múltiplos sítios de ligação acima do gene *c-myc* murino. Posteriormente foram identificados sítios de ligação de c-Myb localizados à 5' do promotor do gene *c-myc* humano. Análises detalhadas devem ser realizadas com o objetivo de verificar os efeitos de c-Myb em células normais e

transformadas, bem como, determinar qual o significado fisiológico de tal gene para a expressão de *myc* endógeno.

A regulação da transcrição, a nível de elongação, foi descrita primeiramente em sistemas procariotos e, recentemente foi identificada no controle de genes eucariotos. Este fenômeno representa um importante papel na regulação de muitos proto-oncogenes incluindo *c-myc*, *L-myc*, *c-myb*, *c-fos* (BENDER *et al.*, 1987).

O gene *c-myc* parece ser muito suscetível aos efeitos provocados por vários fatores de crescimento, fatores mitogênicos e agentes responsáveis pela indução da diferenciação que podem alterar o processo de elongação. Por exemplo, foi observado um drástico aumento no bloqueio da transcrição de *c-myc* após o tratamento de células HL-60 com ácido retinóico, agente responsável pela diferenciação celular. O mesmo fenômeno foi observado quando as células HL-60 foram tratadas com DMSO (MARCUS *et al.*, 1992).

A região envolvida na interrupção da elongação dentro do gene *c-myc* foi localizada a 180pb da extremidade 3' do exon 1 do gene murino. Para o gene *c-myc* humano uma seqüência de 95pb localizada à 35pb da extremidade 5', na região limite entre o exon1/intron 1, foi suficiente para interrupção transcricional. Não foi detectado nenhum produto transcrito e interrompido no exon1 acumulado no citoplasma das células. Estes produtos são degradados no núcleo (BENTLEY & GROUDINE, 1986).

II.1.2.3. Regulação pós-transcricional

O mecanismo de controle pós-transcricional representa um importante papel na regulação do gene *c-myc*, uma vez que, seu mRNA e seus produtos protéicos são normalmente muito instáveis.

Foi observado que o aumento nas taxas de transcrição, observado durante a fase inicial da estimulação com agentes mitogênicos, não é suficiente para causar um aumento de 20-40 vezes nos níveis de mRNA de *c-myc*. Outra importante observação é que a quantidade de c-Myc está diretamente correlacionado com os níveis de mRNA de *c-myc*. Uma possível explicação seria a existência de um mecanismo de controle pós-transcricional.

A modulação pós-transcricional pode resultar de uma alteração na estabilidade do mRNA no núcleo, do seu transporte ou ainda da sua estabilidade no citoplasma. Existem evidências de que a estabilidade citoplasmática do mRNA é o ponto no qual esta regulação ocorre.

As modificações pós-transcricionais contribuem para a regulação negativa de *c-myc* nas células em proliferação. Foi verificado que, em estágios tardios do desenvolvimento de uma linhagem celular de fibroblastos, ocorria uma diminuição nos níveis de mRNA de *c-myc* (MARCUS *et al.*, 1992).

O grau de regulação pós-transcricional de Myc parece ser específico para cada tecido *in vivo*, como foi verificado no desenvolvimento do tecido fetal e dos tecidos linfóides, do fígado e do cérebro de rato adulto. Fenômenos de modulação pós-transcricionais também ocasionaram efeitos positivos na expressão de *myc*. Tais efeitos decorreram do aumento dos níveis mRNA ou da alteração da estabilidade do mRNA de *c-myc* (BLANCHARD *et al.*, 1985).

Alterações no controle pós-transcricional, ocasionadas por translocação cromossômica envolvendo o primeiro exon, tem sugerido que o primeiro exon do gene *myc* está envolvido no controle transcricional. Na ausência do exon 1 o gene *c-myc* contribui para o desenvolvimento de processos carcinogênicos, através do aumento da estabilidade do mRNA (PIECHACZYK *et al.*, 1985).

A possibilidade de que o primeiro exon module eficientemente a tradução do RNA do gene *c-myc* ainda é fruto de muitas controvérsias e necessita estudos mais detalhados. São conhecidas algumas modificações pós-traducionais, mas os seus significados funcionais ainda permanecem desconhecidos. Foram identificados múltiplos sítios de fosforilação dentro da proteína c-Myc. Os resíduos serina e treonina são fosforilados entre os aminoácidos 240-262 e 342-357 por caseína quinase II. Acredita-se que a fosforilação dos resíduos 342-357, que precedem o domínio básico de ligação específica ao DNA, possa alterar a capacidade de c-Myc ligar-se especificamente ao DNA (LÜSCHER *et al.*, 1989).

Estudos realizados em *Xenopus laevis* demonstraram que c-Myc citoplasmática não é fosforilada, e que vem a ser fosforilada após sua translocação para o núcleo, onde passa a existir como uma fosfoproteína (KING *et al.*, 1986).

II.1.3. Mecanismo funcional: formação de heterodímeros

A proteína c-Myc apresenta duas regiões contínuas contendo helix-loop-helix (HLH) e zíper de leucinas (ZL), que mediam a formação de oligômeros, propriedade comum aos fatores transcricionais. A oligomerização, mediada por estes domínios, provoca uma alteração conformacional de forma que as regiões básicas se justapõem. Esta nova configuração permite a proteína interagir diretamente com seqüências de DNA específicas. A presença de ambos os motivos HLH e ZL é uma

característica encontrada em poucas proteínas incluindo TFE 3 (BECKMAN *et al.*, 1990), TFEB (CARR & SHARP, 1990), AP4 (HU *et al.*, 1990) e USF (GREGOR, 1990).

As propriedades funcionais dos domínios HLH e ZL foram caracterizadas através do uso de mutantes de *c-myc*. Observou-se, através de um experimento no qual foi utilizado um polipeptídeo quimérico originado da fusão das proteínas c-Myc com a Proteína A de *Staphylococcus*, que deleções realizadas na região carboxi-terminal resultam na formação de uma proteína monomérica ou de proteínas diméricas mutantes. Os 72 aminoácidos da região carboxi-terminal da proteína c-Myc eram suficientes para mediar a dimerização da proteína A monomérica e produzir um polipeptídeo quimérico A-Myc (DANG *et al.*, 1991).

O significado fisiológico de interações específicas na região ZL foi analisado *in vitro*. Não foi detectado nenhuma formação de homodímeros sugerindo que as funções de c-Myc necessitam a formação de heterodímeros com a sua proteína parceira (DANG *et al.*, 1991).

Grandes avanços foram possíveis através do isolamento de um clone obtido pela triagem de uma biblioteca de expressão. Nesta triagem foi utilizada como sonda uma proteína de fusão que continha a região básica, o domínio HLH e o domínio ZL de c-Myc. A proteína isolada interagiu com os domínios de oligomerização de c-Myc e foi denominada Max-proteína x associada à Myc (BLACKWOOD & EISENMAN, 1991; AMATI *et al.*, 1993).

Max, uma b/HLH/ZL, é capaz de ligar-se a N-Myc e L-Myc além de formar homodímeros. Esta interação parece ser específica uma vez que Max não interage com outras proteínas com domínios HLH, ZL ou HLH-ZL, tais como: E12, MyoD, Jun, Fos, USF e AP4 (KATO *et al.*, 1990).

O homodímero Max-Max e o heterodímero Myc-Max associam-se a uma sequência consenso CACGTG (BLACKWELL *et al.*, 1990; BLACKWOOD & EISENMAN, 1991; PRENDERGAST *et al.*, 1991). *In vivo* esta associação entre Max e Myc é fundamental para a transformação maligna. Contrariamente a Myc, que normalmente não se homo-oligomeriza, Max é capaz de formar homodímero e ligar-se ao DNA com alta afinidade (AMATI *et al.*, 1992; KRETZNER *et al.*, 1992; REDDY *et al.*, 1992).

In vivo, o heterodímero Myc-Max liga-se a uma sequência de DNA mais especificamente do que o homodímero Myc-Myc. Acredita-se que a função de Max é a de facilitar a ligação de Myc a este sítio. É possível que a associação com Max module a atividade regulatória do gene *c-myc*. Foi demonstrado que Max é transcricionalmente inativa mas que a associação com Myc a potencializa (AMATI *et al.*, 1992; ZERVOS *et al.*, 1993).

A proteína Max encontra-se expressa em todos os tecidos aos quais *c-myc* tem expressão e, em alguns, como cérebro adulto, nos quais *c-myc* não se expressa. Duas formas diferentes de Max são codificadas por um processamento alternativo de RNA. Uma proteína de 151 aminoácidos e, uma outra forma maior, devido a presença de 9 aminoácidos a mais na região amino-terminal da região básica.. A localização nuclear de Max deve-se a uma seqüência carboxi-terminal (KATO *et al.*, 1992).

A transcrição dependente de Myc parece ser modulada por outras proteínas celulares, incluindo oncoproteínas.

Em muitas linhagens celulares estudadas e no sistema nervoso, pode-se observar que a concentração de Max é muito mais alta do que qualquer proteína Myc. Isto sugere que Max pode formar oligômeros com outras proteínas que podem afetar a atividade de Myc. Os autores demonstraram que a proteína Max e as proteínas Myc são membros de um grande grupo de proteínas de interação. Desse grupo também fazem parte deste grupo Mxi 1 e Mad (AYER *et al.*, 1993; ZERVOS *et al.*, 1993).

II.1.4. Propriedades funcionais do polipeptídeo c-Myc

II.1.4.1. Ciclo celular

O gene *myc* pertence a uma classe de genes que produzem mRNA denominados de resposta precoce imediata, uma vez que, sua expressão é ativada por uma variedade de estímulos mitogênicos, independente da síntese de novas proteínas durante a transição da fase G₀ para G₁ nas células em mitose. Acredita-se que os produtos de genes precoces facilitam a progressão das células através do ciclo celular, bem como, a síntese de DNA na fase S.

Um grande numero de genes pertencentes a esta classe foram identificados e alguns deles, semelhante a *myc*, produzem proteínas que funcionam como fatores transcricionais.

As vias de ativação de *c-myc* foram exaustivamente estudadas em diferentes linhagens celulares de fibroblastos mantidas em culturas. O gene *myc* é fortemente induzido nas duas primeiras horas da fase G₁, após estimulação com fatores de crescimento.

KELLY *et al.* (1983), demonstraram a ativação de *myc* em resposta ao fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) ou de outras substâncias que mimetizam os efeitos de PDGF em fibroblastos BALB/3T3, incluindo, fator de

crescimento de fibroblasto (FGF) e o promotor tumorigênico-TPA (12-0-tetradecanolforbol-13acetato). Nestas células, a ligação de PDGF ao seu receptor ativa uma via de transmissão de sinais na qual participa uma proteína quinase dependente de Ca^{++} (PKC). Para esta linhagem celular, os agentes capazes de ativar diretamente PKC, conseqüentemente, induzem a expressão de *c-myc* (COUGHLIN *et al.*, 1985; FALETTO *et al.*, 1985).

A exposição das células BALB/3T3 a TPA provoca uma ativação direta de PKC. Uma exposição por um tempo prolongado a TPA levou a uma redução de mais de 70% na ativação do gene *myc* mediado por PDGF, em decorrência da dessensibilização da quinase C. Assim, para esta linhagem celular, PDGF ativa *c-myc* via PKC. Também foi verificado que nestas células o fator de crescimento epidermal (EGF) ou a Insulina não induzem a expressão de *c-myc* (COLE, 1986; MARCU *et al.*, 1992).

A ativação de *myc* mediada por PKC não é tão evidente em outras linhagens celulares aonde a proteína quinase A (PKA), ou ainda, outros sinais responsáveis pela transmissão de sinal estão envolvidos. Em células quiescentes de ratos Swiss 3T3, PDGF regula *c-myc* através do aumento de níveis intracelulares de AMP (cAMP) via um mecanismo indireto que foi também observado com foskolin, um ativador direto da adenilato ciclase (ROZENGURT *et al.*, 1983).

A indução da expressão de *c-myc*, em resposta a fatores de crescimento, não ocorre somente em fibroblastos mas na maioria das células durante a transição do estágio quiescente para o estágio proliferante. Além disso, a constitutiva expressão de *c-myc* permite que as células cresçam em condições de restrição dos fatores de crescimento específicos. Estas observações sugerem que a via de transmissão de sinais que leva uma célula a progredir através do ciclo celular e entrar na fase S esta em parte na dependência do aumento de c-Myc. Isto é, c-Myc fornece um receptor intracelular para o sinal do fator de crescimento. A ativação de *myc* nas diferentes vias intracelulares é um enigma a ser decifrado e, obviamente as diferenças fisiológicas celulares devem ser consideradas (MARCUS *et al.*, 1992).

Além da sua função na progressão do ciclo celular, acredita-se que *myc* desempenhe um papel importante na estimulação da síntese de DNA. Existe uma grande controvérsia no quanto a esta função. Tal suposição baseia-se no fato que Myc encontra-se transitoriamente associado com a parte externa da matriz nuclear durante a fase S. Acredita-se que a matriz nuclear seja um sítio de síntese de DNA e RNA (EILERS *et al.*, 1991).

De fato o polipeptídeo Myc co-fractiona com remanescentes da matriz nuclear, mesmo após enérgicos processos de isolamento. Tal observação pode ser somente uma irrelevância biológica, conseqüência de uma manipulação experimental. De qualquer forma tal associação permanece como uma proposta do papel de *myc* na replicação do DNA. As discrepâncias na literatura, referentes a associação de Myc com

outra proteínas da matriz nuclear, podem ser uma conseqüência de variações no ciclo celular, todavia, o significado biológico de tal associação para as funções de Myc deve ser melhor analisado (MARCUS *et al.*, 1992).

II.1.4.2. Diferenciação celular

Na maior parte das linhagens celulares estudadas, a expressão constitutiva de *c-myc* resulta, para a célula, a sua permanência no ciclo celular e, conseqüentemente, na inibição da diferenciação. Assim, assume-se que a capacidade de *c-Myc* inibir a diferenciação esta diretamente relacionada com a capacidade de transformação celular (DANG, 1991).

Com o objetivo de se analisar o papel de *c-myc* na proliferação e na diferenciação da linhagem celular derivada de leucemia promielocítica-HL 60, inibiu-se a expressão de *c-myc* utilizando oligonucleotídios específicos anti-*myc*. A direta inibição da expressão de *c-myc* foi associada a uma diminuição das taxas de crescimento e a indução da diferenciação da linhagem celular HL-60. Com o uso de oligonucleotídios sense e missense para o mRNA de *c-myc* não foi verificado nenhum efeito na indução da diferenciação mielóide (HOLT *et al.*, 1988).

A indução natural de diferenciação de células da linhagem mielóide de murino (M1) para macrófago e granulócito, resulta na *downregulation* de *c-myc* durante a fase final de diferenciação, bem como, na transição de G0/G1 e, este efeito encontra-se associado com a produção de interferon endógeno, um anti-mitogênico (MARCUS *et al.*, 1992).

A linhagem celular *Colo 320*, derivada de um carcinoma de cólon, apresenta altos níveis de expressão de mRNA de *c-myc*. Utilizando a metodologia anti-sense, foi verificada uma inibição de 40-75% na capacidade de formação de colônia em semi-sólido, após tratamento das células com oligonucleotídios anti-sense específicos para *c-myc*. Assim, a expressão de *c-myc* é necessária para manter o fenótipo indiferenciado destas células, a sua inibição conseqüentemente induz a um fenótipo diferenciado (COLLINS *et al.*, 1992).

Foi verificado que mutações na região do zíper de leucina reduzem significativamente a habilidade de *c-Myc* inibir a diferenciação celular. Inserções nesta mesma região resultam na perda da atividade de transformação. Um significativo grau de sobreposição entre tais regiões de *c-Myc* sugerem que a sua capacidade em inibir a diferenciação pode representar um papel fundamental na transformação neoplásica (STONE *et al.*, 1987).

II.1.4.3. Localização nuclear

A proteína c-Myc foi a primeira oncoproteína nuclear isolada (RAMSAY *et al.*, 1984; HANN & EISENMAN, 1984; PERSON & LEDER, 1984). A fusão de alguns genes e posterior análise de seu produto quimérico, permitiram determinar a seqüência de c-Myc importante no transporte da proteína para o núcleo. Assim quimeras de uma proteína piruvato quinase (PK), que é citoplasmática, com porções da proteína c-Myc permitiram determinar que os resíduos 320-328, denominado M1, induzem a completa localização nuclear (MARCUS *et al.*, 1992).

A região entre os aminoácidos 364 a 374, denominada M2, induz uma localização nuclear parcial. A sua remoção resulta em uma proteína mutante que é inativa quanto à capacidade transformacional (DANG *et al.*, 1989) (Fig. 3).

Peptídios sintéticos referentes a M1 e M2 foram conjugados com albumina humana e esses conjugados foram microinjetados no citoplasma de células *Vero*. O peptídio contendo M1 rapidamente se acumula no núcleo, enquanto que aquele contendo M2 tem um acúmulo menor além de uma localização parcial no núcleo. Assim, M1 funciona como sinal primário de localização nuclear de c-Myc e, M2 apresenta algumas outras funções que afetam a atividade de transformação. Uma parte da seqüência responsável pela ligação de c-Myc ao DNA encontra-se dentro da região denominada M2 (DANG, 1991).

II.1.4.4. Ligação não específica ao DNA

A proteína c-Myc possui a capacidade de ligar-se ao DNA em regiões não específicas (PERSON & LEDER, 1984; WATT *et al.*, 1985). O domínio do polipeptídio responsável por tal função foi identificado através da utilização de genes quiméricos que produzem uma proteína de fusão. Assim, a análise dos produtos protéicos resultantes da fusão de diferentes regiões do polipeptídio c-Myc com a proteína A do *Staphylococcus*, que não se liga ao DNA, revelaram que a porção localizada entre os resíduos 265-318 de c-Myc apresentava tal propriedade (DANG, 1991) (Fig.3).

Alguns autores sugerem que esta propriedade, de ligar-se a sítios de DNA não específicos, deve aumentar as taxas de reconhecimento de sítios de DNA específicos (DANG, 1991).

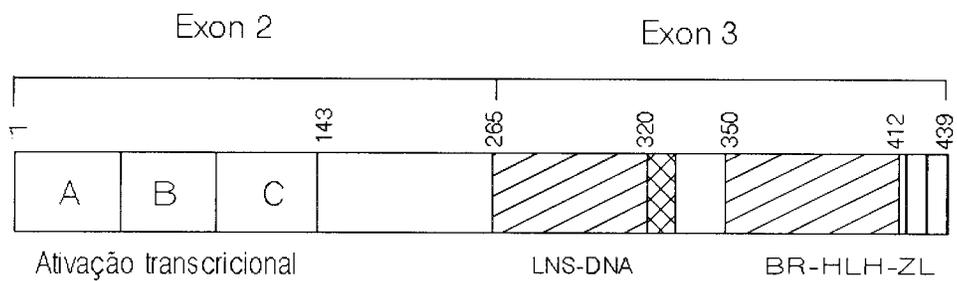


Figura 3. Anatomia funcional do polipeptídeo c-Myc. Os aminoácidos 1 à 439 são codificados pelos exons 2 e 3. Domínio necessário para co-transformação (aminoácidos 1-143 e 353-433). Domínio responsável pela localização nuclear (aminoácidos 320-328). Domínio de ligação não específica ao DNA (aminoácidos 265-318). Domínio de oligomerização (aminoácidos 355-435). As regiões **A**, **B**, **C** representam os domínios de ativação transcricional (DANG, 1991).

Também foi sugerido que tal propriedade pode ser importante para alguns dos papéis fisiológicos desempenhados pela proteína c-Myc, como por exemplo, a propriedade de transformação de células estabelecidas em cultura. De fato, a capacidade de c-Myc inibir a diferenciação de fibroblastos 3T3L1 é perdida após a deleção do domínio de ligação não específica ao DNA (KATO *et al.*, 1990).

II.1.4.5. Ativação de outros genes

Os fatores responsáveis pela ativação da transcrição apresentam dois domínios que funcionam independentemente. Um dos domínios interage com o DNA através de uma seqüência específica, de forma que o outro domínio possa ativar a transcrição. A estrutura dos domínios responsáveis pela ativação da transcrição apresenta regiões com seqüências ricas em prolina e glutamina e domínios ácidos.

De fato, o domínio amino-terminal de c-Myc é rico em glutamina e prolina e possui extensões curtas com resíduos ácidos. Os resultados de vários experimentos indicam que os aminoácidos 1-143, localizados nesta região e, que contribuem para a transformação neoplásica, são capazes de interagir com a "maquinaria" transcricional.

Os dados obtidos sugerem que a elevada expressão e/ou a expressão desregulada de *c-myc* encontra-se diretamente relacionada com a repressão ou indução de uma variedade de diferentes genes celulares, mas na maioria dos casos não foi determinada nenhuma ação direta de *c-myc* (MARCUS *et al.*, 1992).

Uma grande variedade de peptídeos de membrana mostraram ser regulados negativamente devido à expressão aumentada de *c-myc*. Um dos exemplos é o principal complexo de histocompatibilidade (MHC) da classe I que é regulado negativamente tanto por *c-myc* como por *N-myc* (LEONARDO *et al.*, 1989).

Estudos de transfecção transiente revelaram que muitos promotores contendo CACGTG podem ser positivamente regulados por Myc (AMATI *et al.*, 1993).

II.1.5. Myc e seu papel na transformação neoplásica

O gene *myc* pertence a uma categoria de oncogenes, tais como E1A de adenovírus (RULEY *et al.*, 1983), Large T de polioma (RASSOULZADEGAN *et al.*, 1982) e p53 (ELIYAHU, 1984) que são capazes de transformar parcialmente culturas

celulares primárias, mas não induzem ao fenótipo tumorigênico. Ou seja, a célula que apresenta uma expressão anormal do gene *c-myc* tem uma maior susceptibilidade para transformação celular.

A este fator pode ser somado a ação dominante de um outro oncogene ou a perda da função de um gene de supressão tumoral o que aceleraria o processo de transformação e, conseqüentemente, a progressão para um fenótipo maligno.

Experimentos de cooperação do oncogene *myc* com outros oncogenes confirmaram a idéia de que *myc* sozinho não causa tumorigênese, mas sem dúvida é um passo importante para o desenvolvimento de estados malignos. A análise de fibroblastos primários de rato, co-transfectados com o tipo selvagem de *c-myc* e a forma ativada de *ras*, permitiu determinar a capacidade de formação de focos. Sob estas condições, nem o gene *c-myc* e nem *ras* sozinhos são capazes de induzir a formação de focos (SKLAR *et al.*, 1991).

Com o objetivo de avaliar o relacionamento entre a estrutura primária da proteína c-Myc e algumas das suas propriedades funcionais foram criados alguns mutantes do gene *c-myc*, através de inserções ou deleções sítio dirigidas (STONE *et al.*, 1987)

A capacidade de co-transformação deste conjunto de mutantes foi analisada em fibroblastos derivados de embrião de rato. Deleções presentes entre os aminoácidos 144 à 320 da proteína c-Myc não afetam a capacidade de co-transformar células embrionárias de rato. Ao contrário, inserções e deleções que alteram a região carboxi-terminal reduzem drasticamente a atividade de transformação de c-Myc. Da mesma forma, foi verificado que deleções envolvendo os 143 aminoácidos localizados na região amino-terminal reduzem a atividade de transformação (DANG, 1991).

Um dos mutante apresentava deleção na porção amino-terminal e, portanto, não apresentava capacidade de transformação neoplásica. Por outro lado, apresentava a capacidade de formar oligômeros, uma vez que a região carboxi-terminal estava intacta. Este mutante comporta-se como um dominante negativo de c-Myc pois apresenta a propriedade de formar oligômeros inativos quando associado a proteínas parceira (STONE *et al.*, 1987; KATO *et al.*, 1990; SAWYER *et al.*, 1992).

Esta região amino-terminal e, que contém os aminoácidos 44-65, 127-144 e 184-200 foi detalhada e independentemente analisadas. Enquanto deleções nas duas primeiras regiões resultam na perda da atividade de transformação, deleções em uma porção do segundo ou no terceiro segmento inteiro não afetam tal capacidade. STONE *et al.* (1987) e DANG (1991), sugerem que a perda de pequenas porções dentro da região amino-terminal de c-Myc são toleradas, entretanto, grandes deleções resultam na perda da atividade de transformação. Desta forma, ficou demonstrado que os aminoácidos 106-143 são essenciais para a atividade de transformação.

A importância da região ZL na transformação foi confirmada por mutações sítio dirigidas as quais afetam a capacidade de inibir a diferenciação de fibroblastos 3T3L1 (FREITAG *et al.*, 1990). De fato, a integridade de tal região parece ser absolutamente essencial uma vez que mutantes que apresentam inserção nesta região, In370, In373 e In413, são totalmente inativos (STONE *et al.*, 1987).

Algumas dessas mutações foram também provocadas no gene *gag-myc* do vírus 29, o qual provoca mielocitomatose em aves. A atividade biológica dos produtos dos genes mutantes foi analisada através da capacidade destes transformarem células embrionárias de galinhas ou células da medula óssea. Os resultados deste estudo indicam que a capacidade de transformação é afetada por deleções na região carboxi-terminal de Myc, bem como, por grandes deleções localizadas na região amino-terminal (MIN & TAPAROWSKY, 1992).

Entretanto, foi observado que a deleção de 11 aminoácidos envolvendo a região acídica central do produto do gene *gag-myc* não afeta a atividade de transformação em células embrionárias de galinha mas, reduz drasticamente a eficiência de transformação em células hematopoiéticas de galinhas. Estes resultados são semelhantes àqueles obtidos com células embrionárias de ratos transformadas e células Rat 1a transformadas com o gene *c-myc* mutado (DANG, 1991).

II.1.6. Interação de *c-myc* com genes de supressão tumoral

Com a descoberta de genes supressores de tumor tais como o gene de susceptibilidade ao retinoblastoma (pRB) e p53 surgem inúmeras especulações sobre o(s) mecanismo(s) através do qual(is) os genes supressores de tumor desempenham o seu papel na tumorigênese (ITO *et al.*, 1992). Os genes p53 e pRB codificam fosfoproteínas nucleares que devem interagir, direta ou indiretamente, com genes que controlam o crescimento celular normal.

Algumas evidências levam a crer que a proteína pRb regula negativamente o crescimento celular. De fato, foram identificadas mutações nestes genes, responsáveis pela inativação do seu produto protéico, em uma grande variedade de tumores analisados. Também foi verificado, após a transfecção de várias linhagens celulares com o gene RB normal, que este era capaz de reverter o fenótipo neoplásico em algumas destas linhagens (GOODRICH & LEE, 1992).

Foram realizadas algumas análises suplementares com o objetivo de verificar a existência de uma interação entre o gene RB e *c-myc*. Uma grande contribuição surgiu com a observação de que, após o tratamento de uma linhagem celular de queratinócitos de rato (BALB/MK), com TGF- β , a proliferação celular era bloqueada e a expressão de *c-myc* diminuía. Por outro lado, queratinócitos que continham uma forma mutada de pRB, após tratamento com TGF- β , continuavam a expressar *myc*. Desta forma, acredita-se que a proteína pRb funciona como intermediária na transmissão do sinal entre o receptor de TGF- β e os reguladores negativos da transcrição de *myc* (PIETENPOL *et al.*, 1990).

Um recente estudo revelou que a proteína pRB pode se associar diretamente a c-Myc e N-myc. De fato, foram identificados dois sítios de ligação localizados entre os aminoácidos 41 a 178, uma vez que, na ausência de tais aminoácidos não foi observada tal associação protéica. Além disso, foi observado que a co-transfecção de *c-myc* e RB não provoca uma inibição no crescimento celular, como se observa com a transfecção do RB (GOODRICH & LEE, 1992).

Entretanto, a interação existente entre p53 e *c-myc* não é tão evidente quanto àquela existente com pRb. Provavelmente a proteína p53 não se associa diretamente a c-Myc, embora tenha sido observado que a p53 selvagem é capaz de suprimir a transcrição de um plasmídeo *c-myc*-CAT, enquanto que, a p53 mutada não é capaz de suprimir a transcrição deste plasmídeo (MARCUS *et al.*, 1992).

II.1.7. Mecanismo de ativação de *c-myc*

O mecanismo de translocação mais comumente encontrado em neoplasias envolvendo o gene *c-myc*, resulta de uma translocação do proto-oncogene *c-myc* para o *locus* da cadeia pesada das imunoglobulinas (IgH) ou para o *locus* da cadeia leve (IgL). As translocações, encontradas em aproximadamente 90% dos casos de leucemias, ocorrem entre os cromossomos t(8;14) na orientação 5'-5' dos *loci* *c-myc* e IgH. Assim, os exons 2 e 3, que codificam c-Myc, permanecem intactos e a quebra cromossômica pode ocorrer na porção 5' do exon 1, dentro do exon 1, ou ainda, no intron 1. As formas variantes ocorrem entre os cromossomos t(2;8) e t(8;22) justapondo o gene *c-myc* aos genes da cadeia leve das imunoglobulinas (TAUB *et al.*, 1982).

Observou-se amplificação gênica em neuroblastoma humano e em carcinoma de pequenas células de pulmão. Uma vez que, as seqüências de DNA amplificadas apresentavam grande homologia ao *c-myc*, foram denominadas N-*myc* e L-*myc* (KOHL *et al.*, 1983).

Tem sido encontrada ativação por inserção pro-viral em *c-myc* e *N-myc*. Foram descritas três formas de inserção do vírus de leucose aviária (ALV) em relação ao gene *c-myc*. Em uma das formas, a integração ocorre acima do gene *c-myc* na mesma orientação transcricional, produzindo um mRNA híbrido contendo seqüências pró-virais unidas com seqüências 5' do gene *c-myc*. No segundo tipo, a inserção é localizada abaixo do gene *c-myc* dando origem a um transcrito híbrido contendo seqüências pró-virais unidas a 3' do mRNA de *c-myc*. A última modalidade caracteriza-se pela inserção acima do gene *c-myc*, mas em orientação transcricional oposta (PAYNE *et al.*, 1982).

A maioria dos tumores apresentava inserção pró-viral com integração nos sítios a montante do gene *myc*, ou mais raramente, dentro do exon 1 e, geralmente, na orientação transcricional oposta (VAN LOHUIZEN *et al.*, 1989).

Desde a descoberta do gene *c-myc*, há mais de dez anos, a sua estrutura e sua função tem sido exaustivamente estudadas, tanto em células normais como em células derivadas de tumores. Entretanto, muito ainda deve ser estudado quanto a estrutura e a função do seu produto gênico.

II.1.8. Expressão de *c-myc* em tumores humanos

A amplificação do gene *myc* tem sido identificada em uma grande variedade de tumores humanos e geralmente está associada a um fenótipo altamente maligno (SCHWAB *et al.*, 1984; BRODEUR *et al.*, 1984). Altos níveis da expressão do gene *c-myc*, devido a amplificação do gene, foram identificados em células de adenocarcinoma gástrico, carcinoma de pequenas células do pulmão (SCLC) (LITTLE *et al.*, 1983), glioblastoma, carcinoma de mama (KOZBOR & CROCE, 1984), carcinoma de cólon (ALITALO *et al.*, 1983), leucemia pró-mielocítica e leucemia granulocítica (COLLINS & GROUDINE, 1982; DALLA-FAVERA *et al.*, 1982). *N-myc* está amplificado em várias linhagens celulares de neuroblastomas, retinoblastoma, SCLC (SCHWAB *et al.*, 1984; GARSON *et al.*, 1985). *L-myc*, até o momento, encontra-se amplificado somente em SCLC (NAU *et al.*, 1986).

Os três membros da família *myc* expressam-se diferencialmente em mamíferos. *N-myc* e *L-myc* exibem um padrão de expressão muito restrito, tanto com relação aos tecidos como aos estágios específicos do desenvolvimento. Ambos foram detectados em estágios muito precoces do desenvolvimento de várias linhagens celulares diferenciadas. Elevados níveis de expressão de *N-myc* e *L-myc* são associados ao desenvolvimento do processo neoplásico, geralmente atribuídos a sua amplificação no genoma, restrito a células que constituem seu sítio normal de expressão *in vivo*. Tais genes não apresentam funções diferencialmente atribuídas, no entanto, as suas

potencialidades para transformação de fibroblastos, em colaboração com o oncogene *ras*, diferem sendo que *c-myc* > *N-myc* > *L-myc* (ZIMMERMAN *et al.*, 1986).

Translocação cromossômica é uma característica comum à muitas células malignas, especialmente de origem hematopoiética. Foram descritas em um grande número de tumores translocações específicas que envolvem o gene *c-myc*. Além dos bem caracterizados rearranjos do *locus* do gene *c-myc* em linfoma de Burkitt (BL) e *murine plasmocytoma* (MPCs), também foram encontrados rearranjos do gene *c-myc* em leucemia de células T, células B e leucemia linfocítica. Como em BL, em MPC o alelo de *myc* também sofre translocação recíproca ou para o *locus* do gene da cadeia leve da imunoglobulina (IgL) ou para o *locus* correspondente ao gene da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH). Neste casos somente o alelo translocado se expressa, enquanto que, o alelo normal permanece transcricionalmente silencioso (CORY, 1986).

Uma vez que translocações do alelo *c-myc* são uma característica comum a muitos pacientes com BL e MPC e que tais translocações não ocorrem ao acaso, posteriores investigações devem ser realizadas com o objetivo de determinar o mecanismo envolvido em tal rearranjo genético, bem como verificar se tal fenômeno ocorre em outras formas de tumores humanos.

II.2. Neoplasias da tireóide humana

Os tumores da tireóide, particularmente os tumores malignos, representam uma forma pouco freqüente de patologia. Análises epidemiológicas revelaram que as taxas anuais, dos novos casos diagnosticados, variam entre as diferentes áreas geográficas. Na Inglaterra varia de 0,9/100,000 em homens a 2,4/100,000 nas mulheres. Nos EUA a freqüência varia de 2,1/100,000 em homens e 5,2/100,000 nas mulheres. Portanto, os canceres da tireóide ocorrem numa freqüência de 0,6% a 1,6% de todos os canceres entre os homens e mulheres nos EUA. Embora imprecisos, os dados obtidos entre as mulheres da população do Kuwaiti são alarmantes e chegam a uma freqüência de 10,5% (HENDERSON, *et al.*, 1991; FARID, *et al.*, 1994).

A incidência dos canceres da tireóide aumentou nos últimos anos tanto nos EUA como na Europa e Ásia. Isto naturalmente reflete uma maior precisão na realização dos diagnósticos, além da emergência dos canceres após a exposição a radiação ionizante em decorrência de inúmeros acidentes radioativos. O mais grave deles, o acidente de Chernobyl em abril de 1986, atingiu a Ucrânia, Polônia, alguns países do Golfo Báltico e a região oeste da Europa. Outro acidente radioativo ocorreu

na ilha Bikini em março de 1954 e atingiu uma grande parte da população das ilhas *Marshall* (CONARD, *et al.*, 1970; DOBYNS, *et al.*, 1992).

Além disso, a incidência aumenta de maneira surpreendente quando são consideradas as biópsias positivas para tumores da tireóide em indivíduos que apresentam diferentes causas de morte. Podem ainda, assumir valores extraordinariamente elevados se forem incluídos na estatística as formas malignas que são diagnosticadas como carcinoma oculto da tireóide (ROSEN, 1990; BORING *et al.*, 1991).

A distribuição dos tipos histológicos é muito variável nas diferentes áreas geográficas e diferentes análises. Inúmeros fatores podem contribuir para a variabilidade de incidências relatadas nas várias casuísticas. Tipos específicos de neoplasias malignas da tireóide são associadas às áreas do mundo onde o bócio endêmico é prevalente. Análises de algumas populações indicaram um aumento do risco do desenvolvimento do câncer em associação com o bócio (FRASSILA *et al.*, 1981).

Estudos epidemiológicos confrontados com a distribuição dos vários tipos histológicos ressaltam o possível papel etiológico, provavelmente indireto, das condições de carência de iodo no desenvolvimento do carcinoma folicular da tireóide. A associação entre carência de iodo e carcinoma folicular ainda deve ser melhor definida, entretanto, é claro o papel etiológico das radiações iônicas no desenvolvimento do carcinoma papilífero da tireóide. De fato, vários estudos epidemiológicos colocam em evidência uma correlação entre o desenvolvimento de câncer do subtipo papilífero e irradiação nas regiões do colo, testa e na porção superior do tórax realizada na infância ou adolescência (HEITZ *et al.*, 1976).

Também foi observado uma relação entre a absorção de iodo radioativo e um aumento na incidência de carcinoma papilífero. Tal fato foi observado principalmente em alguns indivíduos de populações expostas às radiações, como aqueles que vivem nas ilhas *Marshall*, japoneses que sobreviveram a bomba atômica e, mais recentemente a população que sofreu o incidente de Chernobyl. No entanto, foi verificado que as regiões de maior incidência de carcinoma tireóideo são as ilhas do Havaí e, de fato, são regiões de origem vulcânica com emissão radioativa (KAZAKOV *et al.*, 1992).

Embora não constituam uma das principais causas de morte por câncer, provavelmente, a transformação maligna das células da tireóide humana não seja um evento tão raro. Desta forma, parece muito coerente, estudar este tipo de carcinogênese como modelo geral de carcinogênese humana.

Os tumores da tireóide representam uma categoria interessante de neoplasia do ponto de vista biológico. A maior parte dos tumores se origina do mesmo tipo de célula, a célula folicular e, apresentam um amplo espectro de alterações com

malignidade crescente. Compreendem diversas formas identificadas de acordo com vários critérios histológicos, evolução clínica e comportamento biológico que inclui desde adenomas macrofoliculares e microfoliculares benignos, carcinomas bem diferenciados dos subtipos folicular e papilífero às formas completamente invasivas que culminam em morte como carcinomas anaplásicos (HEITZ, 1976).

Os carcinomas dos subtipos papilífero e folicular são as formas mais comumente encontradas de tumores da tireóide. Caracteristicamente, o carcinoma papilífero é mais encontrado no sexo feminino com maior incidência na terceira e quarta idade. Tende a permanecer localizado na tireóide e nos linfonodos adjacentes e metastatiza via linfática, enquanto que o subtipo folicular metastatiza aos linfonodos regionais via corrente sanguínea e, freqüentemente, se difunde aos ossos e pulmão. Os carcinomas indiferenciados e anaplásicos são formas mais raras e atingem indivíduos com idade mais avançada (WILLIANS, 1979).

Portanto, os tumores da tireóide podem constituir um modelo interessante para a análise molecular da carcinogênese à estágios múltiplos, uma vez que se originam de um único tipo de célula. As diferenças observadas no comportamento biológico podem explicar o envolvimento dos diferentes eventos responsáveis pela patogênese.

11.2.1. Alterações moleculares envolvidas em neoplasias da tireóide humana.

Até algum tempo atrás pouco se sabia sobre a ativação de oncogenes, ou ainda, sobre a inativação de genes supressores de tumor nos processos de carcinogênese da tireóide. Devido aos progressos tecnológicos, associados a uma intensa dedicação dos pesquisadores, os carcinomas da tireóide humana constituem, entre os tumores sólidos, a classe tumorigênica onde foram detectadas o maior número de alterações moleculares e, portanto, a melhor caracterizada.

Mutações envolvendo o gene *ras* são presentes em todos os estágios de progressão tumoral de uma célula folicular tireóidea, desde o adenoma ao carcinoma diferenciado folicular e, finalmente, na forma mais maligna representada pelo carcinoma indiferenciado. Existe ainda muita controvérsia quanto ao papel do gene *ras* nos carcinomas diferenciados e quanto à sua freqüência de ativação. Vários estudos têm demonstrado uma baixa freqüência de ativação nas formas diferenciadas e, uma possível explicação, seria a proveniência dos tumores analisados. Os genes pertencentes a família *ras*, H, K e N-*ras*, apresentam um produto protéico altamente homólogo, denominada p21, localizado junto a membrana celular, envolvido na transdução do sinal de crescimento e/ou diferenciação da célula (LEMOINE *et al.*, 1989; FARID *et al.*, 1994).

A sua função bioquímica depende da proteína encontrar-se na forma ativa ou inativa. O oncogene e seu proto-oncogene equivalente diferem em apenas um par de bases. A alteração, uma mutação pontual, leva a síntese de um produto gênico anormal. Tal produto, que encontra-se sob a forma ativa, representa para a célula um sinal de proliferação contínua (LEMOINE *et al.*, 1989).

Entre as alterações moleculares em carcinomas do subtipo papilífero, a forma mais freqüente é representada pela ativação do oncogene RET/PTC (*Papillary Thyroid Carcinoma*). O gene RET foi isolado pela primeira vez de um linfoma de células T. Entretanto, o rearranjo envolvendo o proto-oncogene RET não foi detectado no tecido neoplásico de origem sendo, portanto, decorrente dos processos de transfecção. No caso de RET/PTC a ativação é específica de tecidos tumorais, uma vez que, pela técnica de Southern *blot*, é possível detectar rearranjos genéticos devido a presença de bandas extras em tecidos neoplásicos, não encontradas no tecido normal (TAKAHASHI *et al.*, 1985).

A ativação do oncogene RET/PTC ocorre em aproximadamente 20 % dos tumores da tireóide do subtipo papilífero. O oncogene RET/PTC foi isolado, pela primeira vez, ao transfectar células NIH/3T3 com o DNA de um paciente que desenvolveu carcinoma papilífero da tireóide (GRIECO *et al.*, 1990).

O gene clonado e caracterizado demonstrou ser uma quimera devido à fusão do domínio tirosina (*tk*) quinase do proto-oncogene RET com o gene H4. Tal união ocorre devido a um rearranjo intracromossômico do tipo inversão, localizada no braço longo do cromossomo 10, inv(10q11.2-10q21) (GRIECO *et al.*, 1990; BONGARZONE *et al.*, 1993; SANTORO *et al.*, 1992; PIEROTTI *et al.*, 1992).

Recentemente, foram identificadas outras duas formas de rearranjos envolvendo o oncogene RET, denominados RET/PTC2 e RET/PTC3. Assim, o rearranjo envolvendo RET/H4 foi re-nomeado RET/PTC1. No caso de RET/PTC2 a fusão ocorre com a subunidade regulatória da proteína A, dependente de cAMP, codificada por um gene localizado no cromossomo 17. RET/PTC3 origina-se da fusão com o gene RFG (RET *fused gene*) localizado no cromossomo 10 (BONGARZONE *et al.*, 1994; SANTORO *et al.*, 1994). Uma característica comum dos três genes que se fundem ao RET é a capacidade de se expressar de forma ubíqua e, provavelmente, os seus promotores permitem a expressão da forma alterada de RET nas células foliculares. De fato, o proto-oncogene RET não é normalmente expresso em células foliculares da tireóide (FABIEN *et al.*, 1992).

O proto-oncogene RET codifica uma proteína receptora para um fator de crescimento desconhecido, a qual é constituída de um domínio extra-celular rico em cisteína e um domínio trans-membrana hidrofóbico, que precedem um domínio tirosina-quinase intra-citoplasmático. Recentemente foi revelado, através de uma análise comparativa das seqüências nucleotídicas do proto-oncogene RET, uma similaridade

com as proteínas caderinas. As caderinas são uma super-família de proteínas com atividade trans-membrana que mediam a adesão celular na dependência de íon Ca^{++} (TAKAHASHI *et al.*, 1993).

A partir da análise de tecidos normais e de tecidos derivados de tumores humanos, de rato e de camundongo, foi verificado que o proto-oncogene RET é expresso de maneira específica em determinados tecidos e estágios do desenvolvimento. De fato, a sua expressão foi primeiramente detectada em tecidos embrionários de rato, mais especificamente por volta do décimo dia da embriogênese, nos tecidos derivados da crista neural. Em ratos adultos normais, foram detectados baixos níveis de expressão no pulmão, coração, fígado e intestino. Por outro lado, foram detectados aumentos significativos nos níveis de expressão nos tecidos derivados de cérebro, timo e testículo (AVANTAGIATO *et al.*, 1994).

Entre os tecidos derivados de tumores, foi detectado um aumento da expressão do proto-oncogene RET em linhagens celulares derivadas de neuroblastoma, carcinoma medular da tireóide e feocromocitoma. Estas linhagens celulares induzidas à diferenciação com ácido retinóico foram acompanhadas por um aumento na expressão do proto-oncogene RET. Tal fato, leva a crer que RET apresenta um importante papel na diferenciação e/ou proliferação de células neurais. Também foi verificado que a expressão de RET/PTC1 em uma linhagem celular de tireóide de rato, dependente de hormônio tireotrófico, é suficiente para ultrapassar os eventos que normalmente regulam a divisão celular, ocasionando, desta forma, a proliferação celular na ausência deste hormônio (SANTORO *et al.*, 1993).

Na verdade, pouco se conhece sobre o verdadeiro papel fisiológico do proto-oncogene RET, ou ainda de como a sua versão ativada pode contribuir para o desenvolvimento do processo neoplásico. Acredita-se que além de regular a proliferação de determinadas células, ele participe de outros processos que não o mitogênico. De fato, a sua expressão fisiológica é restrita às células de origem neuroendócrinas (IKEDA *et al.*, 1990; SANTORO *et al.*, 1990; TAHIRA *et al.*, 1991).

O mecanismo molecular responsável pela atividade de transformação do oncogene RET ainda deve ser determinado. Estudos recentes têm indicado que enquanto Ret é uma molécula com características de um receptor associado à membrana, que não é fosforilado intrinsecamente em resíduos tirosina, ambas as formas oncogênicas de RET (RET/PTC1 e RET/PTC2) são constitutivamente fosforiladas em resíduos de tirosina. Tais proteínas apresentam auto-fosforilação *in vitro* e sofrem transferência da membrana da célula para o citoplasma. A frequência da ativação do gene RET em pacientes que desenvolveram carcinomas papilífero da tiróide parece variar entre as diferentes áreas geográficas, levando a crer que existem diferenças genéticas ou ainda os fatores ambientais envolvidos na ativação de RET em carcinomas papilíferos (JHIANG & MAZZAFERRI, 1994).

Recentemente, foram identificadas mutações pontuais envolvendo o proto-oncogene RET em pacientes com neoplasias endócrinas múltiplas do tipo 2A, 2B, (MEN 2A e MEN 2B), carcinoma medular da tireóide de origem familiar (FMTC) e, em pacientes que desenvolveram doença de Hirschsprung (MÜLLIGAN *et al.*, 1993; SANTORO *et al.*, 1994; ROMEO, *et al.*, 1994; VAN HEYNINGEN, 1994).

Foram detectadas outras três alterações gênicas em pacientes com carcinoma papilífero da tireóide decorrentes da ativação de *NTRK* (proto-oncogene TRK). A primeira forma ativada do gene NTRK é decorrente de um rearranjo intracromossomal envolvendo seqüências 5' do domínio *tk* do gene NTRK com seqüências do gene que codifica para a proteína tropomiosina (TPM3). Ambos os genes estão localizados no cromossomo 1 (SOZZI *et al.*, 1992).

O produto do gene NTRK é uma proteína de superfície de membrana com atividade tirosina-quinase, que funciona como receptor de alta afinidade ao fator de crescimento de células nervosas (NGF, *Nerve Growth Factor*). A sua expressão é restrita aos gânglios periféricos. Entretanto, o gene quimérico, devido ao rearranjo, pode ser expresso de forma ubíqua (BARBACID *et al.*, 1991).

Subseqüentemente, foi observado que em alguns casos de carcinoma papilífero da tireóide, a ativação do gene NTRK era decorrente de um rearranjo intracromossomal no qual estava envolvido o gene TPR. O gene quimérico decorrente da fusão do domínio *tk* do gene NTRK com seqüências 5' do gene TPR foi denominado TRK-T1. Mais recentemente foi identificada uma nova forma de rearranjo extracromossomal do gene NTRK1 envolvendo o gene TAG, localizado no cromossomo 3. Muitas evidências indicam que a capacidade de transformação da oncoproteína TRK, não ocorre devido a ativação do domínio tirosina-quinase, mas a características estruturais conferidas a seqüência presente na extremidade 5' do gene quimérico (GRECO *et al.*, 1992).

A ativação de TRK ocorre em 17% dos casos de carcinoma papilífero da tireóide (MARTIN-ZANCA 1986; BONGARZONE *et al.*, 1989; GRIECO *et al.*, 1990; SANTORO *et al.*, 1993).

Foi verificado que os oncogenes TRK e RET/PTC1 são capazes de reduzir ou bloquear o processo de diferenciação das células tireóideas, embora tais células não apresentem a capacidade de crescimento e formação de colônia em meio semi-sólido, ou ainda, de provocar tumores em ratos atímicos, sinais típicos de transformação. Entretanto, quando em cooperação com as formas virais *Ha-ras* e *Ki-ras* tanto RET/PTC1 quanto TRK provocam, o desenvolvimento de um fenótipo altamente maligno na linhagem de células epiteliais de tireóide de rato PC CL3 (FUSCO *et al.*, 1987a,b; SANTORO *et al.*, 1993).

No que se refere à inativação dos genes supressores de tumor, foi verificado que, mutações no gene p53 podem ter um papel fundamental tanto na determinação como na progressão para um fenótipo indiferenciado e invasivo em tumores da tireóide humana. O gene humano p53 está localizado no cromossomo 17p e codifica uma fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos. A proteína p53 normal é uma proteína que se liga, não especificamente, a seqüências de DNA, bem como, a seqüências específicas que controlam a atividade transcricional de determinados genes. Mediante às técnicas de *single strand conformational polymorphism*-SSCP e imunohistoquímica, foram identificadas mutações envolvendo o gene p53 em carcinomas do tipo diferenciado, parcialmente diferenciado e, indiferenciado da tireóide em freqüências que variam de 22-85% (ITO *et al.*, 1992; FAGIN *et al.*, 1993; DONGHI *et al.*, 1993)

A linhagem celular NPA, derivada de um carcinoma papilífero da tireóide, apresenta uma mutação no códon 266:Gly/Glu. A linhagem WRO, derivada de um carcinoma papilífero, apresenta uma mutação no códon 223:Pro/Leu e, a linhagem celular ARO, derivada de um carcinoma anaplásico, contém uma mutação no códon 273:Arg/His (PARK *et al.*, 1994). Portanto, mutações nos diferentes exons podem provocar diferentes efeitos fisiológicos.

Resultados obtidos *in vitro*, a partir de transfecção de uma linhagem celular de tireóide de rato PC CL3, permitiram confirmar que mutações envolvendo o gene p53 causam a perda da diferenciação desta linhagem celular. Assim, a presença de mutações no gene p53 podem conferir a neoplasias da tireóide a perda da diferenciação celular (FUSCO *et al.*, 1987a).

Também foi verificado que o cromossomo 11, região 11q13, contém um determinado número de genes que estão envolvidos no controle do crescimento celular, incluindo genes que predispõem ao desenvolvimento de múltiplas neoplasias endócrinas do tipo 1 (MEN1). Em alguns indivíduos que desenvolveram carcinoma folicular da tireóide foi verificado a perda de um dos alelos, sugerindo que um gene supressor de tumor deve estar localizado neste *locus* e, a sua perda pode ocasionar a manifestação direta de tal fenótipo (MATSUO *et al.*, 1991).

Mais recentemente, foram detectadas alterações citogenéticas e moleculares do cromossomo 3 em pacientes que desenvolveram carcinoma folicular da tireóide. Provavelmente, um gene supressor de tumor localizado no braço curto do cromossomo 3, deve estar envolvido na progressão deste subtipo de carcinoma. Assim, a perda em heterozigose de um locus do cromossomo 3p encontra-se associada ao desenvolvimento de carcinoma da tireóide do subtipo folicular (HERMANN *et al.*, 1991).

II.2.2. *c-myc* e seu papel no desenvolvimento do processo de carcinogênese da tireóide humana

Até o presente momento não existe nenhuma evidência de alterações estruturais envolvendo o gene *c-myc* em tumores da tireóide. Entretanto, resultados conflitantes são observados no que se refere a correlação da expressão de *c-myc* e o desenvolvimento de tumores da tireóide humana.

Alguns autores verificaram que a expressão de *c-myc* encontra-se aumentada em todos os tumores derivados da tireóide humana, tanto benignos como malignos (YAMASHITA *et al.*, 1986). Outros autores, detectaram um aumento na expressão de *c-myc* somente em tumores malignos da tireóide. Altos níveis de expressão de mRNA de *c-myc* foram detectados em 13 dos 23 pacientes com carcinomas da tireóide analisados (HAUGEN *et al.*, 1993).

Estudos realizados com linhagem celular de rato demonstraram que a estimulação com TSH promove a expressão do proto-oncogene *c-myc*. Entretanto, foi verificado que a super expressão de *c-myc* e *c-fos* não estava relacionada com a estimulação prévia com TSH.(COLETA *et al.*, 1986). Foram detectados altos níveis de expressão de mRNA de *c-myc* em um paciente que apresentava adenoma, em um caso de doença de Graves e, em dois tecidos derivados de tireóide normal (TERRIER *et al.*, 1988).

SHI *et al.* (1993), realizaram uma análise comparativa entre os níveis de mRNA do receptor para TSH e do mRNA de *c-myc*. Foi verificado que a desdiferenciação das células de tumores derivados da tireóide está diretamente relacionada com uma diminuição nos níveis do mRNA para o receptor de TSH e, um aumento nos níveis de expressão de *c-myc*. Dados referentes a expressão de *c-myc* no desenvolvimento embrionário humano sugerem que a ativação do gene *c-myc* é somente um marcador da proliferação celular, mas sua atividade reflete uma regulação tecido específica desenvolvida durante a embriogênese (PFAIFER-OHLSSON *et al.*, 1985).

Também foi verificado que em algumas linhagens celulares, altos níveis de mRNA de *c-myc* não correspondem a super expressão de *c-myc* mas, a uma maior estabilidade do mRNA (DANI *et al.*, 1984; RABBITS *et al.*, 1985).

Embora, suponha-se uma correlação entre a elevada expressão de *c-myc* e o desenvolvimento de um fenótipo maligno, pouco se sabe sobre o verdadeiro significado da acentuada expressão de *c-myc* em neoplasias tireóideas. Entretanto, as recentes informações obtidas sobre o polipeptídio Myc forneceram subsídios suficientes para uma análise detalhada do papel de *c-myc* no desenvolvimento dos processos tumorigênicos da tireóide humana.

Objetivos

1. Verificar a existência de uma correlação entre os elevados níveis de expressão do proto-oncogene *c-myc* e a progressão maligna das células foliculares da tireóide. Analisaremos, por Northern *blot*, tumores e linhagens celulares estabelecidas em cultura, derivados de pacientes que desenvolveram carcinomas da tireóide.

2. Investigar se aumentos nos níveis de expressão do proto-oncogene *c-myc*, correspondem a aumentos na síntese da proteína c-Myc. Nessa etapa, analisaremos as linhagens celulares pela técnica de Western *blot*.

3. Analisar a eficiência do oligonucleotídeo anti-sense específico para o mRNA do proto-oncogene *c-myc* em bloquear a síntese da proteína c-Myc.

4. Verificar o crescimento celular após o bloqueio da síntese da proteína c-Myc com o oligonucleotídeo anti-sense específico para o mRNA do proto-oncogene *c-myc* através da síntese de DNA, curva de crescimento celular e capacidade de formação de colônia em meio semi-sólido.

5. Analisar os efeitos da supressão das funções da proteína c-Myc, nas linhagens celulares, através da transfecção com dominantes negativos de c-Myc.

6. Identificar a existência de um efeito diferencial das subunidades protéicas p50 e p65 do fator de transcrição NFκB na ativação da transcrição de genes responsáveis pelo crescimento celular das linhagens derivadas de carcinoma da tireóide.

7. Investigar, se determinado um efeito na ativação transcricional, a participação de uma das subunidades protéicas do fator de transcrição NFκB na regulação da transcrição do proto-oncogene *c-myc*.

Material & Métodos

IV.1. Linhagens celulares e tumores frescos

Os tecidos derivados de tumores da tireóide foram obtidos do laboratório de Histologia e Citologia, Centre Hospitalier Lyon Sud, França. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C para posterior processamento.

As linhagens celulares derivadas de carcinomas da tireóide humana foram as seguintes: TPC1 (TANAKA *et al.*, 1987); WRO (ESTOUR *et al.*, 1989; NPA (PANG *et al.*, 1989); ARO (FAGIN *et al.*, 1993); NIM 1 (ZEKI *et al.*, 1991) e B-CPAP (FABIEN *et al.*, 1994). As linhagens celulares foram mantidas em cultura em meio Dulbecco's Mod Eagle Medium-DMEM (Gibco cat. 041-01965) enriquecido com 10% de FCS (Cat. 200-6170AJ). A classificação das linhagens celulares utilizadas neste estudo e as suas propriedades tumorigênicas encontram-se resumidas na tabela 1.

IV.2. Obtenção de RNA total

A extração de RNA total a partir dos tumores sólidos em estudo foi realizada pelo método padrão com a introdução de algumas modificações (SAMBROOK *et al.*, 1989). É importante salientar que foram tomadas algumas medidas de segurança para prevenir a degradação do RNA. Desta forma, esterilizamos os materiais utilizados na homogeneização do tecido ou do extrato celular, as soluções e a água utilizada. Além disso, todo o material utilizado para o processamento era descartável e, com a utilização de luvas, manejado cuidadosamente.

Uma porção do tumor, extraído cirurgicamente, foi congelada imediatamente em nitrogênio líquido e conservada a -70°C . Para o procedimento o tecido foi pulverizado em nitrogênio líquido com auxílio de um pistilo. Ao pó obtido adicionamos 5 volumes de uma solução GT (4M tiocinato de guanidina, 25mM citrato de Sódio, 0,5 % sarcosil e 0,1M 2-mercaptoetanol) e então foi homogeneizado com polytron a 3000 rpm por 30 segundos. Tal procedimento foi repetido até homogeneização total e posteriormente centrifugado a 4000 rpm por 2 minutos a 4°C (Centrífuga Beckman refrigerada, modelo J2-21- rotor JA20).

Tabela 1. Classificação histológica e propriedades tumorigênicas das linhagens celulares derivadas de carcinomas da Tireóide humana utilizadas neste estudo.

Linhagem Celular	Tipos Histológicos	Eficiência de Formação de colônia em meio semi-sólido (%).	Tumorigenicidade em rato atômico.
TPC-1	Papilífero	0	Não
WRO	Folicular	8	Sim
NPA	Papilífero	18	Sim*
NIM 1	Papilífero	0	Sim*
B-CPAP	Papilífero	0	Não
ARO	Anaplásico	70	Sim*
FRO	Anaplásico	38	Sim**

* Tumores pequenos aparecem após um mês

** Tumores grandes aparecem após duas semanas

As amostras derivadas de linhagens celulares mantidas em culturas foram ressuspensas diretamente em solução GT para procedimento imediato ou estocadas a -20°C para posterior extração com fenol ácido.

Após adição da solução GT o homogeneizado, obtido a partir do tecido sólido ou de extrato celular, foi passado várias vezes através de uma agulha de seringa para que o DNA fosse quebrado e, desta forma, eliminado mais facilmente. Após este procedimento foi adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 2M pH 4,0; 1/2 do volume de fenol ácido e 1/5 do volume de clorofórmio-álcool isoamílico 49:1 e, incubado a 4°C por 15 minutos.

As amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 20 minutos a 4°C (Centrifuga Beckman refrigerada modelo J2-21-rotor JA20). Ao sobrenadante foi adicionado 1 volume de álcool isoamílico e precipitado a -20°C por 1 hora. O precipitado obtido após centrifugação foi ressuspendido em 5 volumes de solução GT e precipitado com 0,6 volume de isopropanol a -20°C por 1h. Após centrifugação por 30 minutos a 14000rpm (Microcentrifuga eppendorf), a 4°C, o precipitado foi ressuspendido em água estéril. A concentração do RNA foi determinada pela leitura da A260 em espectrofotômetro. Após quantificação, o RNA foi precipitado pela adição de 0,3M de NaCl e 2,5 volumes de etanol absoluto e estocado a -20°C. A qualidade do RNA foi verificada pela visualização em gel de agarose 1%.

IV.3. Northern blot

Amostras contendo 10 ug de RNA total foram precipitadas por centrifugação a 14000rpm (Microcentrifuga eppendorf), por 30 minutos a 4°C, ressuspensas em tampão desnaturante (50% formamida, 1X MOPS, 2,2M formaldeído, 50% glicerol, 0,25% azul de bromofenol), aquecidas a 68°C e aplicadas em gel de agarose 1% desnaturante (2,2M formaldeído) para separação eletroforética a 100V por aproximadamente 6 horas. O RNA foi transferido para um filtro de nylon (Hybond-N, Amersham) por capilaridade em tampão 10XSSC por aproximadamente 16 horas e fixado em luz UV por 5 minutos.

Os filtros foram pré-hibridizados em solução de alta stringência a 42°C por pelo menos 4 horas. Esta solução contém 50% de formamida, 6XSSC, 0,1% SDS, 300µg/ml ssDNA e 2X denhardt's. A hibridização foi realizada a 42°C por aproximadamente 16 horas em solução de pré-hibridização contendo a sonda marcada radiativamente pelo método de *random priming* (Amersham cat. RPN 1600) e com atividade específica de

10⁹cpm/ μ gDNA. Os filtros foram lavados duas vezes por 30 minutos a 56°C em condições de alta estringência (0,1%SDS, 0,2XSSC) e expostos a filmes de Raio-X Kodak XAR (cat.165 1454) com intensificadores a -80°C.

A sonda específica para o gene *c-myc* humano corresponde ao cDNA do gene *c-myc* humano de 1,2kb clonada no sítio *Pst*I do plasmídeo pBR322. Esta sonda, denominada pRyc 7,4, detecta um fragmento RNA específico de 2,0kb (NISHIKURA *et al.*, 1983).

Uma vez que o produto do gene *c-myc* forma um heterodímero com o produto do gene *max*, analisamos também os níveis de expressão do gene *max* nas linhagens celulares estudadas e nos controles. A sonda que detecta seqüências específicas para o gene *max* foi obtida pela amplificação de um fragmento utilizando a técnica de PCR e clonado no sítio *Hind*III-*Pst*I do plasmídeo pJ3 Ω . O fragmento de 500pb detecta dois fragmentos de RNA específicos de 1,8kb e 2,0kb (BLACKWOOD & EISENMAN, 1991).

A sonda que detecta seqüências específicas para a subunidade p65 do fator de transcrição NF κ B foi subclonada no sítio *Eco*RI do vetor de expressão pMT2T (ISRAEL & KAUFMAN, 1989).

Como controle da quantidade de RNA total aplicado no gel foi utilizada uma sonda de β -actina (TOKUNAGA *et al.*, 1986).

IV.4. Extração de proteína.

As placas contendo linhagens celulares mantidas em culturas foram primeiramente lavadas com PBS 1X (150mM NaCl, 6mM Na₂HP0₄, 4mM NaH₂P0₄), recuperadas e, o extrato celular obtido foi ressuscitado em tampão PBS 1X. Após centrifugação a 14000rpm (microcentrifuga eppendorf), por 5 minutos a 4°C, o pellet foi congelado em nitrogênio líquido, descongelado em gelo e, ressuscitado em 5 volumes de tampão de extração de proteína (100mM HEPES pH 7,9, 400mM NaCl, 0,1mM EGTA, 5% glicerol, 10 μ g/ml de aprotinin, 0,1mM PMSF, 0,1mM DTT). Após centrifugação a 14000rpm (Microcentrifuga eppendorf), por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi recuperado e realizado quantificação protéica pelo método de coloração por Bio-Rad protein assay (cat.500.0006) e leitura em espectrofotômetro a A595.

Para obtenção de proteínas a partir de tecidos sólidos, os tumores foram macerados em nitrogênio líquido e ressuscitados diretamente no tampão de extração de proteínas, processados e quantificados como mencionado acima.

IV.5. Western blot.

As amostras protéicas foram aplicadas em um gel SDS-PAGE com sistema de polimerização química descontínua, o qual utiliza um *stacking gel* (acrilamida 4%, 0,125M Tris pH 6,3, 0,1% SDS, 0,1% de persulfato de amônia e 0,05% TEMED) e um gel de separação (10% acrilamida, 0,375M Tris pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% TEMED, 0,1% de persulfato de amônia). A separação eletroforética foi realizada por aproximadamente 16 horas em tampão (25mM Tris, 192mM Glicina) e sob condições constantes de mA.

As proteínas foram transferidas eletroforicamente para uma membrana PVDF (Immobilon-P -Millipore cat. IPVH 304), utilizando o aparelho Transphor Electrophoresis (Biorad TE 42) por 2 horas a 4°C. A membrana e o gel foram previamente equilibrados em solução de transferência (39mM Glicina; 48mM Tris; 20% Metanol).

As membranas foram saturadas a temperatura ambiente por duas horas em solução contendo 1% de leite magro em pó (NFDM-Bio-Rad cat. 170-6404) ressuspenso em tampão TBS 1X (20mM Tris-HCl pH 7,5; 0,15M NaCl) por 2 horas a temperatura ambiente. Após pré-hibridização foram realizadas 5 lavagens a temperatura ambiente por 5 minutos em tampão TTBS 1X (20mM Tris-HCl pH 7,5; 0,15M NaCl; 0,05% Tween 20).

A hibridização foi realizada pela incubação em solução de pré-hibridização contendo 10µg/ml anticorpo monoclonal *c-myc* (Oncogene science-cat. OP10). Após sucessivas lavagens realizadas a temperatura ambiente em solução TBS 1X e uma lavagem em solução TTBS 1X, as membranas foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente com IgG de rato conjugado com *Horseradish Peroxidase* (HRP) diluída 1:1000 em solução de pré-hibridização. Após várias lavagens de em tampão TTBS 1X e uma última com tampão TBS 1X, as membranas foram incubadas em reagente ECL-Amersham (cat. RPN 2106) por 1 minuto e expostas a um filme ECL-Amersham (cat. RPN 2103) por diferentes tempos de exposição. Os filmes foram revelados dentro dos processos habituais de autoradiografia.

O anticorpo monoclonal *c-myc* (Ab-1) é originado pela imunização de ratos BALB/c com peptídeo sintético (Oncogene Science cat. OP10). Reconhece tanto por imunoprecipitação como imunoblotting uma proteína de humana de 67000 daltons além de seus derivados (EVAN & HANCOCK, 1985).

IV.6. Oligonucleotídios utilizados

Os oligonucleotídios sintéticos produzidos pela Eurogentec, Belgium (cat. 0L-0042) foram modificados para fosforotioate, para prevenir a degradação por nucleases, purificados por cromatografia e precipitação com etanol. Os oligonucleotídios liofilizados foram ressuspendidos, em tampão Hepes pH 7,1, inativado por 30 minutos a 56°C e, quantificados por leitura em espectrofotômetro a A260 (STEIN *et al.*, 1993).

Os oligonucleotídios para o gene *c-myc* utilizados neste estudo contém 15 resíduos e são complementares a seqüências de DNA presentes na extremidade 3' do segundo exon, que corresponde a região de iniciação da transcrição. O oligonucleotídio missense utilizado não apresenta homologia com nenhuma seqüência de DNA conhecida (HOLT *et al.*, 1988; COLLINS *et al.*, 1992).

Oligonucleotídio sense *c-myc*:

5'>ATG CCC CTC AAC GTT<3'

Oligonucleotídio anti-sense *c-myc*:

3'>AAC GTT GAA GGG CAT<5'

Oligonucleotídio missense:

5'>TAG CGG AGG TTC GAA<3'

Os oligonucleotídios específicos para a subunidade p65 e p50 do fator de transcrição NFκB apresentam 21 resíduos e correspondem à extremidade 5' dos respectivos mRNA além de 3 ou 4 nucleotídios presentes acima do códon de iniciação (NARAYANAN *et al.*, 1993).

NFκB p65 sense:

5' >GCC ATG GAC GAA CTG TTC CCC<3'

NFκB p65 anti-sense:

5'>GGG GAA CAG TTC GTC CAT GGC<3'

NFκB p50 sense:

5'>AGA ATG GCA GAA GAT GAT CCA <3'

NFκB p50 anti-sense:

5'>TGG ATC ATC TTC TGC CAT TCT <3'

IV.7. Análise da síntese protéica.

A análise da capacidade dos oligonucleotídios em bloquear a síntese protéica foi realizada pelo tratamento das células ARO com oligonucleotídios sense ou anti-sense adicionados ao meio de cultura. Após 72 horas do tratamento foi preparado um extrato protéico, como citado anteriormente e, posterior análise pelo método de Western *blot*. O filtro foi hibridizado com anticorpo monoclonal específico para a proteína c-Myc (Oncogene Science ca. OP10).

IV. 8. Análise da capacidade de crescimento e formação de colônia em meio semi-sólido.

As placas de meio semi-sólido foram preparadas a partir das seguintes soluções estoque: ágar nobel 1,25% (Difco cat. 0142-01), TPB 2,95% (Difco cat. 0060-01-6), meio de cultura F12 (2X) e soro bovino (CS). A mistura final continha: 4 partes de ágar nobel, 4 partes de meio de cultura, 1 parte de TPB e 1 parte de CS (MACPHERSON & MONTAGNIER, 1964)

Para analisar a capacidade de formação de colônia em meio semi-sólido algumas das linhagens celulares foram tratadas por 24 horas com oligonucleotídios sense, anti-sense e missense adicionados ao meio de cultura. Vinte quatro horas após o tratamento com oligonucleotídios específicos, 10^4 e 2×10^4 células, correspondentes a controles positivos bem como das linhagens celulares a serem analisadas, foram ressuspensas em 1 ml da mistura acima mencionada e plaqueadas (Corning 60mm- cat. 25011). As placas foram analisadas ao microscópio entre os dias 5-15. O resultado é uma média, da contagem realizada no 15º dia, entre as células que cresceram e formaram colônia e as células que não cresceram. Os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes.

Com o objetivo de verificar se a taxa de inibição era dependente da concentração utilizada, alguns experimentos foram realizados utilizando concentrações de $4\mu\text{M}$ e $8\mu\text{M}$ dos oligonucleotídios específicos para *c-myc*.

Os oligonucleotídios modificados e purificados, específicos para a subunidade p50 e p65 do fator de transcrição NF κ B foram utilizados a uma concentração de $20\mu\text{M}$ (NARAYANAN *et al.*; 1993).

IV.9. Análise da taxa de crescimento celular.

Para avaliar o efeito do bloqueio da síntese da proteína c-Myc na taxa de crescimento celular, 10^5 células das respectivas linhagens celulares foram plaqueadas (Falcon 35mm cat 3001) e, 24 horas após serem plaqueadas, tratadas com oligonucleotídios sense, missense e anti-sense adicionados ao meio de cultura. Estudos iniciais foram realizados pela adição de uma única dose de oligonucleotídios ao meio de cultura. As células foram mantidas nesse mesmo meio de cultura. Uma curva de crescimento celular foi realizada pela contagem das células em câmara de Burcher após 24, 48 e 72 horas do tratamento com os oligonucleotídios. Análises subsequentes foram realizadas pela troca diária do meio de cultura e adição de oligonucleotídios específicos.. Os resultados representam a média de pelo menos dois experimentos.

IV.10. Análise da taxa de síntese de DNA.

Para analisar a taxa da síntese de DNA após o bloqueio da síntese da proteína c-Myc, pelo uso de oligonucleotídios sense e anti-sense, 10^5 células foram plaqueadas (Falcon 35mm cat. 3001) e, após quinze horas, tratadas com oligonucleotídios específicos. A síntese de DNA foi quantificada 24 e 72 horas após o tratamento, pela taxa de incorporação de [^3H]timidina ($4\mu\text{Ci}$ [$2\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$]-Amersham). As células foram fixadas em 10% de ácido tricloro-acético e solubilizadas em $20\mu\text{M}$ NaOH e 0,1% SDS. Uma alíquota foi utilizada para quantificação em aparelho de cintilação. Os resultados foram expressos em porcentagem na inibição da incorporação de timidina. Cada valor obtido é uma média de pelo menos dois experimentos realizados em duplicata.

IV.11. Transfecção celular.

Com o objetivo de avaliar a capacidade dos plasmídios que contém cDNA mutado de *c-myc*, denominados dominante negativos e, do controle com cDNA normal, em suprimir a síntese de c-Myc e, conseqüentemente, reduzir a transformação celular, as linhagens celulares ARO e FRO foram sujeitas a

transfecção celular estável com 20µg do plasmídio pSRA1phaMSVTKNEO Myc IN 373, pSRA1phaMSVTKNEO e pMV6tkNeo Myc D106-143 (SAWYERS *et al.*, 1992). As transfecções foram realizadas pelo método de precipitação com fosfato de cálcio segundo as indicações do fabricante (Stratagene cat. 200285).

Após 48 horas, as células foram tratadas com o antibiótico gentamicina (G-418), numa concentração de 400µg/ml. Após duas semanas de seleção foram obtidos alguns clones os quais foram expandidos para análise dos efeitos de interação específica. Os clones foram mantidos em seleção para evitar que células sem o plasmídio por nós transfectado e, que lhes conferia resistência ao antibiótico, pudessem crescer.

Os clones obtidos foram analisados, por comparação com as linhagens celulares do qual se derivaram, quanto a capacidade de crescimento e formação de colônia em meio semi-sólido e a taxa de crescimento celular.

Os plasmídios utilizados em tal experimento foram transformados por eletroporação em linhagem de bactéria *E.coli*-JM101, purificados pelo método de lise alcalina (Quiagen cat. 12162), quantificados por A260 e em gel de agarose 1%.

O plasmídio pSRA1phaMSVTKNEO Myc IN 373 foi construído pela introdução de adaptadores no sítio *Xho*I os quais contêm 4 resíduos de serina entre as posições 373 e 374 (DANG *et al.*, 1989). O plasmídio D-106-143 foi construído a partir de deleções de seqüências, como descrito por STONE, *et al.* (1987). O cDNA do gene *c-myc* foi subclonado no sítio *Eco*RI do PSRαMSVtkneo (MULLER *et al.*, 1991).

Resultados

V.1. Análise da expressão do proto-oncogene *c-myc* em linhagens celulares derivadas de carcinomas da tireóide humana.

Com o objetivo de detectar os níveis de expressão do proto-oncogene *c-myc* humano analisamos, pela técnica de Northern *blot*, sete linhagens celulares derivadas de carcinoma da tireóide humana. A origem de cada uma das linhagens celulares, bem como suas propriedades tumorigênicas encontram-se resumidas na tabela 1.

Detectamos, através de uma análise comparativa das linhagens celulares em estudo com uma cultura primária de tireóide humana normal, diferenças nos níveis de expressão do gene *c-myc*. Os níveis de expressão observados nas linhagens celulares NIM-1, B-CPAP, NPA e TPC-1 encontram-se aumentado cinco a dez vezes. Na linhagem WRO ocorreu um aumento de até 20 vezes, enquanto que, um aumento de cinquenta à cem vezes foi detectado nas linhagens ARO e FRO. Tais resultados são baseados na análise por densitometria (Figura 4).

Através de uma análise paralela das propriedades tumorigênicas dessas linhagens, descritas na tabela 1 (página 36), verificamos que as linhagens celulares capazes de induzir a formação de tumor em ratos atímicos foram as linhagens derivadas de carcinomas anaplásicos e, que apresentaram os mais altos níveis de expressão do gene *c-myc*.

Os resultados obtidos a partir da análise da expressão do gene *max* não revelam nenhuma diferença nos níveis de expressão entre as linhagens celulares derivadas de carcinomas da tireóide e a linhagem controle derivada da tireóide normal.

V.2. Análise da expressão do proto-oncogene *c-myc* em tumores da tireóide humana.

Nós analisamos quarenta e cinco neoplasias da tireóide humana derivadas de diferentes tipos histológicos e, seis bóciós nodulares com o objetivo de detectar os níveis de expressão de proto-oncogene *c-myc*. Os resultados encontram-se resumidos na tabela 2 e os dados mais representativos são mostrados na figura 5.

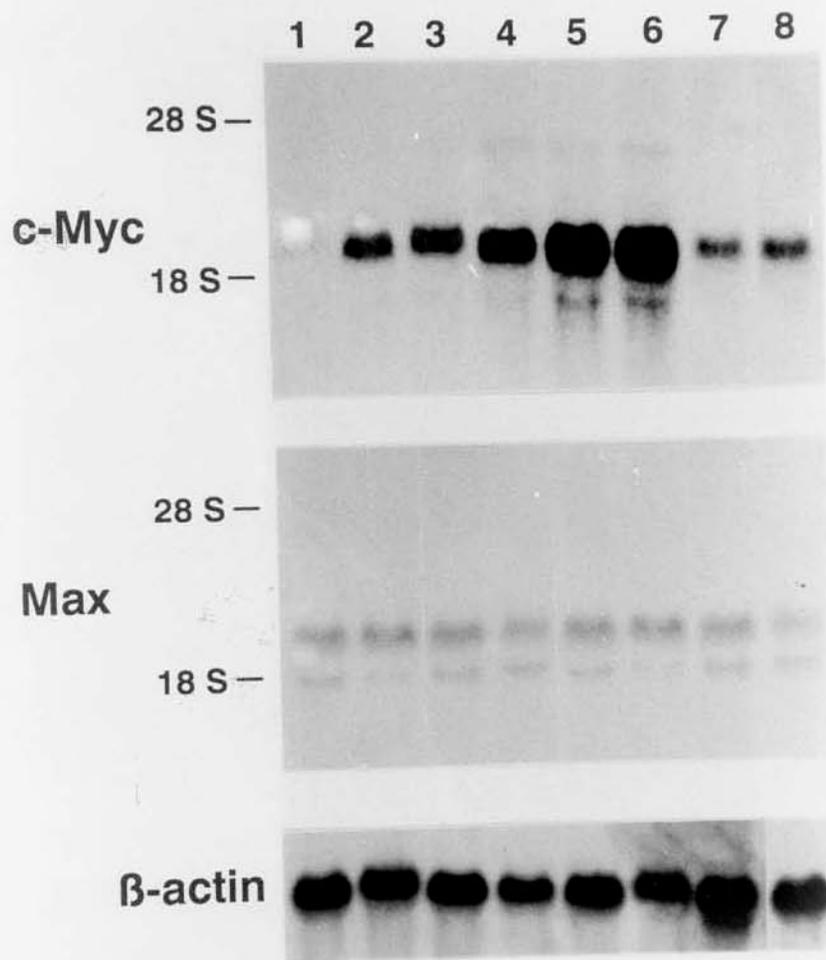
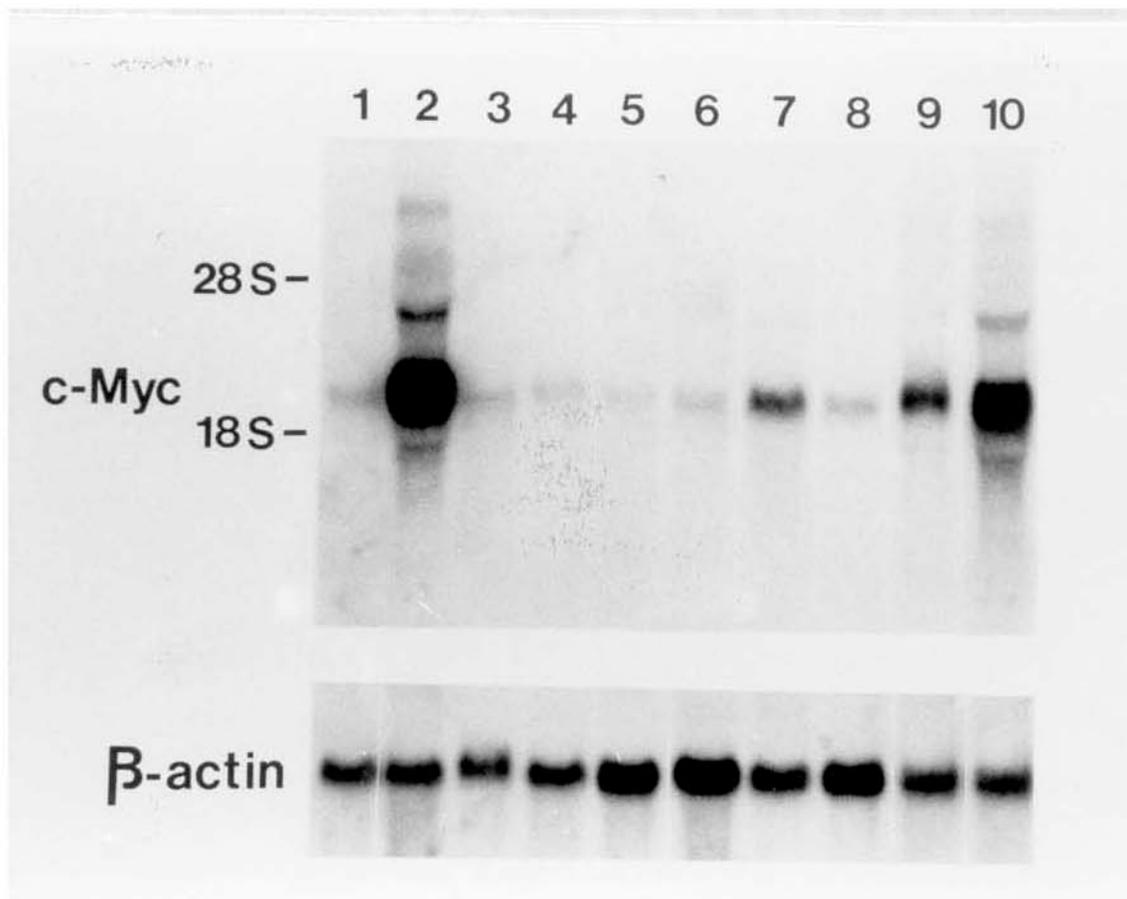


Figura 4. Análise da expressão do gene *c-myc* e do gene *max* em células derivadas de cultura primária de tireóide normal (1); e nas sete linhagens celulares TPC1 (2); NPA (3); WRO (4); ARO (5); FRO (6); NIM 1 (7); B-CPAP (8). O filtro contendo 10µg de RNA total foi hibridizado com β-actina como indicador da quantidade de RNA.

Tabela 2. Análise da expressão do proto-oncogene *c-myc* em tumores da tireóide humana.

Tipo Histológico	Nº de Pacientes com altos níveis de mRNA de <i>c-myc</i>*/Nº de Pacientes analisados.
Carcinoma Papilífero	5/25
Carcinoma Folicular	1/8
Carcinoma Anaplásico	5/6
Adenomas	0/5
Bócio	0/6

* Os níveis de mRNA foram considerados elevados quando superavam a 3 vezes os níveis em tireóide normal.



Com o objetivo de determinar o significado do aumento na síntese de proteínas Myc nos processos de crescimento e transformação celular, a síntese da proteína Myc foi bloqueada pelo uso de oligonucleotídeos anti-sense correspondentes.

Figura 5. Análise da expressão do proto-oncogene *c-myc* em tireóide normal (1) e nove carcinomas da tireóide humana. Três carcinomas anaplásicos (2,9,10); cinco carcinomas papilíferos (3,4,5,6,8) e um carcinoma folicular (7). As amostras contendo 10µg de RNA total foram transferidas para um filtro Hybond-N (Amersham) e hibridizadas com uma sonda que detecta mRNA específico para *c-myc*. Como indicador de quantidade o filtro foi hibridizado com β-Actina.

Na análise de adenomas não foi detectado nenhum aumento significativo nos níveis de expressão de *c-myc*. Entre os foliculares, somente um apresentava um aumento significativo (Figura 5, amostra 7). Uma pequena porcentagem dos carcinomas papilíferos revelaram um modesto aumento na expressão de *c-myc* (Figura 5, amostras 3,4,5,6, e 8), enquanto que, em três dos seis carcinomas anaplásicos foram detectados níveis elevados de mRNA de *c-myc* (Figura 5, amostras 2,9 e 10).

V.3. Níveis de c-Myc.

Com o objetivo de verificar se os aumentos dos níveis de expressão do mRNA específico de *c-myc* correspondem aos níveis na síntese da proteína Myc, analisamos seis das linhagens celulares (WRO, ARO, FRO, B-CPAP, NPA, e NIM1) pela técnica de Western *blot*.

Os resultados obtidos pela análise das linhagens demonstraram que os níveis da proteína Myc encontram-se aumentado em todas as linhagens analisadas. Níveis significativamente elevados foram detectados nas linhagens ARO e FRO (Figura 6, colunas 2 e 3), quando comparadas com os controles normais derivados de uma tireóide normal e de uma cultura primária de tireóide normal (Figura 6, colunas 4 e 5).

V.4. Análise da eficiência dos oligonucleotídios em bloquear a síntese protéica.

Com o objetivo de determinar o significado do aumento na síntese da proteína Myc nos processos de crescimento e transformação celular, a síntese da proteína Myc foi bloqueada pelo uso de oligonucleotídios anti-sense correspondentes a região de iniciação da transcrição localizada na extremidade 5' do segundo exon. A linhagem celular ARO foi tratada com oligonucleotídios anti-sense e sense e a eficiência do oligonucleotídio anti-sense em bloquear a síntese protéica foi verificada por Western *blot*. O resultado demonstra que os níveis de proteína Myc são significativamente reduzidos em pelo menos cinco vezes em comparação com as células ARO não tratadas ou tratadas com o oligonucleotídio sense específico (Figura 7).

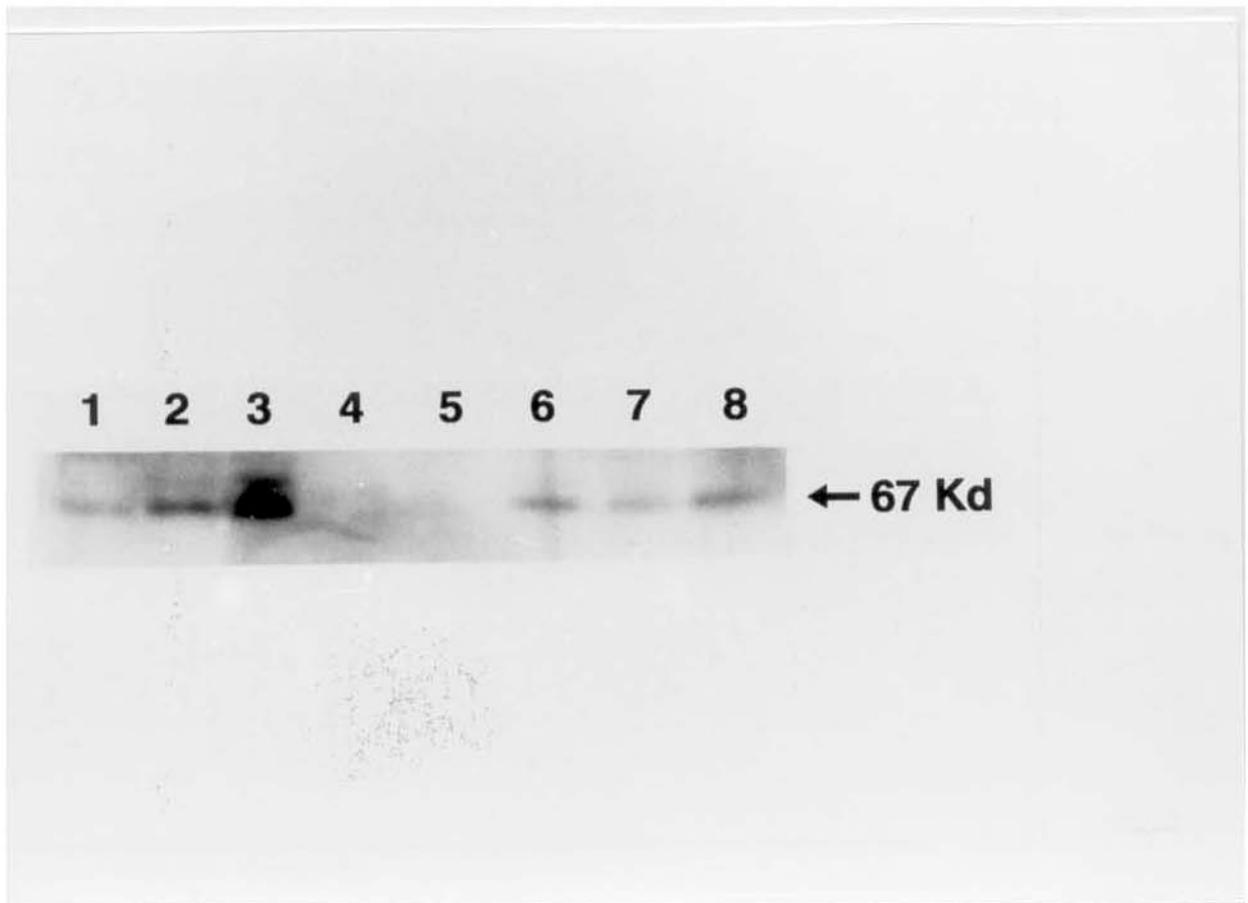


Figura 6. Autoradiografia demonstrando análise por Western *blot* das Linhagens celulares derivadas de carcinoma da tireóide WRO (1); ARO (2); FRO (3); B-CPAP (6); NPA (7); NIM1 (8) e dos controles obtidos a partir de uma cultura celular primária de tireóide normal (5) e de tecido derivado de tireóide normal (4). O filtro contendo 80 μ g de extrato protéico foi hibridizado com 10 μ g/ml de anticorpo monoclonal específico para a proteína Myc.

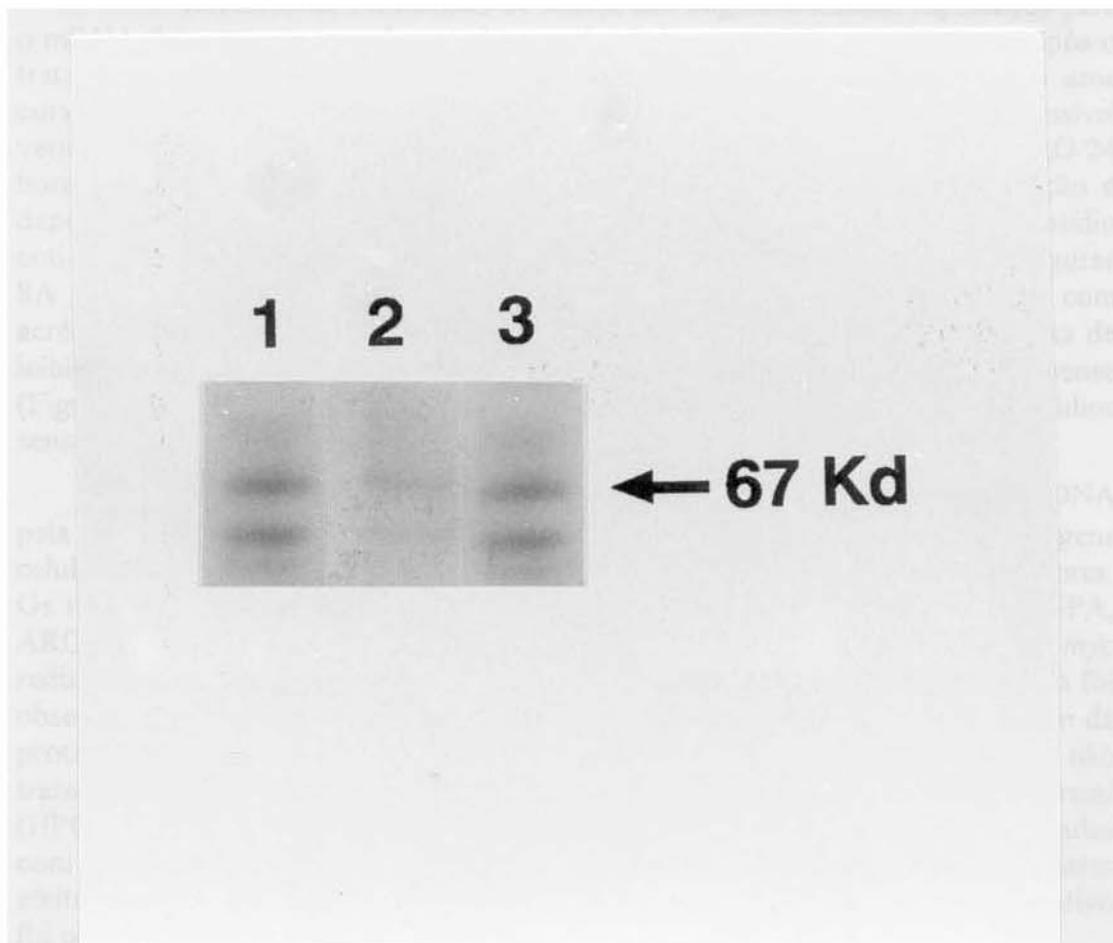


Figura 7. Autoradiografia demonstrando análise por Western *blot* de células ARO tratadas com 4 μ M de oligonucleotídeo específicos para o gene *c-myc*. O filtro contendo 80 μ g de extrato protéico obtido das células ARO não tratadas (1); tratadas com oligonucleotídeo anti-sense (2); tratadas com oligonucleotídeo sense (3) foi hibridizado com 10 μ g/ml de anticorpo monoclonal específico para a proteína Myc.

V.5. Análise das taxas de crescimento celular e síntese de DNA após o bloqueio da síntese da proteína c-Myc.

Inicialmente verificamos os efeitos dos oligonucleotídios específicos para o mRNA de *c-myc* na taxa de crescimento das linhagens ARO e FRO. Assim, após o tratamento das células com oligonucleotídios sense e anti-sense foi realizado uma curva de crescimento celular. Os resultados obtidos permitem concluir que é possível verificar uma pequena inibição do crescimento das linhagens celulares ARO e FRO 24 horas após o tratamento com os oligonucleotídios anti-sense e, que a inibição é dependente do tempo. De fato, 72 horas após o tratamento com oligonucleotídio anti-sense, observamos um aumento significativo na inibição do crescimento (Figuras 8A e 9). Além disso, quando foi realizada troca diária do meio de cultura, com acréscimo de oligonucleotídios frescos, verificamos um pequeno aumento na taxa de inibição do crescimento 72 horas após o tratamento com oligonucleotídio anti-sense (Figura 8B). Nenhum efeito foi verificado com o tratamento dos oligonucleotídios sense mesmo após 72 horas

A partir destes resultados foram verificadas as taxas de síntese de DNA pela incorporação de [³H]-timidina (4μCi [2μCi/μl]-Amersham) nas linhagens celulares expostas à oligonucleotídios sense, anti-sense e missense por 24 e 72 horas. Os resultados resumidos, na tabela 3, demonstram que as linhagens celulares NPA, ARO e FRO após o tratamento com oligonucleotídios antisense específico para *c-myc* reduzem significativamente a incorporação de timidina. Um forte efeito inibitório foi observado na linhagem celular FRO, que apresenta o mais alto nível de expressão de proteína Myc, de aproximadamente 65% quando comparada com as células não tratadas. Também foi realizada análise da cultura primária derivada de tireóide normal (HPC) e, nenhum efeito inibitório foi observado quando as células foram tratadas com oligonucleotídios sense, anti-sense e nas células não tratadas (Tabela 3). Estes efeitos podem ser considerados específicos, uma vez que, nenhum efeito significativo foi observado com o uso de oligonucleotídios sense e missense.

V.6. Bloqueio da síntese da proteína c-Myc e seus efeitos na capacidade de crescimento e formação de colônia em meio semi-sólido.

A capacidade de crescimento e de formação de colônia em meio semi-sólido é uma característica típica de células tumorigênicas. As linhagens ARO e FRO crescem eficientemente em meio semi-sólido e, apresentam altos níveis de expressão de mRNA de *c-myc*.

Desta forma, analisamos qual a eficiência de crescimento e formação de colônia, dessas linhagens, após o tratamento com oligonucleotídios sense e anti-sense específicos para o gene *c-myc* humano. Os resultados resumidos na figura 10 demonstram que a linhagem celular ARO apresenta uma redução de 40% na capacidade crescimento e formação de colônia em meio semi-sólido após tratamento com 4 μ M de oligonucleotídios anti-sense específicos para *c-myc*. Foi verificado que a exposição a uma concentração de 8 μ M do oligonucleotídio anti-sense resultava em um aumento de 10% na redução da capacidade de formação de colônia. Além da inibição, foi observado uma diminuição do número de células por colônia. Nenhum efeito significativo foi observado com o tratamento de oligonucleotídios sense e nas células não tratadas. Tal efeito foi ainda maior para a linhagem celular FRO que apresenta uma redução de 70% quando utilizada uma concentração de 4 μ M de oligonucleotídios anti-sense específicos para *c-myc* (Figura 11).

V.7. Análise da supressão das funções de c-Myc através da transfecção das linhagens celulares ARO e FRO com dominantes negativos de c-Myc.

Com o uso de oligonucleotídios anti-sense de *c-myc* observamos uma reversão do fenótipo neoplásico das linhagens celulares que exprimem altos níveis de *c-myc*, sugerindo a importância de c-Myc no desenvolvimento dos processos neoplásicos das células tireoideas. É importante salientar que essa reversão do fenótipo se refere somente aos efeitos observados quanto a taxa de crescimento celular e a capacidade de crescimento e formação de colônia em meio semi-sólido. Sendo assim, nós realizamos transfecção das linhagens celulares ARO e FRO com plasmídios dominantes negativos de Myc. Tais plasmídios apresentam mutações no cDNA de *c-myc* na região necessária para ativação transcricional bem como na região de associação ao DNA mas, com domínios de dimerização intactos. Assim, provavelmente, as formas mutadas competem com c-Myc endógeno e através da associação com Max formam heterodímeros não funcionais.

Os clones obtidos após transfecção das células FRO com plasmídios D106-143 ou In373 e seleção das células em 400 μ g/ml de G418 (figuras 12 e 13) apresentam uma evidente mudança na morfologia das células. Tendem a uma reorganização celular e apresentam uma morfologia que se assemelha as células foliculares de tireóide normal. Os clones obtidos foram expandidos, analisados e os resultados revelaram que o crescimento celular dos clones, quando em comparação com as células parentais, apresentam uma inibição do crescimento celular. O resultado observado com o clone 1, da linhagem celular FRO transfectada com o plasmídio In373, na figura 14 é representativo.

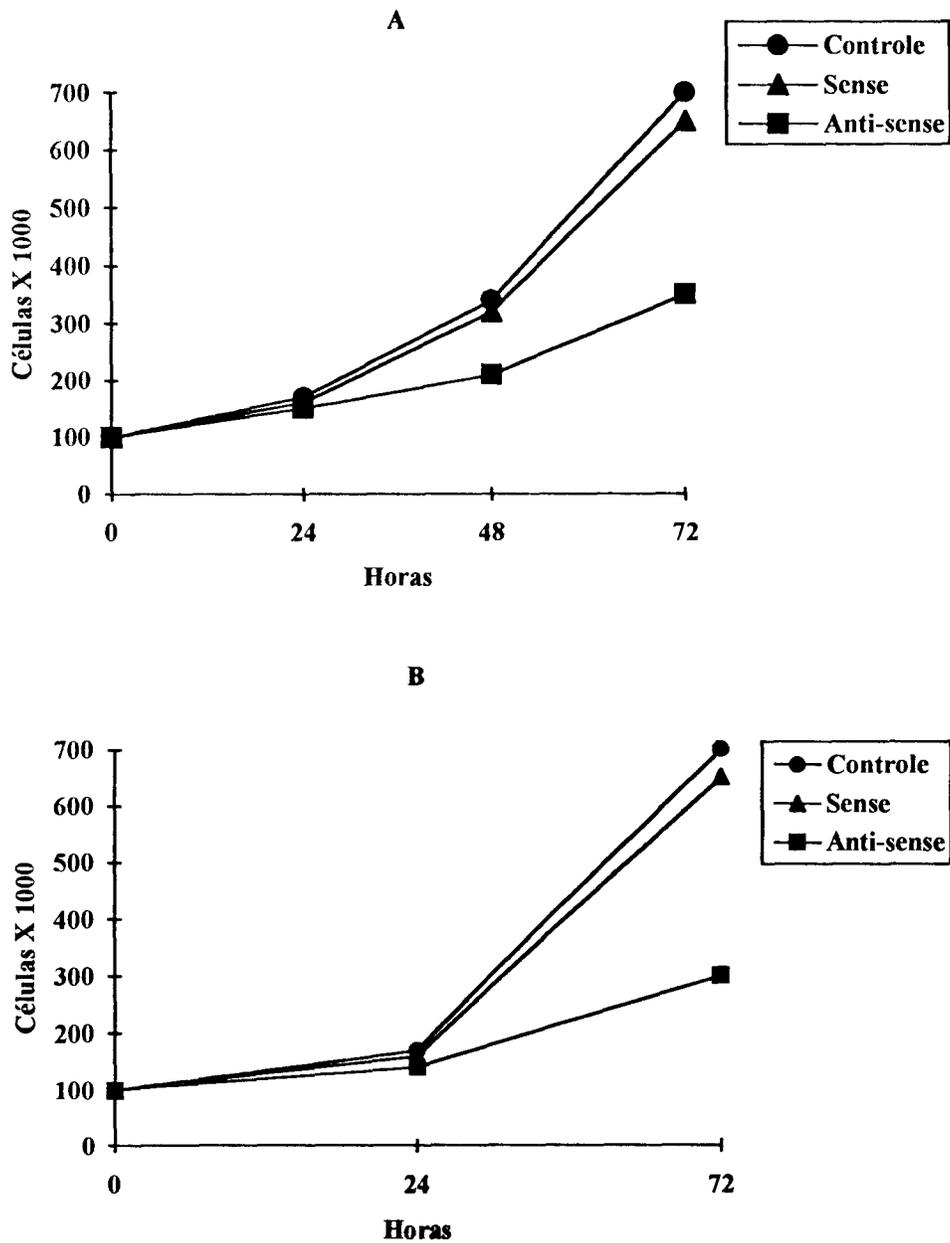


Figura 8. Curva de crescimento de células ARO após tratamento com 4 μ M de oligonucleotídios sense e anti-sense específicos para *myc*. Sem troca de meio de cultura (A) e com troca do meio de cultura no qual foi adicionado oligonucleotídios frescos (B). Os resultados representam uma média de pelo menos dois experimentos.

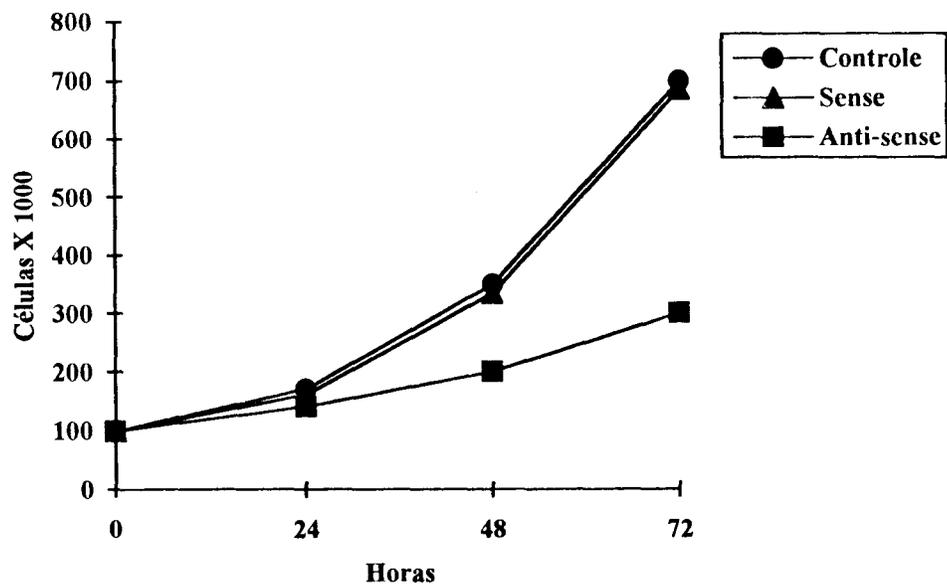


Figura 9. Curva de crescimento de células **FRO** mantidas em cultura por 24, 48 e 72 horas após tratamento com 4 μ M de oligonucleotídeos sense e anti-sense específicos para *c-myc* e de células não tratadas. Os resultados representam uma média de dois experimentos e as barras a média do erro padrão.

Tabela 3. Análise da inibição do crescimento celular após tratamento com 4 μ M de oligonucleotídeos específicos para *c-myc*. Os resultados são baseados nas taxas de incorporação de [³H]-timidina e representam uma média de pelo menos dois experimentos realizados em duplicata.

Tipo Celular	Oligonucleotídeos	% de inibição após	% de inibição após
	<i>c-myc</i> específico	24 horas	72 horas
HPC	Controle	9 \pm 2	10 \pm 2
	Sense	11 \pm 3	10 \pm 3
	Anti-sense	12 \pm 3	12 \pm 5
ARO	Controle	9 \pm 2	8 \pm 2
	Sense	8 \pm 2	7 \pm 2
	Missense	6 \pm 3	8 \pm 2
	Anti-sense	35 \pm 5	50 \pm 6
FRO	Controle	5 \pm 2	6 \pm 2
	Sense	6 \pm 2	9 \pm 2
	Missense	6 \pm 3	8 \pm 3
	Anti-sense	50 \pm 8	65 \pm 10
NPA	Controle	7 \pm 2	8 \pm 2
	Sense	9 \pm 2	10 \pm 3
	Missense	10 \pm 2	12 \pm 4
	Anti-sense	20 \pm 4	30 \pm 5

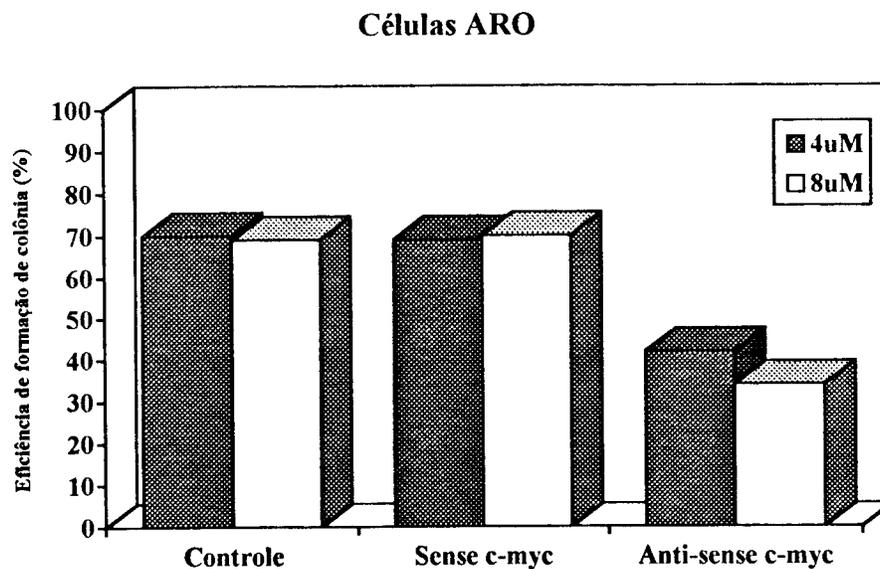


Figura 10. Capacidade de crescimento e formação de colônia em meio semi-sólido. 10^5 células da linhagem celular **ARO** foram tratadas com $4\mu\text{M}$ e $8\mu\text{M}$ de oligonucleotídios sense e anti-sense específicos para *c-myc* 24 horas antes do plaqueamento. Foram plaqueadas 10^4 e 2×10^4 células. Os resultados representam uma média da contagem no 15º dia após o plaqueamento. Pelo menos dois experimentos realizados.

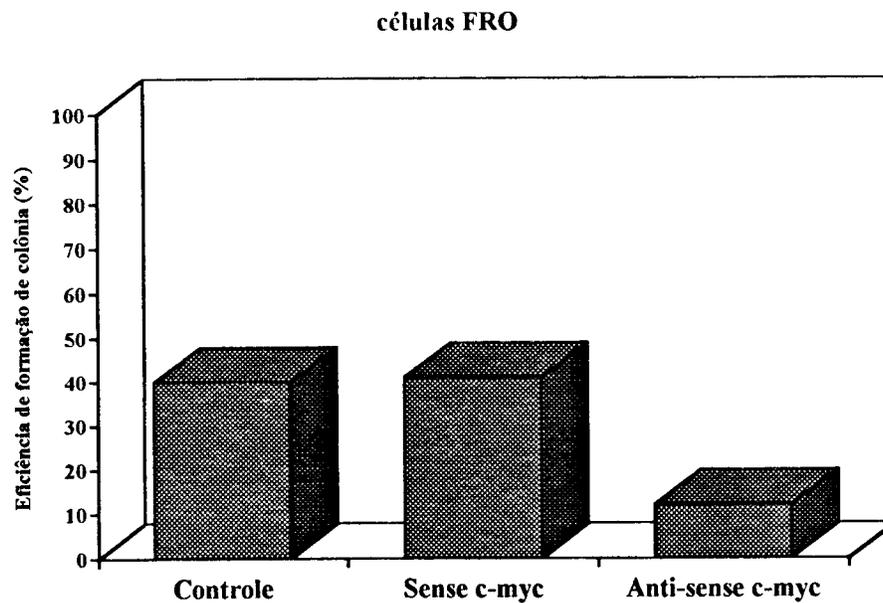


Figura 11. Capacidade de crescimento e formação de colônia em meio semi-sólido, 10^5 células **FRO** foram tratadas com $4\mu\text{M}$ de oligonucleotídios sense e anti-sense específicos para *c-myc* 24 horas antes do plaqueamento. Foram plaqueadas 10^4 e 2×10^4 células. Os resultados representam uma média de pelo menos dois experimentos realizados em duplicata e analisados entre os dias 5-15.

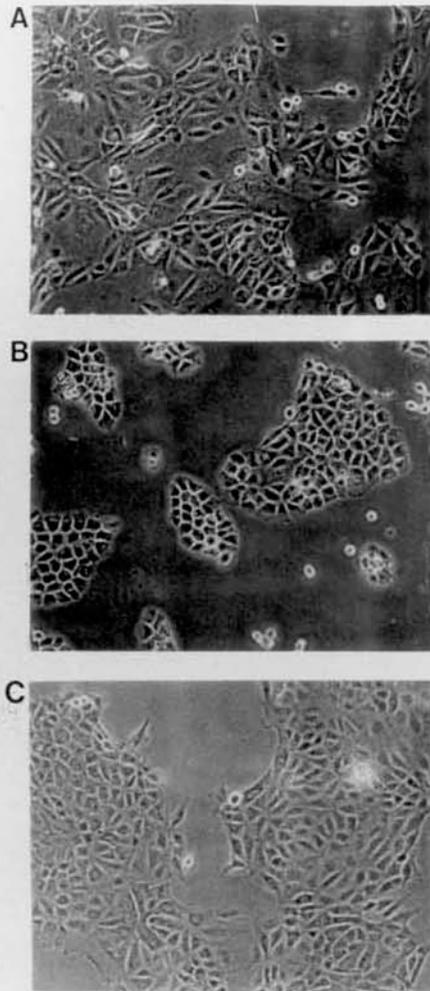


Figura 12. Representação fotográfica de células **FRO** mantidas em cultura após transfecção com vetor sem inserto que lhe confere resistência a gentamicina (A) e dos clones 1 (B) e 3 (C) obtidos após transfecção das células com o plasmídeo dominante negativo, pSRA1phaMSVTKNEO Myc IN 373, como descrito em metodologia. Os clones foram selecionados em 400 μ g/ml de G418 durante 15 dias.

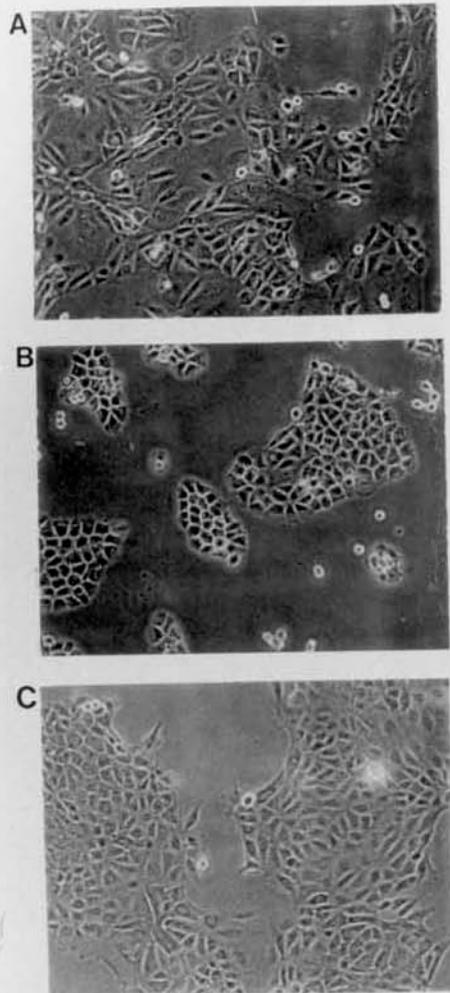


Figura 13. Representação fotográfica de células **FRO** mantidas em cultura após transfecção com vetor sem inserto que lhe confere resistência a gentamicina (A) e dos clones 1, (B) e 2 (C) obtidos após transfecção das células com o plasmídeo dominante negativo, pMV6tkNeo Myc D106-143 como descrito em metodologia. Os clones foram selecionados em 400 μ g/ml de G418 durante 15 dias.

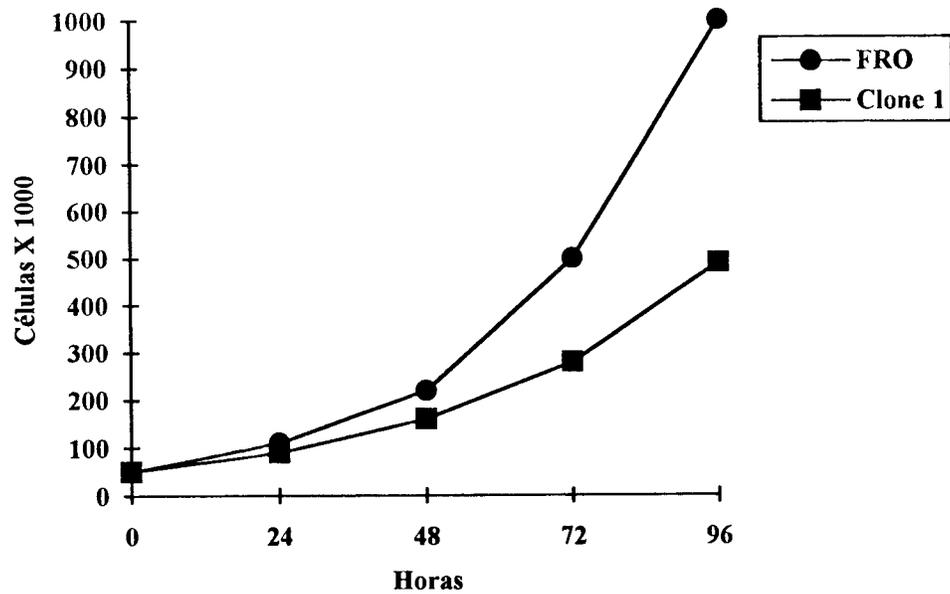


Figura 12. Curva de crescimento de células da linhagem FRO e do clone 1 obtido a partir da transfecção com o plasmídeo pSRA1phaMSVTKNeo Myc IN373 e selecionados em 400 μ g/ml de G418 durante 15 dias como descrito em material e métodos.

Quanto aos clones obtidos a partir da transfecção da linhagem celular ARO com o plasmídeo In373 não foi verificado nenhum efeito significativo tanto na curva de crescimento celular quanto na análise da capacidade de crescimento e formação de colônia em meio semi-sólido.

V.8. Efeito de inibição diferencial das subunidades p50 e p65 de NFκB na capacidade de crescimento e formação de colônia em meio semi-sólido.

Com o objetivo de verificar se o fator de transcrição NFκB está envolvido no controle do crescimento das linhagens celulares derivadas de carcinomas da tireóide e, a existência de uma função diferencial das subunidades p50 e p65, as linhagens celulares ARO e FRO foram tratada com oligonucleotídios complementares a seqüências da extremidade 5' dos respectivos mRNA além de dois ou três nucleotídeos presentes acima do códon de iniciação.

A exposição das células à 20μM de oligonucleotídios anti-sense específicos para a subunidade p50 não demonstrou nenhum efeito na capacidade de inibição de formação de colônia quando comparados com as células tratadas com oligonucleotídios sense e as células não tratadas (Figuras 15 e 16). Entretanto, após tratamento com 20μM de oligonucleotídios anti-sense específicos para a subunidade p65 foi observado uma redução de 50% na capacidade de formação de colônia em ambas as linhagens, além de uma diminuição do número de células por colônia. Nenhum resultado foi observado mediante tratamento com p65 sense e em células não tratadas (Figuras 15 e 16).

V.9. Bloqueio da síntese da proteína p65 do fator de transcrição NFκB e análise da taxa de síntese de DNA.

A linhagem celular ARO foi tratada por 24 e 72 horas com 20μM de oligonucleotídios anti-sense e sense correspondentes a subunidade p65 do fator de transcrição NFκB. Verificamos o efeito no bloqueio da síntese da proteína p65, na síntese de DNA, pela taxa de incorporação de [³H]-timidina (4μCi [2μCi/μl]-Amersham). Os resultados resumidos na figura 17 revelam uma redução de 50% na taxa de incorporação de timidina após 72 horas de tratamento com 20μM de

oligonucleotídios anti-sense para o fator de transcrição NFκB. Este efeito não foi observado após tratamento das células com oligonucleotídios sense específicos e de células não tratadas.

V.10. Análise da expressão de *c-myc* e p65 em células ARO tratadas com oligonucleotídios específicos para a subunidade p65 do fator de transcrição NFκB.

Uma vez que, a inibição da subunidade p65 do fator de transcrição NFκB afetou a capacidade de crescimento e formação de colônia em meio semi-sólido das linhagens celulares ARO e FRO e, esse efeito não foi observado com a subunidade p50, assumimos que p65 deva funcionar como ativador transcrricional de genes que controlam o crescimento celular nessas linhagens celulares.

Desta forma, procuramos determinar se o fator de transcrição NFκB apresentava algum papel na regulação da transcrição do gene *c-myc* humano. Analisamos, por Northern *blot*, a linhagem celular ARO tratada com oligonucleotídios específicos para a subunidade p65 do fator de transcrição NFκB. Os resultados obtidos a partir da hibridização com a sonda específica para o gene *c-myc* e para a subunidade p65 demonstram que as células tratadas com 20μM oligonucleotídios anti-sense apresentam uma diminuição de aproximadamente 5 vezes na expressão de *c-myc* (Figura 18).

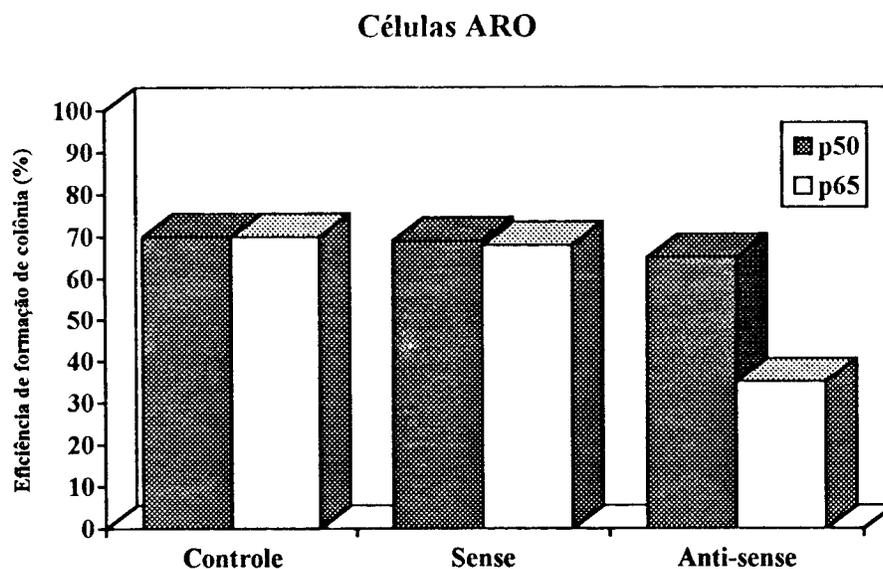


Figura 15. Inibição diferencial das subunidades p50 e p65 do fator de transcrição NFκB na capacidade de crescimento e formação de colônia em meio semi-sólido. 10^5 células ARO foram tratadas com $20\mu\text{M}$ dos respectivos oligonucleotídios 24 horas antes do plaqueamento. Os resultados representam a média de dois experimentos realizados em duplicata.

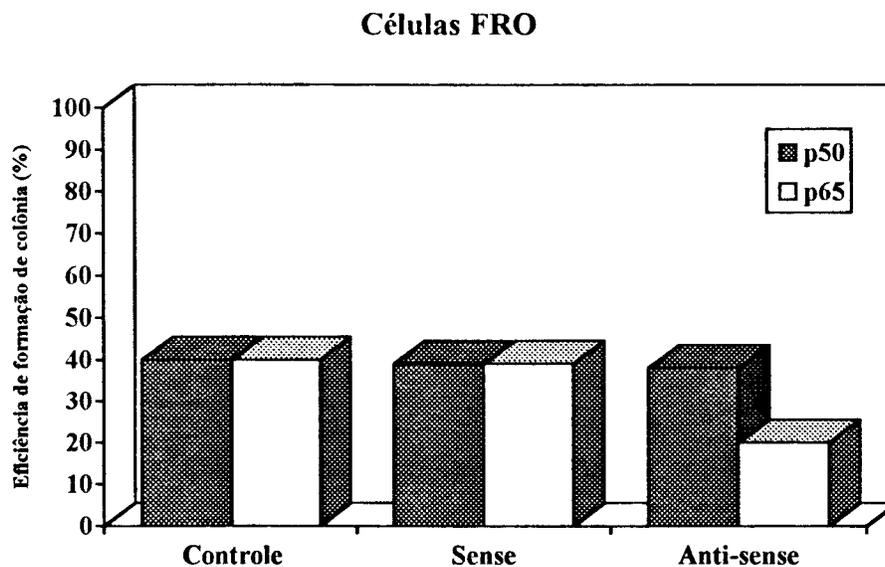


Figura 16. Inibição diferencial das subunidades p50 e p65 do fator de transcrição NFκB na capacidade de crescimento e formação de colônia em meio semi-sólido. 10^5 células FRO foram tratadas com $20\mu\text{M}$ dos respectivos oligonucleotídios 24 horas antes do plaqueamento. Os resultados representam uma média de dois experimentos realizados em duplicata.

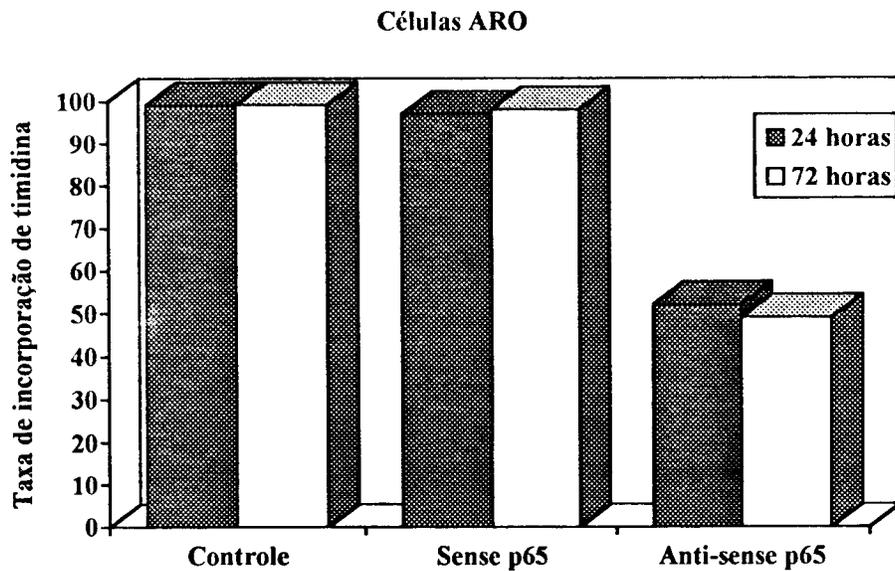


Figura 17. Análise da inibição do crescimento celular após tratamento por 24 e 72 horas com 20 μ M de oligonucleotídios específicos para a subunidade p65 do fator de transcrição NF κ B. 10⁵ células **ARO** foram plaqueadas. Os resultados são baseados na taxa de incorporação de [³H] timidina e representam uma média de dois experimentos.

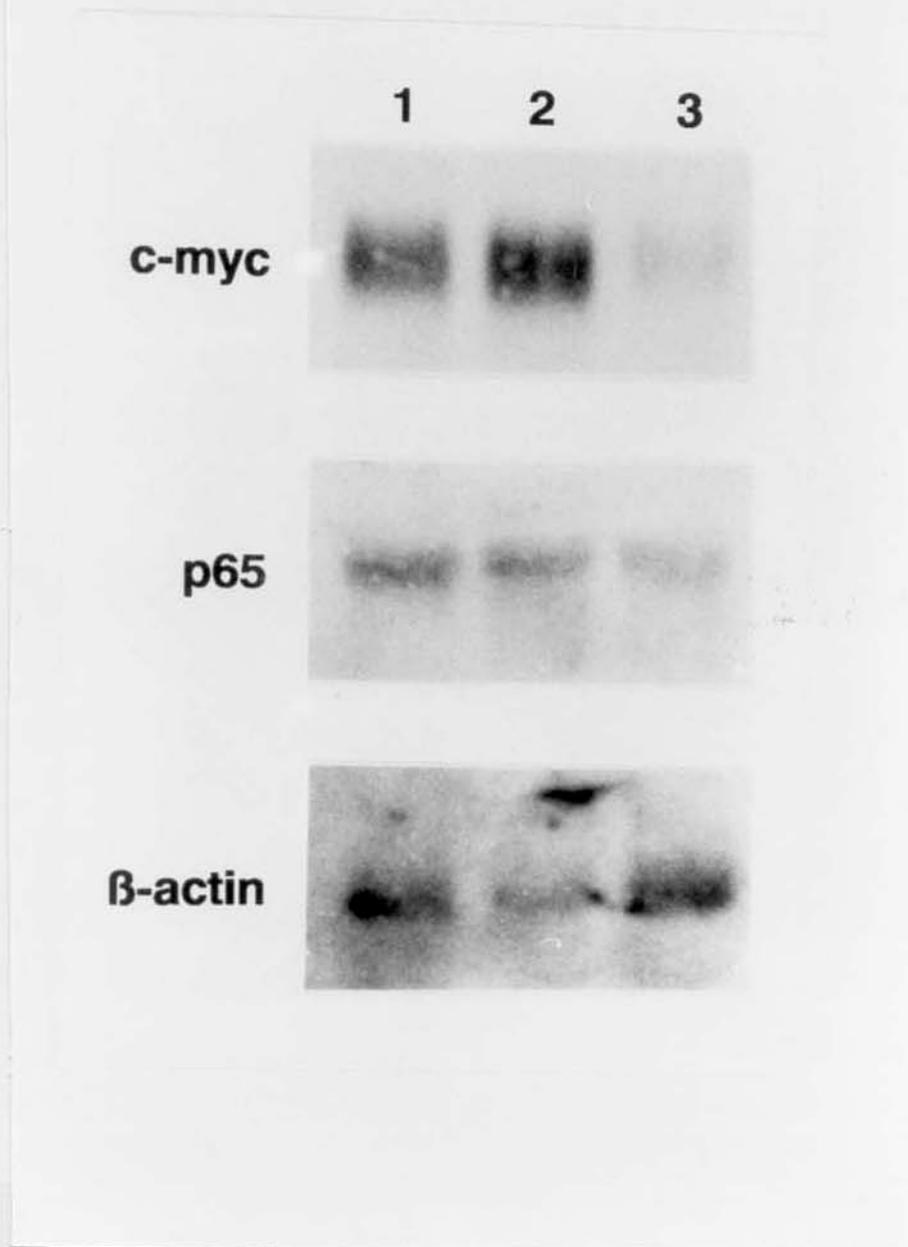


Figura 18. Análise de células da linhagem **ARO** não tratadas (1) e tratadas com 20 μ M de oligonucleotídios sense (2) e anti-sense (3) específicos para a subunidade p65 do fator de transcrição NF κ B. As amostras contendo 10 μ g de RNA total foram transferidas para uma membrana Hybond-N (Amersham) e hibridizadas com as sondas específicas para *c-myc* humano e para a subunidade p65 do fator de transcrição NF κ B. Como indicador de quantidade de RNA o filtro foi hibridizado com a sonda para β -actina.

Discussão

Em neoplasias da tireóide humana, existem algumas evidências de uma correlação entre a manifestação de um fenótipo maligno e a elevada expressão *c-myc*, no entanto, o verdadeiro papel desempenhado por *c-myc* nos processos de carcinogênese da tireóide ainda permanece desconhecido (TERRIER *et al.*, 1987; SHI *et al.*, 1993; ROMANO *et al.*, 1993).

De acordo com o objetivo proposto, verificamos a existência de tal correlação. Os resultados obtidos a partir da análise comparativa entre as sete linhagens celulares derivadas dos diferentes tipos histológicos de carcinomas da tireóide, com uma cultura primária de tireóide normal, revelaram um aumento significativo na expressão do proto-oncogene *c-myc* em todas as linhagens. Os níveis mais altos foram identificados nas duas linhagens celulares derivadas de carcinoma anaplásico e, portanto, com alto grau de malignidade.

Foi verificado também essa correlação para a análise realizada a partir dos 45 tumores derivados da tireóide, onde detectou-se altos níveis de expressão do proto-oncogene *c-myc* em carcinomas anaplásicos. Por outro lado, não foram detectados aumentos significativos da expressão de *c-myc* em carcinomas do subtipo folicular e papilífero. É importante salientar que a quantidade do RNA total aplicado no gel foi controlada pela hibridização dos filtros com uma sonda de β -actina, que é uma proteína presente no citoesqueleto de todas as células.

O fato da expressão de *c-myc* estar ligeiramente aumentada em tumores foliculares e papilíferos mantidos em cultura de células, mas não em tecidos, poderia sugerir uma discrepância nos nossos resultados. Entretanto, reflete uma possível contaminação dos tecidos derivados dos tumores com tecido normal.

Além disso, torna-se importante lembrar que, uma linhagem celular estabelecida em cultura apresenta a propriedade de crescer indefinidamente, sem que ocorra, necessariamente, mudança na morfologia das células. Diz-se que é uma linhagem imortalizada. O gene *c-myc* é um gene imortalizante e, em cooperação com o oncogene *ras* é capaz de transformar células em cultura (HUNTER, 1991).

Assim, uma outra possibilidade é que as linhagens celulares analisadas sejam derivadas de carcinomas da tireóide com um certo grau de malignidade pois, foram capazes de passar através da crise celular e, de se adaptar em cultura.

Nossos resultados permitem, portanto, inferir a existência de uma correlação direta entre a elevada expressão do proto-oncogene *c-myc* e a malignidade do tumor.

Uma possível explicação para a super-expressão do proto-oncogene é que, nas células foliculares da tireóide existem pelo menos três vias diferentes para a

transmissão do sinal de crescimento e diferenciação. O TSH é capaz de ativar duas das vias de sinalização, as quais são dependentes da sua concentração fisiológica. A terceira via, é ativada por fatores de crescimento que se associam a receptores de membrana com atividade tirosina-quinase. Embora a divergência desses sinais estende-se à síntese de proteínas, uma única proteína, a proteína nuclear c-Myc, é sintetizada em resposta as três vias de sinalização. Entretanto, a ativação da transcrição do proto-oncogene *c-myc* é precisamente regulada. A síntese da proteína c-Myc diminui a medida que a célula progride através do ciclo celular e é inibida nas células diferenciadas (FARID *et al.*, 1994).

Desta forma, os níveis de c-Myc poderiam ser indicativos do estado de proliferação celular e podem prever o curso clínico dos tumores da tireóide. Sendo a proteína c-Myc uma fosfoproteína nuclear, responsável pela ativação da transcrição de genes importantes para a manutenção da célula no ciclo celular, mutações nos genes que controlam a sua transcrição, ou ainda, no proto-oncogene *c-myc*, resultam em uma alteração na modulação da sua expressão e, conseqüentemente, em uma resposta de proliferação constitutiva.

De fato, alguns autores detectaram mutações nos genes que regulam a sua transcrição, ou ainda, dentro do exon 1 do proto-oncogene *c-myc*, na grande maioria dos tumores derivados de células da linhagem hematopoiética. Rearranjos cromossômicos, por exemplo, são responsáveis pela super-expressão do proto-oncogene *c-myc* no clássico linfoma de Burkitt. Tais rearranjos não afetam a região estrutural do gene (MARCUS *et al.*, 1992).

Dados da literatura mostram que existe uma relação entre a elevada expressão do proto-oncogene *c-myc* e a manifestação de um fenótipo indiferenciado (HOLT *et al.*, 1988; COLLINS *et al.*, 1992; NEGRONI *et al.*, 1992; ROMANO *et al.*, 1993). Embora a grande maioria das mutações sejam responsáveis por alterações quantitativas na função de c-Myc, também foram identificadas mutações no exon 2, do proto-oncogene *c-myc*. Tais mutações foram detectadas em 25 a 80% dos casos de pacientes com AIDS-NHL (linfoma não Hodgkin associado a AIDS). Entretanto, não foi detectado nenhuma mutação no exon 3 (CLARK *et al.*, 1994).

Foram também analisados os níveis de expressão da proteína Max e, não detectamos nenhuma alteração nos níveis do mRNA de *max*, tanto nas linhagens celulares como nos controles. Os aumentos mostraram-se específicos para *c-myc*. Realizamos essa análise baseados no fato que a atividade transcricional de c-Myc depende da sua dimerização com a proteína Max. A proteína Max heterodimeriza preferencialmente com Myc mas, em níveis elevados, também é capaz de formar homodímeros ativos. Existem fortes evidências de homodímero Max-Max interfere nas

funções do heterodímero Myc-Max, por se ligar a mesma seqüência de DNA e, bloquear a atividade transcricional.

Nossos resultados são semelhantes àqueles verificados em outros sistemas celulares, onde o mRNA de *max* revelou ser mais estável e menos abundante do que o mRNA de *c-myc*. Também foi verificado que os níveis da proteína Max não são alterados durante o processo de divisão celular e diferenciação (AMATI *et al.*, 1992; AMATI *et al.*, 1993).

No que refere-se aos níveis de proteína c-Myc, verificamos que em todas as linhagens celulares ocorreu um aumento nos níveis da proteína c-Myc, quando comparadas com os controles normais. Os níveis de proteína c-Myc encontram-se particularmente aumentados nas duas linhagens celulares derivadas de carcinomas anaplásicos. Estes resultados demonstram que a proteína c-Myc exerce um importante papel na transformação maligna das células foliculares da tireóide humana. É importante acrescentar que todos os extratos protéicos foram preparados a partir de células que encontravam-se em fase semi-confluyente. Uma cultura celular semi-confluyente apresenta células em estado proliferativo e, portanto, produzindo proteínas necessárias para a sua manutenção no ciclo celular.

Ainda quanto aos níveis de proteínas c-Myc, alguns autores sugerem que os altos níveis possam ser decorrentes, também, de alterações na estabilidade do mRNA. O mRNA de *c-myc* é muito instável e alterações no mecanismo que controla a sua estabilidade, aumentando o seu tempo de permanência no citoplasma, podem contribuir para que sejam sintetizadas maiores quantidades de proteína c-Myc.

Se as proteínas nucleares representam o final de uma via de regulação da proliferação e diferenciação das células normais, a inibição da expressão dos oncogenes que codificam tais proteínas deveria influenciar os processos de transformação neoplásica. Para a inibição da expressão do proto-oncogene *c-myc* utilizamos oligonucleotídeos específicos purificados e modificados para prevenir a degradação por nucleases endógenas. Os resultados obtidos a partir do bloqueio da síntese da proteína c-Myc na linhagem celular ARO e, hibridização com um anticorpo monoclonal específico para c-Myc, demonstraram que ocorreu uma inibição da síntese protéica em pelo menos cinco vezes. Uma vez que, o oligonucleotídeo anti-sense específico para o mRNA do proto-oncogene *c-myc* mostrou ser eficiente no bloqueio da síntese da proteína c-Myc, verificamos o efeito da inibição da síntese nas taxa de crescimento celular.

As linhagens celulares ARO e FRO foram utilizadas preferencialmente pois, foram capazes de induzir a formação de tumor em ratos atímicos e de crescerem e

formarem colônia em meio semi-sólido e, além disso, apresentaram os mais altos níveis de expressão do proto-oncogene *c-myc*.

A incubação das linhagens celulares ARO e FRO com oligonucleotídios anti-sense resultou em uma diminuição da expressão do mRNA de *c-myc*, inibição do crescimento e diferenciação celular, efeito verificado pelo crescimento em meio semi-sólido. Esses efeitos observados devem-se a entrada dos oligonucleotídios na célula, formação de um duplex e, conseqüentemente, a inibição da síntese da proteína c-Myc. Nenhum efeito foi observado nas células tratadas com oligonucleotídios sense, bem como, nas não tratadas. Portanto, o efeito é específico e não é decorrente de uma toxicidade não específica. Além disso, os oligonucleotídios demonstraram ser estáveis, uma vez que, observamos seus efeitos mesmo 72 horas após a sua adição ao meio de cultura.

Nossos resultados claramente indicam que a super-expressão de *c-myc* representa um evento importante na regulação do crescimento das linhagens celulares derivadas de carcinomas anaplásicos da tireóide humana, bem como, na manutenção da capacidade de crescimento e formação de colônia em meio semi-sólido. Por outro lado, a inibição da expressão do proto-oncogene *c-myc* é suficiente causar a perda de tais propriedades.

Desta forma, nossos resultados, são coerentes com os demonstrados pela análise da linhagem celular oriunda de carcinoma de cólon (CACO 320), onde observou-se que após o tratamento destas células com oligonucleotídios anti-sense específicos para *c-myc* ocorreu uma inibição na capacidade de crescimento e formação de colônia em meio semi-sólido e que, portanto, a expressão do gene *c-myc* era necessária para a manutenção do fenótipo indiferenciado nessas células (COLLINS *et al.*, 1992).

Vários trabalhos relatam a importância da proteína c-Myc para a manutenção do estado proliferativo. A regulação negativa de *c-myc* induziu a diferenciação de algumas linhagens celulares humanas como, pró-mielocítica-HL-60, monoblástica U-937 e proeritróide K-502 (HOLT *et al.*, 1988; MARCU *et al.*, 1992).

A inibição da síntese da proteína Myc, através da metodologia de oligos anti-sense, reverteu o fenótipo das células NIH 3T3 transformadas pelo oncogene *ras*, sugerindo que um nível mínimo de *c-myc* é necessário para a manutenção da transformação induzida por *ras* nessas células (SKALAR *et al.*, 1991).

Uma vez estabelecida a importância da proteína c-Myc e, verificado que o bloqueio da sua síntese induzia na célula uma reversão fenotípica, observada através da inibição do crescimento e capacidade de crescimento em meio semi-sólido, a supressão das suas funções, provavelmente, provocaria nas células efeito semelhante.

Os plasmídios utilizados para a supressão das funções de c-Myc, apresentavam o cDNA de *c-myc* mutado por deleção de seqüências correspondentes aos aminoácidos D106-143 ou por inserção de quatro resíduos de cisteínas entre as posições 373 e 374. O mecanismo através do qual esses dois mutantes exercem seus efeitos de dominantes negativos, baseia-se no fato de que c-Myc é funcionalmente ativa somente após sua associação com Max. A proteína c-Myc mutada, na região de transcrição ou de associação ao DNA mas com o domínio de oligomerização intacto, é capaz de se associar a Max, mas é funcionalmente inativa. Uma vez que, os plasmídios apresentavam um promotor forte a proteína c-Myc mutada é expressa em grande quantidade estabelecendo, assim, uma competição com a proteína c-Myc endógena pela associação a proteína Max. Desta forma, é capaz de suprimir a função da proteína c-Myc endógena (SAWYERS *et al.*, 1992).

Uma evidente mudança morfológica foi observada nas células da linhagem FRO transfectadas com os dominantes negativos de c-Myc, quando comparadas com as células transfectadas com o vetor vazio que lhes conferia resistência ao antibiótico. As células dos clones com dominantes negativos se assemelham as células foliculares da tireóide normal e, tendem a se reorganizar. Além disso, verificamos que os clones que expressavam a proteína c-Myc mutada, apresentavam uma inibição no crescimento celular, quando comparadas com o controle. Por outro lado, esse efeito morfológico não foi verificado na análise da linhagem celular ARO transfectada com os plasmídios dominantes negativos.

Vale destacar que, a linhagem celular FRO apresentou os mais altos níveis de expressão do mRNA do proto-oncogene *c-myc* e da síntese da proteína c-Myc. Em todos os experimentos realizados demonstrou ser mais suscetível aos efeitos no bloqueio da síntese da proteína c-Myc, o mesmo ocorreu quanto ao efeito na supressão das funções da proteína c-Myc. Baseados nos nossos resultados, além de alguns dados da bibliografia, podemos levantar algumas hipóteses.

É possível que diferentes vias de ativação estejam atuando para o desenvolvimento do fenótipo maligno nas linhagens celulares ARO e FRO.

Embora tenha sido verificado que a linhagem celular ARO, semelhante a NPA e WRO, apresentam mutações no gene da supressão tumoral p53 (FAGIN *et al.*, 1993), a interação entre o gene da supressão tumoral p53 e o proto-oncogene *c-myc* não foi completamente estabelecida. Assim, é possível que outros fatores de transcrição regulados pelo gene p53 estejam atuando para o desenvolvimento do fenótipo maligno.

Entretanto, na linhagem FRO não foi detectada nenhuma mutação dentro dos exons 5-8 do gene p53. Provavelmente nessa linhagem celular o fenótipo maligno estaria associado com a ativação de outros genes de supressão tumoral, como por exemplo o gene da susceptibilidade ao retinoblastoma (RB). Uma vez que, existem

evidências de uma ligação direta entre o pRB e o proto-oncogene *c-myc*, seria mais fácil explicar a reversão morfológica observada na linhagem celular FRO. Além disso, existem alguns autores que sugerem o envolvimento do gene de supressão tumoral pRB na transformação maligna das células foliculares da tireóide (FARID *et al.*, 1994).

Portanto, a partir dos resultados obtidos com dominantes negativos de *c-Myc* e dos obtidos com o uso de oligonucleotídeos anti-sense, podemos afirmar que o aumento nos níveis da proteína *c-Myc* é um evento importante nos processos de transformação das células tireóideas. Além disso, nossos resultados sugerem a existência de diferentes vias de ativação através das quais as proteínas atuam na transformação maligna das células foliculares da tireóide humana.

Após verificarmos que a super-expressão do proto-oncogene *c-myc* é um evento importante na transformação maligna das células da tireóide humana, buscamos identificar os mecanismos de ativação da sua transcrição. Com isso, poderíamos compreender o verdadeiro papel desempenhado por *c-myc* nesses processos de transformação das células foliculares da tireóide.

Alguns mecanismos de regulação da transcrição de *c-myc* foram identificados em diferentes sistemas celulares. Foi verificado que na linhagem celular de rato BALB/MK, TGF- β regula a expressão de *c-myc* e inibe a proliferação celular, provavelmente, via o produto do gene de susceptibilidade ao retinoblastoma (PIETENPOL *et al.*, 1990; DERYNCK, 1994). Também foi demonstrado que as proteínas *c-Myc* e *N-myc* associam-se a proteína RB *in vitro* (GOODRICH *et al.*, 1992). A regulação da transcrição do proto-oncogene *c-myc*, também pode ocorrer a partir de elementos de regulação interna, localizados no exon 1. Foi verificado que o gene *c-myc* murino apresenta um elemento de regulação interna pertencente a família dos fatores de transcrição NF κ B. A sua ativação pode ser mediada por diversos agentes mitogênicos, os quais, são capazes de induzir a expressão de *c-myc* nas diversas linhagens celulares estudadas (KESSLER *et al.*, 1992).

O fator de transcrição NF κ B é capaz de ativar uma grande variedade de genes e, o complexo ativo é formado, por duas subunidades protéicas p50 e p65. Embora, ambas subunidades sejam capazes de se associar ao DNA foi verificado um efeito diferencial nas linhagens celulares analisadas. Também foi observado em algumas células que não se encontram em estado proliferativo que a subunidade p65 encontra-se associada no citoplasma a uma proteína inibitória. A fosforilação dessa proteína inibitória, I κ , libera a subunidade p65 permitindo então a sua associação ao DNA e a ativação da transcrição gênica (NARAYANAN *et al.*, 1993; LA ROSA *et al.*, 1994).

A partir dessas informações nos investigamos a possibilidade de que nas células foliculares da tireóide humana haja um efeito diferencial das subunidades p50 e

p65 em ativar a transcrição gênica, além da, existência de um mecanismo de regulação direta do proto-oncogene *c-myc*.

A análise do crescimento das linhagens ARO e FRO tratadas com oligonucleotídios anti-sense específicos para as subunidades p50 e p65 do fator de transcrição NFκB revelou um efeito diferencial. O efeito foi específico para a subunidade p65, uma vez que, verificamos uma inibição de 50% do crescimento celular após tratamento com oligonucleotídios anti-sense específicos para a subunidade p65 e nenhum efeito após tratamento com oligonucleotídio anti-sense para a subunidade p50.

Os resultados obtidos a partir da taxa de incorporação de [³H]-timidina confirmaram uma inibição de 50%, uma vez que, a taxa de síntese de DNA após o tratamento das células com o oligonucleotídio anti-sense específico para a subunidade p65 diminuiu 50%. Não observamos esse efeito nas células tratadas com oligonucleotídio anti-sense específico para a subunidade p50, nas células tratadas com oligonucleotídios sense e nas não tratadas, indicando, mais uma vez, o efeito específico da subunidade p65.

A análise da expressão do proto-oncogene *c-myc* na linhagem celular ARO tratada com o oligonucleotídio anti-sense específico para a subunidade p65, revelou uma diminuição de 50% na quantidade de mRNA específico para o proto-oncogene *c-myc*. Indicando que o bloqueio da proteína p65 foi responsável pela inibição da transcrição do proto-oncogene *c-myc*. Esse efeito foi confirmado após hibridização do mesmo filtro com a sonda que detecta seqüências específicas para p65 pois, observamos uma evidente inibição no mRNA correspondente. Por outro lado, a hibridização do filtro com a sonda de β-actina demonstrou que a diminuição observada no mRNA de p65 e *c-myc* não eram decorrentes da quantidade do RNA total aplicado.

Outro fator que suporta a hipótese da regulação da transcrição de *c-myc* pelo fator de transcrição NFκB é, que, a atividade de NFκB depende da associação a outra proteína. Esta proteína, de baixo peso molecular, foi denominada HMG (THANOS & MANIATIS, 1992). A análise das linhagens celulares, utilizadas neste estudo, também revelaram tal correlação entre expressão de HMGI, proteína da família HMG, e a manifestação de um fenótipo altamente maligno. Também foi verificado, que altos níveis de expressão de HMGI encontram-se fortemente correlacionados com o desenvolvimento de um fenótipo altamente maligno nas células epiteliais derivadas de tireóide de rato. (CHIAPETTA *et al.*, submetido a publicação).

Assim, podemos sugerir que NFκB ao se associar a HMGI é capaz de ativar a transcrição do proto-oncogene *c-myc* e, desta forma contribuir para a transformação maligna das células foliculares da tireóide humana.

Conclusões

1. Observamos uma correlação entre a elevada expressão do proto-oncogene *c-myc* e a manifestação de um fenótipo maligno nos tecidos e nas linhagens celulares derivadas de carcinomas da tireóide humana.

2. Aumentos nos níveis de mRNA específico para *c-myc* correspondem a aumentos nos níveis da proteína c-Myc.

3. O oligonucleotídeo anti-sense específico para o mRNA do proto-oncogene *c-myc* bloqueou, eficientemente, a síntese da proteína c-Myc.

4. A inibição da síntese da proteína c-Myc provocou uma diminuição nas taxas de crescimento celular, além de, diferenciação nas linhagens celulares ARO e FRO.

5. A supressão das funções da proteína c-Myc resultou em uma inibição no crescimento celular e induziu a diferenciação da linhagem celular FRO.

6. As subunidades p65 e p50 do fator de transcrição NFκB apresentam um efeito diferencial nas células foliculares da tireóide humana, sendo que, a subunidade p65 mostrou ser específica na ativação da transcrição gênica.

7. A inibição da subunidade p65 do fator de transcrição NFκB provocou uma inibição da transcrição do proto-oncogene *c-myc*.

Resumo

Apesar da existência de uma correlação entre a elevada expressão de *c-myc* e a indicação de um prognóstico desfavorável para indivíduos que desenvolveram neoplasias da tireóide humana, o verdadeiro papel desempenhado por *c-myc*, nos processos carcinogênicos da tireóide humana, permanece ainda desconhecido. Analisamos a expressão de *c-myc* em sete linhagens de carcinomas da tireóide humana, oriundas de diferentes tipos histológicos, além de vários tumores frescos da tireóide. A análise comparativa, com uma linhagem celular de tireóide normal, revelou que o nível maior de expressão de *c-myc* foi detectado na linhagem celular com o maior grau de malignidade, bem como, em um dos carcinomas indiferenciados da tireóide humana. O bloqueio da síntese da proteína c-MYC, pelo uso de oligonucleotídeos anti-sense específicos, reduziu significativamente a taxa de crescimento das linhagens celulares estudadas. Também utilizamos plasmídeos construídos com formas mutadas de *c-myc*, denominados dominantes negativos, na transfecção de algumas das linhagens celulares, para confirmar os resultados obtidos com os oligonucleotídeos anti-sense.

Mutações em um elemento de regulação interna, localizado dentro do exon 1 de *c-myc* murino, impedem a indução da transcrição do gene *c-myc* mediada por NFκB. Para verificar a possibilidade de que as subunidades do fator de transcrição NFκB pudessem regular diferencialmente a expressão do gene *c-myc*, nós tratamos as linhagens celulares ARO e FRO com oligonucleotídeos modificados específicos para as subunidades p50 e p65. Verificamos uma inibição de 50% do crescimento celular após tratamento com oligonucleotídeo anti-sense específico para a subunidade p65, bem como, uma diminuição na expressão de *c-myc*.

Nossos resultados indicam que a super-expressão de *c-myc* têm um importante papel na transformação das células foliculares da tireóide humana, além de sugerir que o fator de transcrição NFκB encontra-se envolvido nos processos que controlam a transcrição do gene *c-myc*.

Abstract

In despite of the suggestion that there is a correlation between an elevated *c-myc* expression and an unfavourable prognosis of human thyroid neoplasias, the role of *c-myc* overexpression in the process of thyroid carcinogenesis is still unknown. We analysed *c-myc* expression in seven human thyroid carcinomas cell lines, originating from different histotypes and several fresh thyroid tumors. The comparative analysis with cell line of the normal thyroid showed that the highest increase was detected in the most malignant cell lines and in the undifferentiated human thyroid carcinomas. The block of c-MYC protein synthesis with *myc* antisense oligonucleotides significantly reduced the growth rate of the thyroid carcinoma cell lines. In addition, engineered dominant negative mutations of *myc* have been used to transfected some cell lines in order to confirm these results with antisense oligonucleotides.

Mutation of the internal regulatory element within the context of the *c-myc* exon 1 prevent NFκB to mediate the induction of the transcription in this gene. To explore this possibility, that individuals subunits of NFκB can selectively activate the gene expression of the *c-myc in vitro*, we treated the FRO and ARO cell lines with phosphorothio antisense oligonucleotides to either p50 or p65. We have foun a 50% inhibition growth after tretament with antisense oligonucleotide complementary to p65 subunit and moreover a decrease of the *c-myc* expression.

Our results indicate a crucial role for *c-myc* overexpression in the transformation of the thyroid follicular cells. In addition, the data presented here both confirm and extend the role of NFκB in *c-myc* gene transcription.

Referências Bibliográficas

- ABRAMS, H.D.; ROHRSCHEIDER, L.R. & EISENMAN, R.N. Nuclear location of the putative transforming protein of avian myelocytomatosis virus. *Cell* 29:427-439, 1982.
- ALITALO, K; RAMSAY, G; BISHOP, J.M.; PFEIFER, S.O.; COLBY, W. & LEVINSON, A.D. Identification of nuclear proteins encoded by viral and cellular *myc* oncogenes. *Nature* (London) 306:274-277, 1983
- AMATI, B.; DALTON, S.; BROOKS, M.W.; LITTLEWOOD, T.D.; EVAN, G.I. & LAND, H. Transcriptional activation by the human c-Myc oncoprotein in yeast requires interaction with Max. *Nature* 359:423-426, 1992.
- AMATI, B.; BROOKS, M.W.; LEVY, N.; TREVOR, D.L.; EVAN, G. & LAND, H. Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell* 72:233-245, 1993.
- AVANTAGIATO, V.; DATHAN, N.A.; GRIECO, M.; FABIEN, N.; LAZZARO, D.; FUSCO, A.; SIMEONE, A. & SANTORO, M. Developmental Expression of the RET Protooncogene. *Cell Growth Diff.* 5:1-7, 1994.
- AYER, D.E.; KRETZNER, L. & EISENMAN, R.N. Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 72:211-222, 1993.
- BARBACID, M.; LAMBALLE, F.; PULIDO, D. & KLEIN, R. The *trk* family of tyrosine protein kinase receptors. *Biochim. Biophys Acta.* 1072:115-127, 1991.
- BATTEY, J.; MOULDING, R.; TAUB, R.; MURPHY, W.; STEWART, H.; POTTER, G.; LENOIR, G. & LEDER, P. The human c-myc oncogene: Structural consequences of translocation into the IgH locus in burkitt lymphoma. *Cell* 34:779-787, 1983.
- BAUERLE, P.A. & BALTIMORE, D. I κ B: a specific-inhibitor of the NF κ B is transcription factor. *Science* 242:540-546, 1988.
- BAUERLE, P.A. & BALTIMORE, D. A 65 kd subunit of active NF κ B is required for inhibition of NF κ B. *Genes Dev.* 3:1689-1698, 1989.
- BECKMANN, H.; SU, L.K. & KADESCH, T. TFEB: a helix-loop-helix protein that activates transcription through the immunoglobulin enhancer μ E3 motif. *Genes Dev.* 4:167-179, 1990.

- BEG, A.A. & BALDWIN JR., A.S. Activation of multiple NF κ B/Rel DNA-binding complexes by tumor necrosis factor. *Oncogene* 9:1487-1492, 1994.
- BENDER, T.; THOMPSON, G.B. & KUEHL, W.M. Differential expression of c-myc mRNA in murine B lymphomas by a block to transcription elongation. *Science* 237:1473-1476, 1987.
- BENTLEY, D.L. & GROUDINE, M. A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells. *Nature* 321:702-704, 1986.
- BISHOP, J.M. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64:235-248, 1991.
- BLACKWELL, T.K.; KRETZNER, L.; BLACKWOOD, E.M.; EISENMAN, R.N. & WEINTRAUB, H. Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* 250:1149-1151, 1990.
- BLACKWOOD, E.M. & EISENMAN, R.N. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 215:1211-1213, 1991.
- BLANCHARD, J.M.; PIECHACZYK, M.; DANI, C.; CHAMBARD, J.C.; FRANCHI, A.; POUYSSEGUR, J. & JANTEUR, P. *c-myc* gene is transcribed at high rate in G0-arrested fibroblasts and is post-transcriptionally regulated in response to growth factors. *Nature* 317:443-45, 1985.
- BÖHNLEIN, E.; LOWENTHAL, J.W.; SIEKEVITZ, M.; BALLARD, D.W.; FRANZA, B.R. & GREENE, W.C. The same inducible nuclear proteins regulates mitogen activation of both the interleukin-2 receptor-alpha gene and type 1 HIV. *Cell* 53:827-836, 1988.
- BONGARZONE, I.; PIEROTTI, M.A.; MONZINIZI, N.; MODELLINI, P.; MANENTI, G.; DONGHI, R.; PILOTTI, S.; GRIECO, M.; SANTORO, M.; FUSCO, A.; VECCHIO, G. & DELLA PORTA, G. The oncogene associated with human papillary thyroid carcinoma (PTC) is assigned to chromosome 10q11-q12 in the same region as multiple endocrine neoplasia type 2A (MEN 2A). *Oncogene* 4:521-523, 1989.
- BONGARZONE, I.; MONZINI, N.; BORRELLO, M.G.; CARCANO, C.; FERRARESI, G.; ARIHI, E.; MONDELLINI, P.; DELLA PORTA, G. & PIEROTTI, M.A. Molecular characterization of a thyroid tumor-specific transforming sequence formed by the fusion of *ret* tyrosine kinase and the regulatory

- subunit RI α of cyclic AMP-dependent protein kinase A. *Mol. Cell. Biol.* 13:358-366, 1993.
- BONGARZONE, I.; BUTTI, M.G.; CORONELLI, S.; BORELLO, M.G.; SANTORO, M.; MONDELLINI, P.; PILOTTI, S.; FUSCO, A.; DELLA PORTA, C. & PIEROTTI, M.A. Frequent activation of *ret* protooncogene by fusion with a new activation gene in papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res.* 54:2979-2985, 1994.
- BORING, C.C.; SQUIRES, T.S. & TONG, T. Cancers statistics. *Cancer Jr. Clin.* 41:19-39, 1991
- BOVERI, T. The origin of malignant tumors (Baltimore:the williams and Wilkins Co.) pg:26-27, 1929.
- BRODEUR, G.M.; SEEGER, R.C.; SCHWAB, M.; VARMUS, H.E. & BISHOP, J.M. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* (Washington DC) 224:1121-1124, 1984.
- BUCKLER, A.L.; ROTHSTEIN, T.L. & SONENSHIN, G.E. Transcriptional control of c-myc gene expression during stimulation of murine B lymphocytes. *J. Immunol.* 145:732-736, 1990.
- CANTLEY, L.C.; AUGER, K.A.; CARPENTER, C.; DUCKWORTH, B.; GRAZIANE, A.; KAPPELLER, R. & SOLTOFF, S. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64:281-302, 1991.
- CARR, C.S. & SHARP, P.A. A Helix-loop-helix protein related to the immunoglobulin E box-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 10:4384-4388, 1990.
- CHUNG, J.; SINN, E.; REED, R.D & LEDER, P. Trans-acting elements modulate expression of the human c-myc gene Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7918-7922, 1986.
- CLARK, H.; YANO, T.; OTSUKI, T.; JAFEE, E.S.; SHIBATA, D. & RAFFELD, M. Mutations in the coding region of c-MYC in AIDS-associated and other aggressive lymphomas. *Cancer Res.* 54:3383-3386, 1994.
- CLEVELAND, J.L.; DEAN, M.; ROSENBERG, N.; WANG, J.Y.J. & RAPP, U.R. Tyrosine kinases oncogenes abrogate interleukin-3 dependence of murine myeloid cells through signaling pathways involving c-myc:conditional regulation of c-myc transcription by temperature-sensitive v-abl. *Mol. Cell. Biol.* 9:5685-5695, 1989.

- COLE, M.D. The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu. Rev. Genet.* 20:361-384, 1986.
- COLETA, G.; CIRAFICI, A.M. & VECCHIO, G. Induction of the c-fos oncogene by thyrotropic hormone in rat thyroid cells in culture. *Science* 233:458, 1986.
- COLLINS, S. & GROUDINE, M. Amplification of endogenous *myc*-related DNA sequences in a human myeloid leukemia cell line. *Nature (London)* 298:679-681, 1982.
- COLLINS, J.F.; HERMAN, P.; SCHUCH, C. & BEGHJ JR., B.C. c-myc antisense oligonucleotides inhibit the colony-forming capacity of *Colo 320* colonic carcinoma cells. *J. Clin. Invest.* 89:1523-1527, 1992.
- CONARD, R.A.; DOBYNS, B.M. & SUTOW, W.W. Thyroid neoplasia as late effect os exposure to radioactive iodine fallout. *J.A.M.A.* 214:316, 1970.
- COOPER, G.M. Cellular transforming genes. *Science* 217:801-806, 1982.
- CORY, S. Activation of cellular oncogenes in hemopoietic cells by chromosome translocation. *Adv. Cancer Res.* 47:189-334, 1986.
- COUGHLIN, S.R.; LEE, W.M.F.; WILLIAMS, P.W.; GIELS, G.M. & WILLIAMS, L.T. c-myc gene expression is stimulated by agents that activate protein kinase C and does not account for the mitogenic effect of PDGF. *cell* 43:243-251, 1985.
- CREWS, S.; BARTH, R.; HOOD, L.; PREHN, J. & CALAME, K. Mouse c-myc oncogenes is located on chromosome 15 and translocated to chromosome 12 in plasmacytomas. *Science* 218:1319-1321, 1982.
- DALLA-FAVERA, R.; BREGNI, M.; ERIKSON, J.; PATTERSON, D.; GALLO, R.C. & CROCE, M. Human *c-myc* is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7824-7827, 1982.
- DANG, C.V. & LEE, W.M.F. Identification of the human *c-myc* protein nuclear translocation signal. *Mol. Cell. Biol.* 8:4048-4054, 1988.
- DANG, C.V.; MCGUIRE, M.; BUCKMIRE, M. & LEE, W.M.F. Involvement of the "leucina zipper" region in the oligomerization and transforming activity of human c-Myc protein. *Nature (London)* 337:664-666, 1989.
- DANG, C.V. c-Myc oncoprotein function. *Bioch. Biophys. Acta* 1072:103-113, 1991.

- DANG, C.V.; BARRETT, J.; VILLA, G.M.; RESAR, L.M.; KATO, G.J. & FEARON, E.R. Intracellular leucina zipper interactions suggests c-Myc hetero-oligomerization. *Mol. Cell. Biol.* 11:954-9662, 1991.
- DANI, C.; BLANCHARD, J.M.; PIECHACZYK, M.; EL SABOUTY, S.; MARTY, L. & JEANTUR, P. Extreme instability of myc mRNA in normal and transformed human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7046, 1984.
- DEAN, M.; LEVINE, R.A.; RAN, W.; KINDY, M.S.; SONNENSCHNEIN, G.E. & CAMPISI, J. Regulation of c-myc transcription and mRNA abundance by serum growth factors and cell contact. *J. Biol. Chem.* 261:9161-9166, 1986.
- DERYNCK, R. TGF- β -receptor-mediated signaling. *TIBS* 19:548-553, 1994.
- DOBYNS, B.M. & HYMER, B.A. The surgical management of benign and malignant thyroid neoplasms in Marshall islanders Exposed to hydrogen bomb fallout. *World J. Surg.* 16:126-140, 1992.
- DONGHI, R.; LONGONI, A.; PILOTTI, S.; MICHELI, P.; DELLA PORTA, G. & PIEROTTI, M.A. Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *J. Clin. Invest.* 91:1753-1760, 1993.
- DONNER, P.; GREISER-WILKE, I. & MOELLING, K. Nuclear localization and DNA binding of the transforming gene product of avian myelocytomatosis virus. *Nature* 296:262-266, 1982.
- EILERS, M.; SCHIRM, S. & BISHOP, J.M. The Myc protein activates transcription of the α -prothymosin gene. *EMBO J.* 10:133-141, 1991.
- ELIYALU, D.; RAZ, A.; GRUSS, P. GIVOL, D. & OREN, M. Participation of p53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312:646-647, 1984.
- ESTOUR, B.; VAN HERLE, A.J.; JUILLARD, G.J.F.; TOTANES, T.L.; SPARKES, R.S.; JULIANO, A.E. & KLANDORF, H. Characterization of a human follicular thyroid carcinoma cell line (UCLA RO 82 W-1). *Virchows Archiv B Cell Pathol.* 57:167-174, 1989.
- EVAN, G.I. & HANCOCK, D.C. Studies on in the interaction of the human c-myc protein with cell nucleic: p62 c-myc as a member of a discret subset of nuclear proteins. *Cell* 43:253-261, 1985.

- EVAN, G.I.; WYLLIE, A.H.; GILBERT, C.S.; LITTLEWOOD, T.D.; LAND, H.; BROOKS, M.; WATERS, C.M.; PENN, L.Z. & HANCOCK, D.C. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69: 119-128, 1992.
- FABIEN, N.; PAULIN, C.; SANTORO, M.; BERGER, N.; GRIECO, M.; GALVAIN, D.; BARBIER, Y.; DUBOIS, P.M. & FUSCO, A. A detection of RET proto-oncogene expression in human thyroid carcinomas by *in situ* hybridization. *Br. J. Cancer* 66:1094-1098, 1992.
- FABIEN, N.; FUSCO, A.; SANTORO, M.; BARBIER, Y.; DUBOIS, P.M. & PAULIN, C. Description of a human papillary thyroid carcinoma cell line: morphologic study and expression of tumoral markers. *Cancer* 73:2206-2212, 1994.
- FAGIN, J.A.; MATSUO, K.; KARMAKAR, A.; CHEN, D.L.; TANG, S.H. & KOEFFLER, H.P. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J. Clin. Invest.* 91:179-184, 1993.
- FALETTO, D.L.; ARROW, A.S. & MACARA, I.G. An early decrease in phosphatidylinositol turnover occurs on induction of friend cell differentiation and precedes the decrease in c-myc expression. *Cell* 43:315-325, 1985.
- FARID, N.R.; YUFEI, S. & ZOU, M. Molecular basis of thyroid cancer. *Endoc. Reviews* 15(2):202-232, 1994.
- FRASSILA, K.; SAXEN, E.; TEPPU, L.; JARNASON, O.; TULINIUS, H.; NORMANN, T. & RINGERTZ, N. Incidence of different morphological types of thyroid cancer in the Nordic Countries. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand A* 89:49-55, 1981.
- FREITAG, S.O.; DANG, C.V. & LEE, W.M.F. Definition of the activities and properties of c-myc required to inhibit cell differentiation. *Cell growth Diff.* 1:339-343, 1990.
- FRICK, K.K. & SCHER, C.D. Platelet-derived growth factor-stimulated c-myc RNA accumulation in MG-63 human Osteosarcoma cells is independent of both protein kinase A and protein Kinase C. *Mol. Cell. Biol.* 10:184-192, 1990.
- FUSCO, A.; BERLINGIERI, M.T.; PORTELLA, G.; DI FIORE, P.P.; GRIECO, M. & VECCHIO, G. One and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* 7:3365-3370, 1987 (a).

- FUSCO, A.; GRIECO, M.; SANTORO, M.; BERLINGIERI, M.T.; PILOTTI, S.; PIEROTTI, M.A.; DELLA PORTA, G. & VECCHIO, G. A new oncogene in human papillary thyroid carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature*:328:170-172, 1987 (b)
- GARSON, J.A.; MCINTYRE, P.G. & KEMSHEAD, J.T. N-myc amplification in malignant astrocytoma. *Lancet* ii:718-719, 1985.
- GHOSH, S. & BALTIMORE, D. Activation in vitro of NF κ B by phosphorylation of its inhibitor I-kappa-B. *Nature* (London) 344:6789-6829, 1990
- GOODRICH, D.W. & LEE, W.H. Abrogation by c-myc of G1 phase arrest induced by RB protein but not by p53. *Nature* 360:177-179, 1992.
- GRECO, A.; PIEROTTI, M.A.; BONGARZONE, I.; PAGLIARDINI, S.; LANZI, C. & DELLA PORTA, G. TRK-T1 is a novel oncogene formed by fusion of TPR and TRK genes in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 7:237-242, 1992.
- GREGOR, P.D.; SAWADOGO, M. & ROEDER, R.G. The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer. *Genes Dev.* 4:1730-1740, 1990.
- GRIECO, M.; SANTORO, M.; BERLINGIERE, M.T.; MELILLO, R.M.; DONGHI, R.; BONGARZONE, I.; PIEROTTI, M.A.; DELLA PORTA, G.; FUSCO, A. & VECCHIO, G. PTC is a novel rearranged form of the *ret* proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 60:557-563, 1990.
- GRIGNANI, F.; LOMBARDI, L.; INGHIRAMI, G.; STERNAS, L.; CECHOVA, K. & DALLA-FAVERA, R. Negative autoregulation of c-myc gene expression is inactivated in trasformed cells. *EMBO J.* 9:3913-3922, 1990.
- HANN, S.R. & EISENMAN, R.N. Proteins encoded by the human c-myc oncogene:differential expression in neoplastic cells. *Mol. Cell. Biol.* 4:2486-2497, 1984.
- HANN, S.R.; KING, M.W.; BENTLEY, D.L.; ANDERSON, D.W. & EISENMAN, R.N. A non-AUG translational initiation in c-Myc exon 1 generates a N-terminally distinct whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell* 52:185-195, 1988.

- HARRIS, H. The analysis of malignancy by cell fusion: the position in 1988. *Cancer Res.* 48:3302-3306, 1988.
- HAYWARD, W.S.; NEEL, B.G. & ASTRIN, S.M. Activation of a cellular oncogene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. *Nature* (London) 290:475-480, 1981.
- HAUGEN, D.R.F.; AKSLEN, L.A.; VARHAUG, J.E. & LILLEHAUG, J.R. Demonstration of a TGF- α EGF receptor autocrine loop and c-myc protein over-expression in papillary carcinomas. *Int. J. Cancer* 55:37-43, 1993.
- HEANEY, M.L., PIERCE, J. & PARSON, J.P. Site-directed mutagenesis of *gag-myc* gene of avian myelocytomatosis virus 29: biological activity and intracellular localization of structurally altered proteins. *J. Virol.* 60:167-176, 1986.
- HEITZ, P; MOSER, H. & STAUB, J.J. Thyroid cancer. A study of 573 thyroid tumors and 161 autopsy cases observed over a thirty-year period. *Cancer* 37:2329-2337, 1976.
- HENDERSON, B.E.; ROSS, R.K. & PIKE, M.C. Toward the primary prevention of cancer. *Science* 254:1131-1138, 1991.
- HERMANN, M.A.; HAY, I.D.; BARTELT Jr., H. & RITLAND, S.R. Cytogenetic and molecular genetic studies of follicular and papillary thyroid cancers. *J. Clin. Invest* 88:1596-1604, 1991.
- HIGGINS, K.A.; PEREZ, J.R.; COLEMAN, T.A.; DORSHKIND, K.; McCOMAS, W.A.; SARMIENTO, U.M.; ROSEN, C.A. & NARAYANAN, R. Antisense inhibition of the p65 subunit of NF κ B blocks tumorigenicity and causes tumor regression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9901-9905, 1993.
- HOLT, J. T.; REDNER, R.L. & NIENHUIS, A.W. An oligomer complementary to c-myc mRNA inhibits proliferation of HL-60 promyelocytic cells and induces differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 8:963-973, 1988.
- HU, Y.F.; LÜSCHER, B.; ADMON, A.; MERMOD, N. & TJIAN, R. Transcription factor AP-4 contains multiple dimerization domains that regulate dimer specificity. *Genes Dev.* 4:1741-1752, 1990
- HUNTER, T. Cooperation between oncogenes. *Cell* 64:249-270, 1991.

- IKEDA, I.; ISHIZAKA, Y.; TAHIRA, T.; SUZUKI, T.; ONDA, M.; SUGIMURA, T. & NAGAO, M. Specific expression of the *ret* proto-oncogene in human neuroblastoma cell lines. *Oncogene* 5:1291-1296, 1990.
- ISRAEL, D.I. & KAUFMAN, R.J. Highly inducible expression from vectors containing multiple GRE's in CHO cells overexpressing the glucocorticoid receptor. *Nucleic Acids Res.* 17:4589-4604, 1989.
- ITO, T.; SEYAMA, T.; MIZUNO, T.; TSUYAMA, N.; HAYASHI, T.; HAYASHI, U.; DOHI, K.; NAKAMURA, N. & AKLYAMA, M. Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Cancer Res.* 52:1369-1371, 1992.
- JHANG, S.M. & MAZZAFERRI, E.L. The *ret*/PTC oncogene in papillary thyroid carcinoma. *J. Lab. Clin. Med.* 123(3):331-337, 1994.
- KATO, G.J.; BARRETT, J.; VILLA-GARCIA, M. & DANG, C.V. An amino-terminal c-Myc domain required for neoplastic transformation activates transcription. *Mol. Cell. Biol.* 10:5914-5920, 1990.
- KATO, G.J.; LEE, W.M.F.; CHEN, L. & DANG, C.V. Max: functional domains and interaction with c-Myc. *Genes Dev.* 6:81-92, 1992.
- KAZAKOV, V.S.; DEMIDCHIK, E.P. & ASTAKHOVA, L.N. Thyroid cancer after chernobyl. *Nature* 359:21-22, 1992.
- KELLY, K. COCHRAN, B.H.; STILES, C.D. & LEDER, P. Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 35:603-610, 1983.
- KESSLER, D.J.; SPICER, D.B.; LA ROSA, F.A. & SONENSHEIN, G.E. A novel NF κ B element exon 1 of the murine c-myc gene. *Oncogene* 7:2447-2453, 1992.
- KING, M.W.; ROBERTS, J.M. & EISENMAN, R.N. Expression of c-myc protooncogene during development of *xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.* 6:4499-4508, 1986.
- KOHL, N.E.; KANDA, N.; SCHRECK, R.R.; BRUNS, G.; LATT, S.A.; GILBERT, F. & ALT, F.W. Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastoma. *Cell* 35:359-367, 1983.

- KOZBOR, D. & CROCE, C.M. Duplication of the c-myc oncogene in one of five human breast carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 44:438-441, 1984.
- KRETZNER, L.; BLACKWOOD, E.M. & EISENMAN, R.N. Myc and Max proteins possess distinct transcriptional activities. *Nature* 359:426-429, 1992.
- LANDSCHULZ, W.H.; JOHNSON, P.F. & MCKNIGHT, S.L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240:1759-1764, 1988.
- LEDER, P.; BATTEY, J.; LENOIR, G.; MOULDING, C.; MURPHY, W.; POTTER, H.; STEWART, Y. & TAUB, R. Translocations among the antibody genes in human cancer. *Science* 222:765-771, 1983.
- LEMOINE, N.R.; MAYALL, E.S.; WYLLIE, F.S.; WILLIAMS, E.D.; GOYNS, M.; STRINGER, B. & WYNFORD-THOMAS, D. High frequency of *ras* oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene* 4:159-164, 1989.
- LEONARDO, M.J. & BALTIMORE, D. NF κ B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* 58:227-229, 1989.
- LEONARDO, M.J.; RUSTGI, A.K.; SCHIEVELLA, A.R. & BERNARDS, R. Suppression of MHC class I gene expression by N-myc through enhancer inactivation. *EMBO J.* 8:3351-3355, 1989.
- LITTLE, C.D.; NAU, M.M.; CARNEY, D.N.; GAZDAR, A.F. & MINNA, J.D. Amplification and expression of c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 306:194-196, 1983.
- LÜSCHER, B.; KUENZEL, E.A.; KREBS, E.G. & EISENMAN, R.N. Myc oncoproteins are phosphorylated by Casein Kinase II. *EMBO J.* 8:1111-1119, 1989.
- MACPHERSON, I. & MONTAGNIER, I. Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology* 23:291-294, 1964.
- MARCU, K.B.; BOSSONE, S. A. & PATEL, A. J. myc function and regulation. *Annu. Rev. Biochem* 61:809-860, 1992.
- MARTIN-ZANCA, D.; HUGHES, S.H. & BARBACID, M. A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 319:743-748, 1986

- MATSUO, K.; TANG, S.H. & FAGIN, J.A. Allelotype of human thyroid tumors: loss of chromosome 11q13 sequences in follicular neoplasma. *Mol. Endocrinol.* 5:1873-1879, 1991
- MIN, S & TAPAROWSKY, E.J. v-Myc, but not max proteins possesses domains that function in both transcription. *Oncogene* 7:1531-1530, 1992.
- MULLER, A.J.; YOUNG, J.C.; PENDERGAST, A.M; PONDEL, M.; LITTMAN, D.R. & WITTE, O.N. BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Mol. Cell. Biol.* 11:1785-1792, 1991.
- MULLIGAN, L.M.; KWOK, J.B.J.; HEALEY, C.S.; ELSDON, M.J.; ENG, C.; GARDNER, E.; LOVE, D.R.; MOLE, S.E.; MOORE, J.K.; PAPI, L.; PONDER, M.A.; TELENUS, H.; TUNNACLIFFE, A. & PONDER, B.A.J. Germ-line mutations of RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 363:458-460, 1993.
- MURRE, C.; SCHONLEBER McCRAW, P. & BALTIMORE, D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding daughterless myoD and myc proteins. *Cell* 56:777-783, 1989.
- MÜNGER, K.; PIETENPOL, J.A; PITTELKOW, M.R.; HOLT, J.T. & MOSES, H. Transforming growth factor β , regulation of c-myc expression, pRB phosphorylation, and cell cycle progression in Keratinocytes. *Cell Growth & Different.* 3:291-298, 1992.
- NAMBA, H.; GUTMAN, R.A.; MATSUO, K.; ALVAREZ, A. & FAGIN, J.A. H-ras proto-oncogene mutations in human thyroid neoplasm. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71:223-229, 1990.
- NARAYANAN, R.; HIGGINS, K.A.; PEREZ, J.R.; COLEMAN, T.A. & ROSEN, C.A. Evidence for differential functions of the p50 and p65 subunits of NF κ B with a cell adhesion Model. *Mol. Cell. Biol.* 13:3802-3810, 1993.
- NAU, M.M.; BROOKS Jr., B. J.; CARNEY, D.N.; GAZDAR, A.F.; BATTEY, J.F. SAUSVILLE, E.A. & MINNA, J.D. Human small-cell lung cancers show amplification and expression of the N-myc gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1092-1096, 1986.

- NEGRONI, A.; SCARPA, S.; ROMEO, A.; FERRARI, S.; MODESTI, A. & RASCHELLA G. Decrease of proliferation rate and induction of differentiation by a MYCN antisense DNA oligomer in a human neuroblastoma cell line. *Cell Growth and Differ.* 2:511-518, 1991.
- NISHIKURA, K.; RUSHDI Jr., A.A.; ERIKSON, J.; WATT, R.; ROVERA, G. & CROCE, C.M. Differential expression of the normal and of the translocated human c-myc oncogenes in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4822-4826, 1983.
- NISHIKURA, K. & MURRAY, J.M. Antisense RNA of proto-oncogene c-fos blocks renewed growth of quiescent 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 7:639-649, 1987.
- NISEN, P.D.; ZIMMERMANN, K.A.; COTTER, S.V.; GILBERT, F. & ALT, F.W. Enhanced expression of N-myc gene in wilm's tumors. *Cancer Res.* 46:6217-6222, 1986.
- OSBORN, L.; KUNKEL, S. & NABEL, G.J. Tumor necrosis factor α and interleukin-1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:2336-2340, 1989.
- PANG, X.; HERSHMAN, J.M.; CHUNG, M. & PEKARY, A.E. Characterization of tumor necrosis factor-alpha receptors in human and rat thyroid cells and regulation of the receptors by thyrotropin. *Endocrinology* 125, 4: 1783-1788, 1989.
- PARK, D.J.; NAKAMURA, H.; CHUMAKOV, A.M.; SAID, J.W.; MILLER, C.W.; CHEN, D.L. & KOEFFLER, H.P. Transactivation and DNA binding abilities of endogenous p53 in p53 mutant cell lines. *Oncogene* 9(7):1899-1906, 1994.
- PAYNE, G.S.; BISHOP, J.M. & VARMUS, H.E. Multiple arrangements of viral DNA and an active host oncogene (c-myc) in bursal lymphomas. *Nature* 295:209, 1982.
- PENN, L.J.Z.; BROOKS, M.W., LAUFER, E.M. & LAND, H. Negative autoregulation c-myc transcription. *EMBO J.* 9:1113-1121, 1990.
- PERSON, H. & LEDER, P. Nuclear localization and DNA binding properties of a protein expressed by human c-myc oncogene. *Science* 225:718-721, 1984.
- PFAIFER-OHLSSON, S.; RYDNERT, J.; COUSTIN, A.S.; LARSSON, E.; BETSHOLTZ, C. & OHLSSON, R. Cell-type specific pattern of myc protooncogene expression in developing human embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5050-5054, 1985.

- PIECHACZYK, M.; YANG, Y.Q.; BLANCHARD, J.M.; JEANTEUR, P. & MARCU, K.B. posttranscriptional mechanism are responsible for accumulation of truncated c-myc RNAs in murine plasma cell tumor. *Cell* 4:589-597, 1985.
- PIETENPOL, J.A.; HOLT, J.T.; STEIN, R.W. & MOSES, H.L. Transforming growth factor β 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3578-3762, 1990.
- PIEROTTI, M.A.; SANTORO, M.; JENKINS, R.B.; SOZZI, G. BONGARZONE, I. GRIECO, M.; MONZINI, N.; MIOZZO, N. HERRMANN, M.A.; FUSCO, A.; HAY I.D.; DELLA PORTA G. & VECCHIO, G. Characterization of an inversion on the long arm of chromosome 10 juxtaposing RET and D10S170 and creating the oncogenic sequence RET/PTC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1616-1620, 1992.
- POSTEL, E.H.; FLINT, S.J.; KESSLER, D.J. & HOGAN, M.E. Evidence that a triplex-forming oligodeoxyribonucleotide binds to the c-myc promoter in HeLa cells, thereby reducing c-myc mRNA levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8227-8231, 1991).
- PRENDERGAST, G.C.; LAWE, D. & ZIFF, E.B. Association of Myn, the murine homolog of Max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and Ras cotransformation. *Cell* 65:395-407, 1991.
- RABBITTS, P.H.; FORSTER, A.; STINSON, M.A. & RABBITTS, T.H. Truncation of exon 1 from the c-myc gene results in prolonged c-myc mRNA instability. *EMBO, J.* 4:3727, 1985.
- RAMSAY, G.L.; STANTON, M. ; SCHAWAB, M.; BISHOP, J.M. Human proto-oncogene N-myc encodes nuclear proteins that bind DNA. *Mol. cell. Biol.* 6:4450-4457, 1986.
- RAMSAY, G.; EVAN, G.I. & BISHOP, J.M. The protein encoded by human proto-oncogene c-myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7742-7746, 1984.
- RASSOULZADEGAN, M.; KAMEN, R. & CUZIN, F. The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. *Nature* 300:713-718, 1982.
- REDDY, C.D.; DASGPTA, P.; SAIKUMAR, H.; DUDEK, F.J.; RAUSCHER III & REDDY, E.P. Mutational analysis of Max:role of basic helix-loop-helix/leucina zipper domains in DNA binding, dimerization and regulation of Myc-mediated transcriptional activation. *Oncogene* 7:2085-2092, 1992.

- ROMEO, G.; RONCHETTO, P.; LUO, Y.; BARONE, V.; SERI, M.; CECCHERINI, I.; PASINI, B.; BOCCIARDI, R.; LERONE, M.; KÄÄRLÄINEN, H. & MERTUCCIELLO, G. Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367:377378, 1994.
- ROSEN, Y.; ROSENBLATT, P & SALTZMAN, E. Intraoperative pathologic diagnosis of thyroid neoplasias. *Cancer* 66:2001-2006, 1990.
- ROUS, P. The challenge to man of the neoplastic cell. *In Les Prix Nobel* pp.162-171, 1966.
- ROZENGURT, E.; STROBANT, P.; WATERFIELD, M.D.; DEUL, T.F. & KEEHAN, M. Platelet-derived growth factor elicits cyclic AMP accumulation in Swiss 3T3 cell: role of prostaglandin production. *Cell* 34:265-274, 1983.
- RULEY, H.E. Adenovirus early region 1A enables viral cellular transforming primary cells in culture. *Nature* 304:602-606, 1983.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory. *Cold Spring harbor, New York*, pp9.31-9.57, 1989.
- SANTORO, M.; ROSATI, R.; GRIECO, M.; BERLINGIERI, M.T.; COLUCCI-D'AMATO, G.L.; DE FRANCESIS, V. & FUSCO, A. The *ret* proto-oncogene is consistently expressed in human pheochromocytomas and thyroid medullary carcinomas. *Oncogene* 5:1595-1598, 1990.
- SANTORO, M.; CARLOMAGNO, F.; HAY, I.D.; HERRMANN, M.A.; MELLILLO, R.M.; BONGARZONE, I.; PIEROTTI, M.A.; DELLA PORTA, G.; BERGER, N.; PEIX, J.L.; PAULIN, C.; FABIEN, N.; GRIECO, M.; VECCHIO, G.; JENKINS, R.B. & FUSCO, A. RET oncogene activation in human thyroid neoplasms is restrict to the papillary carcinoma subtype. *J. Clin. Invest.* 89:1517-1522, 1992.
- SANTORO, M.; MELILLO, R.M.; GRIECO, M.; BERLINGIERE, M.T.; VECCHIO, G. & FUSCO, A. The TRK and RET tyrosine kinase oncogenes cooperate with ras in neoplastic transformation of a rat thyroid epithelial cell line. *Cell Growth & Differentiation* 4:77-84, 1993.
- SANTORO, M.; DATHAN, N.A.; BERLINGIRRE, M.T.; BONGARZONE, I.; PAULIN, C.; GRIECO, M.; PIEROTTI, M.A.; VECCHIO, G. & FUSCO, A. Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET

- proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene* 9:509-516, 1994.
- SAWYERS, C.L.; CALLAHAN, W. & WITTE, O.N. Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell* 70:901-910, 1992.
- SCHWAB, M.; VARMUS, H.E.; BISHOP, J.M.; GRZESCHIK, K.H.; NAYLOR, S.L.; SAKAGUCHI, A.Y.; BRODEUR, G. & TRENT, J. Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* (London)308:288-291, 1984.
- SHEN-ONG, G.L.C.; KEATH, E.J.; PICCOLI, S.P. & COLE, M.D. Novel myc oncogene RNA from abortive immunoglobulin-gene recombination in mouse plasmacytoma. *Cell* 32:443-452, 1982.
- SHI, Y.; ZOU, M. & FARID, N.R. Expression of thyrotrophin receptor gene in thyroid carcinoma is associated with a good prognosis. *Clin. Endocrinol-Oxf.* 39(3):269-274, 1993.
- SKLAR, M.D.; THOMPSON, E.; WELSH, M.; LIEBERT, M.; HARVEY, J.; GROSSMAN, H.B.; SMITH, M. & PROCHOWNIK, E.V. Depletion of c-myc with antisense sequences reverse the transforming phenotype in ras oncogene transformed NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 11:3699-3710, 1991.
- SOZZI, G.; BONGARZONE, I.; MIOZZO, M.; CARIANI, C.T.; MONDELLINI, P.; CALDERONE, C.; PILOTTI, S.; PIEROTTI, M.A. & DELLA-PORTA, G. Cytogenetic and molecular genetic characterization of papillary thyroid carcinomas. *Genes Chrom. Cancer* 5:1-7, 1992.
- SPENCER, C.A.; LESTRANGE, R.C.; NOVAK, U.; HAYWARD, W.S. & GROUDINE, M. The block to transcription elongation is promoter dependent in normal and Burkitt's lymphoma c-myc alleles. *Genes Dev.* 4:75-88, 1990.
- STEIN, C.A.; SUBASINGE, C.; SHINOZUKA, K. & COHEN, J.S. Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotide. *Nucleic Acids Res.* 16:3209-3221, 1988.
- STONE, J.; LANGE T. DE; RAMSAY, G.; JAKOBOVITS, E.; BISHOP, J.M.; VARMUS, H. & LEE, W. Definition of regions in human c-myc that are involved in transformation and nuclear localization. *Mol. Cell. Biol.* 7(5):1697-1709, 1987.

- SUAREZ, H.G.; DU VILLARD, J.A.; CAILLOU, B.; SCLUMBERGER, M.; TUBIANA, M.; PARMENTIER, C. & MONIER, R. Detection of activated *ras* oncogenes in human thyroid carcinomas. *Oncogene* 2:403-406, 1988.
- TAHIRA, T.; ISHIZAKA, Y.; ITOH, F.; NAKAYASU, M.; SUGIMURA, T. & NAGAO, M. Expression of the *ret* proto-oncogene in human neuroblastoma cell lines and its increase during neuronal differentiation induced by retinoic acid. *Oncogene* 6:2333-2338, 1991
- TAKAHASHI, M.; RITZ, J. & COOPER, G.M. Activation of a novel human transforming gene, *ret*, by DNA rearrangement. *Cell* 42:581-588, 1985.
- TAKAHASHI, I.; TANIGUCHI, M.; ASAI, N.; OHKUSU, K.; NAKASHIMA, I. & TAKAHASHI, M. cDNA cloning of mouse *ret* proto-oncogene and its sequences similarity to the cadherin superfamily. *Oncogene* 8:1087-1091, 1993.
- TANAKA, J.; OGURA, T.; SATO, H. & HATANO, M. Establishment and biological characterization of an in vivo human cytomegalovirus latency model. *Virology* 161:62-72, 1987.
- TAUB, R.; KIRSCH, I.; MORTON, C.; LENOIR, G.; SWAN, D.; TRONICK, S.; AARONSON, S. & LEDER, P. Translocation of *c-myc* gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* 79:7837-7841, 1982.
- TAYLOR, W.R.; EGAN, S.E.; MOWAT, M.; GREENBERG, A.H. & WRIGHT, J.A. Evidence for synergistic interactions between *ras*, *myc* and a mutant form of p53 in cellular transformation and tumor dissemination. *Oncogene* 7:1383-1390, 1992.
- THANOS, D. & MANIATIS, T. The High Mobility Group Protein HMG(Y) is required for NF κ B dependent virus induction of the human IFN- β gene. *Cell* 71:777-789, 1992.
- TERRIER, P.; SHENG, Z.M.; SCHLUMBERGER, M.; TUBIANA, M.; CAILLOU, B.; TRAVAGLI, J.P.; FRAGU, P.; PARMENTIER, C. & RIOU, G. Structure and expression of *c-myc* and *c-fos* proto-oncogenes in thyroid carcinomas. *Br. J. Cancer* 57:43-47, 1988.
- TOKUNAGA, K.; TANIGUCHI, H.; YODA, K.; SHIMIZU, M. & SAKYAMA, S. Nucleotide sequence of a full-length cDNA for mouse cytoskeletal B-actin mRNA. *Nucleic Acids Res.* 14:2829, 1986.

- VAN LOHUIZEN, M.; BREUER, M. & BERNS, A. N-myc is frequently activated by proviral insertion in MuL-V induced T cell lymphomas. *EMBO J.* 8:133-136, 1989.
- VAN HEYNINGEN, V. One gene-four syndromes. *Nature* 367:319-320, 1994.
- VARMUS, H.E. Form and function of retrovirus proviruses. *Science* 216:812, 1982.
- WATT, R.A.; SHATZMAN, A.R. & ROSENBERG, M. Expression and characterization of the human c-myc DNA-binding protein. *Mol. Cell. Biol* 5:448-56, 1985.
- WILLIAMS, E.D. The aetiology of thyroid tumors. *Clin. Endocrinol. metab.* 8:193-207, 1979.
- ZEKI, K.; NAKANO, Y.; INOKUCHI, N.; WATANABE, K.; MORIMOTO, I.; YAMASHITA, U. & ETO, S. Autocrine stimulation of interleukin-1 in the growth of human thyroid carcinoma cell line NIM1. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 76:122-133, 1991.
- ZERVOS, A.; GYURIS, J. & BRENT, R. Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* 72:223-232, 1993.
- ZIMMERMAN, K.; YANCOPOULOS, G.; COLLUM, R.; SMITH, R.; KOHL, N.; DENNIS, K.; NAU, M.; WITTE, O.; TORAN-ALLERAND, D.; GEE, C.; MINNA, C. & ALT, F. Differential expression of *myc* family genes during murine development. *Nature* 319:780-783, 1986.
- YAMASHITA, S; ONG, J.; FAGIN, J.A. & MELMED, S. Expression of the c-myc cellular proto-oncogene in human thyroid tissue. *J.Clin. Endocrinol.Metab.* 63:1170, 1986.