



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Faculdade de Ciências

***Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tiroide:
efeito dos polimorfismos do gene FOXE1***

Joana Filipa Rainho Raimundo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Manuel Carlos Loureiro de Lemos

Covilhã, junho de 2015

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais, irmã e namorado por terem sido os meus pilares nesta fase. Sem eles tudo teria sido muito mais difícil ou até mesmo impossível.

Agradecimentos

Com a conclusão desta tese muitos são os agradecimentos que tenho a fazer.

Ao meu orientador Professor Doutor Manuel Lemos por me ter dado a oportunidade de abraçar este projecto, com o qual aprendi e cresci, e por sempre me ter ajudado em tudo.

Às minhas colegas de laboratório, Eduarda, Catarina e Maria Inês por toda a ajuda e disponibilidade e por terem feito do laboratório um lugar, no mínimo, melhor. Em especial à Maria Inês, um bem-haja por tudo o que me ensinou, apoiou, motivou e sobretudo aturou.

A todos os elementos, incluindo as técnicas, do CICS que direta ou indiretamente me auxiliaram de qualquer forma ou se cruzaram comigo num ou outro corredor.

A todos os doentes que aceitaram participar neste estudo e a todos os dadores que gentilmente cederam mais um tubinho de sangue.

Ao Dr. Fernando Rodrigues, Diretor do Serviço de Endocrinologia do IPO de Coimbra e restante equipa médica, pela contribuição no recrutamento e caracterização clínica dos doentes.

A todos os meus amigos, em especial à Vanessa, à Tatiana, à Fabiana e à Susana por terem tornado tudo mais fácil e simplesmente por serem vocês, minhas malucas.

Ao André, o meu namorado, por ser o meu saco de boxe e por ter a capacidade de me por um sorriso na cara apenas com um olhar. Realidades que durante o período de conceção desta tese foram muito requisitadas.

À Inês, a minha mana, que sempre esteve ao meu lado e me disse as palavras certas no momento certo.

E finalmente aos restantes familiares, especialmente aos meus pais pelos valores que me transmitiram que me fazem lutar e acreditar que só não alcanço os sonhos que não desejo realmente.

Uma vez mais e sem ser em demasia, OBRIGADA A TODOS.

Resumo

O carcinoma da tireoide é o cancro endócrino mais frequente, que representa cerca de 1% de todas as neoplasias malignas e cuja incidência tem vindo a aumentar. Estes tumores têm uma etiologia multifatorial que envolve condicionantes ambientais e genéticas, bem como a interação entre elas. Os carcinomas bem diferenciados são responsáveis pela grande maioria das neoplasias malignas nesta glândula e a sua etiologia ainda não é bem conhecida. Vários genes de baixa penetrância, incluindo o *FOXE1*, foram relacionados com a suscetibilidade para o cancro da tireoide, mas os seus efeitos podem variar entre diferentes populações.

O objetivo deste estudo caso-controlo foi determinar o efeito da variabilidade da sequência de polialaninas do gene *FOXE1* sobre a suscetibilidade ao cancro da tireoide esporádico, na população portuguesa e a sua correlação com os parâmetros clínicos. A população estudada incluiu um grupo de 500 doentes caucasianos com carcinoma papilar e folicular da tireoide esporádicos (411 do sexo feminino e 89 do sexo masculino, média de idades \pm desvio padrão de 46.3 ± 14.0 anos) e um grupo de 502 controlos caucasianos (372 do sexo feminino e 130 do sexo masculino, média de idades \pm desvio padrão de 38.3 ± 13.4 anos) que foram genotipados por PCR e análise de fragmentos por electroforese capilar.

Os resultados demonstraram que os alelos com 14 repetições de alaninas (66.3% em controlos e 57.2% em doentes) e com 16 (30.0% em controlos e 36.3% em doentes) são os mais frequentemente encontrados na população portuguesa, tal como os genótipos 14Ala/14Ala (43.2% em controlos e 33.4% em doentes) e 14Ala/16Ala (41.2% em controlos e 40.2% em doentes). Detetamos diferenças significativas nas prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes com carcinomas da tireoide ($p=0.0012$ e $p=0.0001$, respetivamente). Estas diferenças foram mais notórias na população masculina estudada ($p=0.0086$ e $p=0.0017$, respetivamente), nos doentes com carcinoma papilar ($p=0.0001$ e $p=0.0001$, respetivamente), em função do tamanho do carcinoma papilar ($p=0.0296$ e $p=0.0218$, respetivamente), e em função da idade dos indivíduos ($p=0.0024$ e $p=0.0004$, respetivamente). Podemos concluir que a variabilidade da sequência repetitiva do *FOXE1*, sobretudo polyA com 16 ou mais resíduos, está associada ao carcinoma papilar na população portuguesa, em particular em indivíduos do sexo masculino e em indivíduos com idade maior ou igual a 45 anos, potenciando o seu papel como biomarcador. Os resultados podem ser explicados pelo efeito da sequência repetitiva do *FOXE1* com 16 ou mais resíduos de alaninas na sua função como fator de transcrição, propiciando a tumorigénese na tireoide.

Palavras-chave

Tiroide, cancro, carcinoma papilar, carcinoma folicular, *FOXE1*, polimorfismo, genética, endocrinologia.

Abstract

Thyroid carcinoma is the most common endocrine cancer, which accounts for approximately 1% of all malignant tumors and its incidence is increasing. These tumors have a multifactorial etiology that involves environmental and genetic factors, as well as the interaction between them. Well-differentiated carcinomas account for the great majority of cancers in this gland and their etiology is not well known. Several low penetrance genes, including *FOXE1*, have been related to susceptibility to thyroid cancer but their effects may vary between different populations.

The aim of this case-control study was to determine the effect of the variability of the polyalanine sequence of *FOXE1* gene on susceptibility to sporadic thyroid cancer in the Portuguese population and their correlation with clinical parameters. The study population included a group of 500 Caucasian patients with sporadic papillary and follicular carcinoma (411 females and 89 males, mean age \pm standard deviation 46.3 ± 14.0 years) and a group of 502 Caucasian controls (372 female and 130 males, mean age \pm standard deviation 38.3 ± 13.4 years) were genotyped by PCR and analysis of fragments by capillary electrophoresis.

The results demonstrated that alleles with 14 alanine repeats (66.3% in controls and 57.2% of patients) and 16 (30.0% in controls and 36.3% for patients) are frequently found in the Portuguese population, as well as 14Ala/14Ala genotypes (43.2% in controls and 33.4% of patients) and 14Ala/16Ala (41.2% in controls and 40.2% of patients). We detected significant differences in the prevalence of genotypes and alleles between controls and patients with thyroid carcinoma ($p=0.0012$ and $p=0.0001$, respectively). These differences were more notorious in the studied male population ($p=0.0086$ and $p=0.0017$, respectively); in patients with papillary carcinoma ($p=0.0001$ and $p=0.0001$, respectively); and correlated with carcinoma size ($p=0.0296$ and $p=0.0218$, respectively); and depending on the age of the subjects ($p=0.0024$ and $p=0.0004$, respectively). We conclude that the variability of the *FOXE1* repetitive sequence, especially polyA with 16 or more residues, is associated with papillary carcinoma in the Portuguese population and in particular in male patients in these older than 45 years, enhancing its role as a biomarker. The results may be explained by the effect of the repetitive sequence of *FOXE1* with 16 or more alanine residues on its function as a transcription factor, promoting tumorigenesis in the thyroid.

Keywords

Thyroid, cancer, papillary carcinoma, follicular carcinoma, *FOXE1*, polymorphism, genetics, endocrinology.

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Tumorigénese.....	1
1.2	Glândula tiroideia.....	2
1.2.1	Anatomia e histologia.....	2
1.2.2	Hormonas da tiroide.....	2
1.3	Neoplasias da tiroide.....	4
1.3.1	Hiperplasias da tiroide.....	5
1.3.2	Adenoma Folicular.....	6
1.3.3	Carcinomas derivados das células foliculares da tiroide.....	6
1.3.3.1	Carcinoma Papilar da tiroide.....	6
1.3.3.2	Carcinoma Folicular da tiroide.....	7
1.3.3.3	Carcinoma Pouco Diferenciado da tiroide.....	7
1.3.3.4	Carcinoma Anaplásico da tiroide.....	7
1.3.4	Carcinoma Medular da tiroide.....	8
1.4	Etiologia.....	9
1.5	Genética molecular do carcinoma da tiroide.....	10
1.6	Fator de transcrição FOXE1.....	10
1.6.1	Sequência de polialaninas do FOXE1.....	11
1.6.2	FOXE1 e patologias tiroideias.....	13
1.7	Objetivos de estudo.....	16
2	Materiais e Métodos.....	17
2.1	População em estudo.....	17
2.2	Genotipagem.....	17
2.2.1	Extração de DNA a partir de sangue fresco.....	17
2.2.2	Quantificação do DNA.....	18
2.2.3	Reação de polimerização em cadeia (PCR).....	18
2.2.4	Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose.....	20
2.2.5	Análise de fragmentos.....	20
2.2.6	Análise <i>heteroduplex</i>	21
2.2.7	Sequenciação de DNA.....	21
2.3	Análise estatística.....	22
3	Resultados.....	23
3.1	Genotipagem.....	23
3.2	Análise estatística.....	27
4	Discussão e Conclusão.....	37
5	Bibliografia.....	40
6	Anexos (autorizações de utilização de figuras e tabelas).....	45

Lista de Figuras

Figura 1 - Características indutoras da progressão tumoral.....	1
Figura 2 - Regulação hormonal: eixo hipotálamo-hipófise-tireoide.....	3
Figura 3 - Sequência de passos envolvidos na ativação da expressão de TPO.....	4
Figura 4 - Modelo de progressão dos carcinomas derivados das células foliculares.....	8
Figura 5 - Sequência parcial de cDNA do <i>FOXE1</i>	12
Figura 6 - Gene <i>FOXE1</i> , no cromossoma 9, incluindo nove variantes já estudadas.....	13
Figura 7 - Resultados da amplificação por PCR com diferentes combinações de primers.....	23
Figura 8 - Resultados da análise de fragmentos por electroforese capilar.....	24
Figura 9 - Resultados da análise <i>heteroduplex</i>	25
Figura 10 - Resultados da sequenciação de DNA.....	26

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Diferenças entre os diversos subtipos de carcinomas da tireoide.....	5
Tabela 2 - Lista das combinações dos <i>primers forward</i> marcados com diferentes fluorocromos e dos <i>primers reverse</i> com diferentes tamanhos e respetivas condições de PCR.....	19
Tabela 3 - Comparação das prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes.....	28
Tabela 4 - Comparação das prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes do sexo feminino.....	29
Tabela 5 - Comparação das prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes do sexo masculino.....	30
Tabela 6 - Comparação das prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes com carcinoma papilar da tireoide.....	31
Tabela 7 - Comparação das prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes com carcinoma folicular da tireoide.....	32
Tabela 8 - Comparação das prevalências dos genótipos e alelos entre microcarcinomas papilares e carcinomas papilares maiores que um centímetro.....	33
Tabela 9 - Comparação das prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes com carcinoma da tireoide com idade inferior a 45 anos.....	34
Tabela 10 - Comparação das prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes com carcinoma da tireoide com idade igual ou superior a 45 anos.....	35
Tabela 11 - Comparação das prevalências dos genótipos e alelos entre doentes com metástases ganglionares ou à distância e doentes sem metástases.....	36

Lista de Abreviaturas

A	Adenina
Ala	Alanina
APS	Ammonium persulfate (persulfato de amónio)
ATM	Serine/threonine kinase
<i>BRAF</i>	Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1
C	Citosina
CT	Carcinoma da tiroide
<i>CTNNB1</i>	Catenina (cadherin-associated protein beta 1)
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxirribonucleotidos fosfatados
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
<i>DUOX2</i>	Dual oxidase 2
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Exo I	Exonuclease I
FastAP	Thermosensitive alkaline phosphatase
<i>FOXE1</i>	Forkhead box E1
FTC	Carcinoma folicular da tiroide
G	Guanina
GWA	Genome wide association
HCl	Ácido clorídrico
HHEX	Hematopoietically expressed homeobox
KHCO ₃	Bicarbonato de potássio
M	Molar
MEN	Multiple endocrine neoplasia (neoplásia endócrina múltipla)
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minutos
mM	Milimolar
Na ₂ EDTA	Sal dissódico do EDTA
NaCl	Cloreto de sódio
NF-1	Nuclear factor 1

Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tireoide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1

ng	Nanograma
NH ₄ Cl	Cloreto de amónio
NIS	Solute carrier family 5 (sodium/iodide cotransporter member 5)
NKX2-1	NK2 homeobox 1
nm	Nanómetros
PAX8	Paired box gene 8
pb	Par de bases
PCR	Polimerase chain reaction (reação de polimerização em cadeia)
PDS	Solute carrier family 26, member 4
PI3KCA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
polyA	Sequência de polialaninas
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PTC	Carcinoma papilar da tireoide
RAS	Rat sarcoma virus homolog
RBC	Red blood cells (tampão de lise de glóbulos vermelhos)
RET	Ret proto-oncogene
RNA	Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)
rpm	Rotações por minuto
SE	Secondary extraction (tampão de extração secundária)
seg	Segundos
SNP	Single nucleotide polymorphism (polimorfismo de nucleótido simples)
T	Timina
T1560	Long intergenic non-protein coding RNA 1602
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TERT	Telomerase reverse transcriptase
Tg	Tiroglobulina
TP53	Tumor protein 53
TPO	Tiroperoxidase
TRH	Thyrotropin releasing hormone (hormona libertadora da tirotropina)
TSH	Thyroid stimulating hormone (hormona estimuladora da tireoide)
TSHR	Thyroid stimulating hormone receptor (receptor da hormona estimuladora da tireoide)
TTF1	Transcription termination factor, RNA polymerase I
TTF2	Transcription termination factor, RNA polymerase II
U	Unidades

Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tiroide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1

USF1	Upstream stimulatory factor 1
USF2	Upstream stimulatory factor 2
UTR	Untranslated region (região não traduzida)
UV	Ultravioleta
V	Volt
WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A
μ-	Micro
°C	Grau celsius

1.Introdução

1.1.Tumorigénese

A tumorigénese resulta da desregulação da homeostasia celular, influenciando funções importantes como a proliferação, diferenciação e a morte celular, culminando na transformação de células normais em tumorais com capacidade de proliferar, invadir e metastizar tecidos distantes (1, 2).

O início de um cancro está associado a diversos eventos moleculares. Os autores Hanahan e Weinberg (2) relataram alguns eventos comuns a quase todos os tumores, incluindo capacidade replicativa ilimitada, indução da angiogénese, resistência à apoptose, sinalização proliferativa permanente, evasão dos inibidores de crescimento, capacidade de invasão e metastização, capacidade de evitar a destruição imunológica e capacidade de modificar ou reprogramar o metabolismo celular, tal como mostra a Figura 1, advertindo que a instabilidade genómica e a inflamação podem ser promotoras do tumor (1, 2). A acumulação de alterações genéticas, sobretudo as que levam à ativação de oncogenes e/ou inativação de genes de supressão tumoral conduzem a falhas na regulação do ciclo celular e à própria transformação da célula (3, 4). Já o processo inflamatório proporciona moléculas bioativas no microambiente tumoral auxiliando o seu desenvolvimento (2).

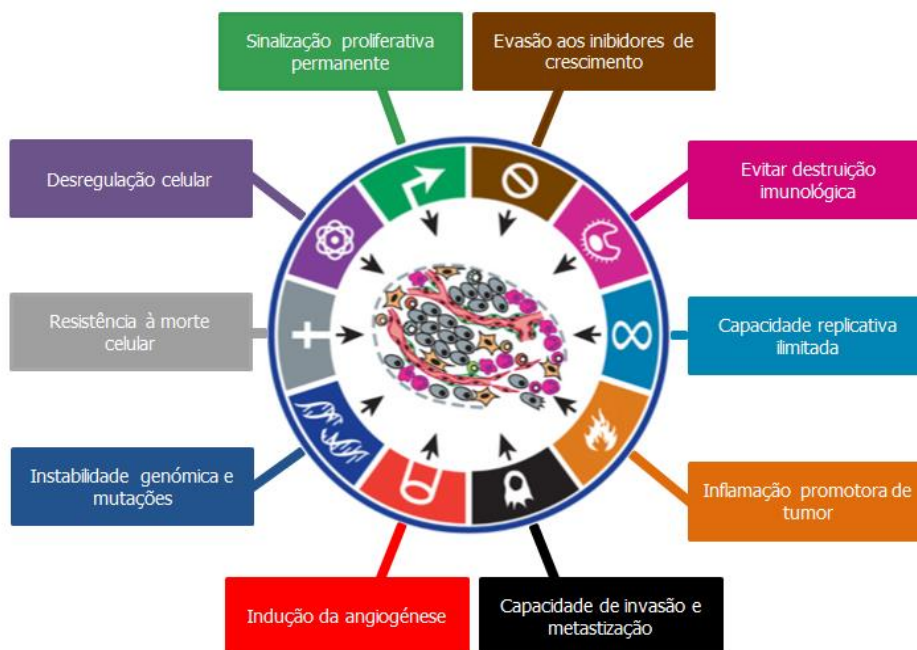


Figura 1 - Características indutoras da progressão tumoral (adaptado de Hanahan, 2011, licença de utilização no anexo 1) (2).

A tumorigénese na tireoide é caracterizada pela perda progressiva da diferenciação celular, conduzindo à diminuição das funções do tirócito e aquisição de um comportamento maligno (3). Além disto, Ramsden alertou para a influência da angiogénese no processo tumorigénico desta glândula (5). Paralelamente, membros da família dos fatores de transcrição *forkhead* são reguladores fundamentais no desenvolvimento embrionário e desempenham um papel importante no crescimento e diferenciação celular, sendo que parte deles estão envolvidos diretamente no processo de tumorigénese (6).

1.2. Glândula tiroideia

1.2.1. Anatomia e histologia

Numa fase primordial do desenvolvimento embrionário, a tireoide desenvolve-se a partir de células da faringe primitiva que expressam um conjunto de fatores de transcrição específicos, tais como FOXE1, Pax8, Ttf1 e Hhex fundamentais para a sua migração e morfologia (7, 8).

A tireoide é o maior órgão endócrino nos humanos, pesa entre 15 a 25 gramas e situa-se junto da traqueia. Tem a forma de borboleta, com cor avermelhada devido à riqueza em capilares sanguíneos e é composta por dois lobos unidos por um istmo. O tamanho e aparência desta glândula adulta são variáveis dependendo de alguns fatores, de salientar o sexo, atividade funcional, estado hormonal e incorporação de iodo (9).

Histologicamente, a tireoide é composta por inúmeras estruturas esféricas, os folículos, formadas por uma única camada de células foliculares ou tirócitos que delimitam o lúmen onde se encontra a tiroglobulina (9). O folículo é a unidade funcional da tireoide e armazena ativamente iodeto através de um co-transportador dependente de sódio, a glicoproteína Nis, localizado na membrana basal. O iodeto é oxidado na membrana apical, pela tiroperoxidase, sendo depois incorporado nos resíduos de tirosina da tiroglobulina e, posteriormente utilizado na síntese das hormonas tiroideias (10, 11). Além das células foliculares, o parênquima tiroideu apresenta outro tipo de células, as C ou parafoliculares (9).

1.2.2. Hormonas da tireoide

A principal função da tireoide é a síntese, armazenamento e secreção das hormonas tiroideias produzidas por dois tipos de células distintas, as células foliculares e as células C. Estas hormonas regulam funções vitais do organismo, tais como temperatura corporal, frequência cardíaca, pressão arterial e função intestinal (8, 12).

O eixo hipotálamo-hipófise tem um papel fulcral no controlo da função desta glândula, atuando sob um mecanismo de feedback negativo. A hormona libertadora da tirotropina (TRH), segregada pelo hipotálamo, estimula a libertação da hormona estimuladora da tireoide

Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tireoide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1

(TSH) pela hipófise anterior que por sua vez, estimula as células foliculares da tireoide a sintetizar e secretar T3 e T4 (Figura 2) (13).

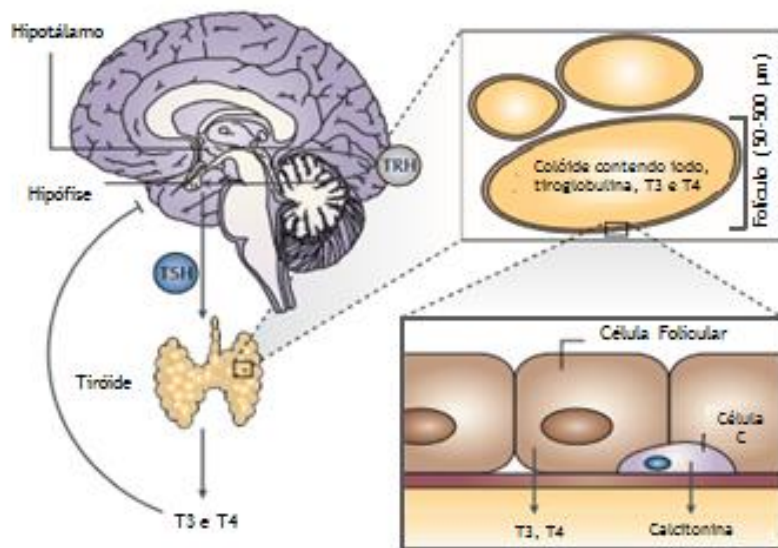


Figura 2 - Regulação hormonal: eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (adaptado de Kondo, 2006, licença de utilização no anexo 2) (13).

As principais hormonas produzidas na tireoide são as hormonas iodadas L-triiodotironina (T3, que incorpora 3 átomos de iodo) e L-tiroxina (T4, que incorpora 4 átomos de iodo). A biossíntese destas hormonas ocorre exclusivamente nesta glândula por iodação da tiroglobulina (Tg) pela enzima tiroperoxidase (TPO), sendo por isto necessária a expressão regulada dos genes *TG* e *TPO* (14). A hormona preferencialmente sintetizada é a T4, porém é menos ativa do que T3 havendo uma conversão de T4 em T3 pelo fígado e rins.

A expressão coordenada de vários fatores de transcrição como o FOXE1, NF-1, TTF1, PAX8 e HHEX, é fundamental para manter a função diferenciada da tireoide, incluindo a síntese e secreção de hormonas tiroideias (10, 15, 16), uma vez que estes fatores se ligam aos promotores da *TG* e *TPO* (14). Segundo alguns autores, o FOXE1 é o fator primordial que se liga à estrutura compacta da cromatina do promotor do gene *TPO* inativo, induzindo uma alteração estrutural que permite o acesso de NF-1. Juntos finalizam e estabilizam a abertura da cromatina permitindo o acesso de outros fatores de transcrição (Figura 3) (17).

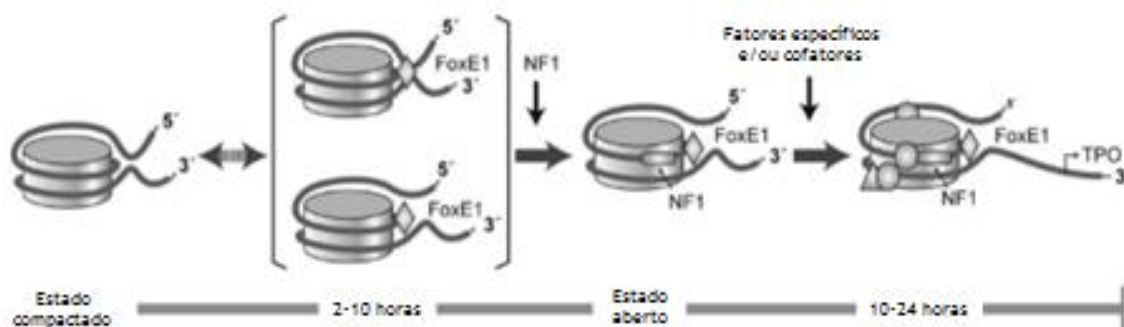


Figura 3 - Sequência de passos envolvidos na ativação da expressão de TPO (adaptado de Cuesta, 2007, licença de utilização no anexo 3) (17).

Variações dos níveis destas hormonas podem estar associadas a diversos fatores como alterações genéticas, gravidez, baixa temperatura ou elevada altitude. Alguns alelos de risco para o carcinoma da tireoide (rs 965513 em 9q22.33 e rs944289 em 14q13.3) estão associados a baixa concentração de TSH ou a baixa concentração de T4 e alta concentração de T3 (18). As células C são células neuroendócrinas com citoplasma claro e estão envolvidas na produção de calcitonina que intervém na homeostasia do cálcio (13).

1.3. Neoplasias da tireoide

O carcinoma da tireoide (CT) é cancro endócrino mais frequente e representa cerca de 1% de todas as neoplasias malignas, surge sobretudo em adultos apresentando maior prevalência em mulheres (numa razão de aproximadamente 3:1) (19-22). A crescente incidência mundial deste tipo de neoplasia, nas últimas décadas, tem sido justificada pelo efeito de fatores ambientais e pela melhoria dos testes de diagnóstico, que muitas vezes permitem a identificação de tumores de menores dimensões. A deteção precoce melhora o prognóstico destes doentes, diminuindo a taxa de mortalidade desta doença. Além disto, o CT tem de forma geral um bom prognóstico, o que pode ser explicado pela baixa taxa de proliferação celular (18, 19).

As neoplasias desta glândula podem ser benignas e designadas por adenomas (por exemplo o adenoma folicular) ou malignas e designadas por carcinomas (3, 9). Os nódulos na tireoide são muito frequentes e na sua maioria são benignos. Geralmente, a apresentação clínica de um paciente com CT é um nódulo solitário na tireoide. Histologicamente, o CT pode dividir-se em grupos distintos: os que têm origem nas células foliculares da tireoide, que englobam os carcinomas bem diferenciados, como o Carcinoma Papilar da tireoide (PTC) e o Carcinoma Folicular da tireoide (FTC); os Carcinomas Pouco Diferenciados e os Carcinomas Indiferenciados ou Anaplásicos da tireoide e os que têm origem nas células C, como o Carcinoma Medular (Tabela 1) (23).

Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tireoide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1

As formas esporádicas do CT representam cerca de 95% de todos os tumores da tireoide, enquanto que as formas familiares são responsáveis apenas por 5% (24).

Existem comportamentos biológicos característicos dos diferentes CT, muitos apresentam-se como lesões microscópicas, outros são de crescimento lento e não metastático e alguns dão origem a metástases a longa distância (13). Os carcinomas papilar, anaplásico e medular são facilmente diagnosticados com base em critérios citológicos, bem como algumas lesões benignas (lesões hiperplásicas, nódulos colóides e doença auto-imune da tireoide) (25).

Tabela 1 - Diferenças entre os diversos subtipos de carcinomas da tireoide (adaptado de Kondo, 2006, licença de utilização no anexo 2) (13).

Tipo de tumor	Prevalência	Rácio (feminino: masculino)	Idade de diagnóstico (anos)
Carcinoma Papilar da tireoide	85 - 90%	2:1 - 4:1	20 - 50
Carcinoma Folicular da tireoide	< 10%	2:1 - 3:1	40 - 60
Carcinoma Pouco Diferenciado da tireoide	Raro - 7%	0.4:1 - 2.1:1	50 - 60
Carcinoma Indiferenciado da tireoide	2%	1.5:1	60 - 80
Carcinoma Medular da tireoide	3%	1:1 - 1.2:1	30 - 60

1.3.1.Hiperplasias da tireoide

A hiperplasia da tireoide vulgarmente conhecida como bócio gera um aumento do volume da tireoide. O bócio pode ser difuso, quando há aumento de todas as células da tireoide, ou nodular, quando apenas algumas células sofrem aumento formando nódulos bem definidos (26).

1.3.2. Adenoma Folicular

O adenoma folicular é um tumor epitelial benigno e encapsulado. A distinção entre carcinoma folicular e adenoma folicular benigno requer a demonstração de invasão através da cápsula tumoral ou invasão vascular (13, 25).

1.3.3. Carcinomas derivados das células foliculares da tireoide

Os carcinomas derivados das células foliculares da tireoide ou carcinomas não-medulares da tireoide são indolentes e tratados por ressecção cirúrgica e iodo radioativo, com bom prognóstico. No entanto, os carcinomas pouco diferenciados e os anaplásicos são mais agressivos e ainda não existe tratamento eficaz (13). O prognóstico de CT é dependente de diversos fatores, como o subtipo de carcinoma, idade do doente, tamanho e estadió do tumor, capacidade de resposta ao iodo radioativo, capacidade de metastização, entre outros (27). A descrição de critérios morfológicos e o desenvolvimento na caracterização molecular sobretudo de PTC e FTC têm sido exaustivos, dado que um correto e atempado diagnóstico influencia o prognóstico da patologia (20, 27).

A necessidade de demonstrar malignidade, de analisar a presença de características nucleares típicas de PTC e a presença de zonas pouco diferenciadas em alguns FTC são dificuldades no diagnóstico diferencial dos subtipos de CT. Nas últimas décadas tem existido a tendência para a excessiva classificação de variantes foliculares do PTC em detrimento do diagnóstico de FTC. Assim, têm-se verificado uma diminuição da frequência de diagnóstico do FTC, em contraste com um aumento da incidência dos carcinomas bem diferenciados (27).

1.3.3.1. Carcinoma Papilar da tireoide

O carcinoma papilar da tireoide (PTC) deriva das células foliculares, apresenta-se bem diferenciado e em 95% dos casos é esporádico. É relativamente frequente, representando cerca de 80-85% de todas as neoplasias da tireoide cuja incidência crescente é, em parte, reflexo de um diagnóstico precoce. São tumores de crescimento lento, que ocorrem frequentemente como neoplasias multicêntricas cujas metástases são encontradas nos gânglios linfáticos locais (23, 27-29). Atualmente, quase metade dos PTCs diagnosticados têm um diâmetro menor ou igual a um centímetro (microcarcinomas papilares).

Nos carcinomas papilares, as células estão dispostas em papilas constituídas por um centro de tecido fibrovascular bem definido rodeado por uma ou duas camadas de células tumorais. Normalmente não têm folículos ou colóides, mas apresentam características particulares, tais como núcleo grande, pálido, irregular, contendo fendas e com aparência quebradiça. Sempre que as características citológicas anteriores não sejam esclarecedoras, pode-se avaliar a

estrutura papilar, reação do estroma, crescimento difuso e/ou a presença de corpos psamomatosos (20, 30).

Os carcinomas papilares dividem-se em vários tipos histológicos: forma clássica com arquitetura papilar; variante folicular; de células oncocíticas, sólidas ou crivosas. A variante folicular é responsável por cerca de 10% de todos os PTCs e as taxas de incidência e de sobrevivência são semelhantes às do carcinoma papilar clássico. Nesta variante as células embora estejam organizadas em folículos, exibem as características nucleares típicas de carcinomas papilares (13, 30).

1.3.3.2.Carcinoma Folicular da tireoide

O carcinoma folicular da tireoide (FTC) é um tumor epitelial maligno que, embora mostre diferenciação folicular não tem características nucleares de diagnóstico. Representam cerca de 10-15% de todas as neoplasias tiroideias e tendem a ser mais agressivos do que os PTCs. Maioritariamente, são tumores sólidos, encapsulados e maiores que um centímetro de diâmetro, os FTCs produzem metástases a longas distâncias, em vez de invasão dos gânglios linfáticos (23, 27). Ocorrem geralmente como tumores unifocais e depois da tireoidectomia parcial não é frequente a presença de parênquima residual (27, 28). A sua morfologia variável vai desde pequenos folículos contendo colóide a um padrão de crescimento trabecular ou sólido e as variantes tumorais incluem o tipo oncocítico e de células claras (13).

1.3.3.3.Carcinoma Pouco Diferenciado da tireoide

Carcinomas pouco diferenciados da tireoide são neoplasias derivadas de células epiteliais foliculares, que mostram a perda de diferenciação estrutural e funcional. Estas lesões geralmente apresentam mais de três centímetros de diâmetro, crescimento infiltrativo, necrose e invasão vascular (9, 13).

1.3.3.4.Carcinoma Anaplásico da tireoide

O carcinoma anaplásico da tireoide deriva do epitélio folicular e é composto parcial ou totalmente por células indiferenciadas. Representam cerca de 1 a 5% de todos os CT e são tumores agressivos que surgem geralmente acima dos 70 anos, revelando-se com ligeiro predomínio em mulheres. Apresentam elevada taxa de mortalidade, que tem vindo a diminuir nos últimos anos devido ao progresso no tratamento destes doentes (31, 32). Cerca de 30% destes carcinomas co-existem com outros carcinomas ou com hiperplasias da tireoide (33).

Geralmente estes são tumores sólidos e grandes, não-encapsulados e caracterizados por um padrão de crescimento infiltrativo, elevado índice mitótico e invasão vascular, uma vez que

perdem a capacidade de adesão intercelular (28, 34). Histologicamente, caracterizam-se por numerosas células atípicas, que incluem três padrões morfológicos principais, as células fusiformes, pleomórficas gigantes e escamosas (13).

Estes tumores têm rápida progressão local e podem metastizar para tecidos extra-tiroideus (33). A existência de metástases é frequente, sobretudo na região cervical, pulmões e pleura, mas também podem ser encontradas na pele, fígado, rins, pâncreas, coração e glândulas supra-renais (32).

Pouco se conhece acerca da sua patogénese, mas estes tumores podem ocorrer “de novo” ou podem progredir a partir de tumores mais diferenciados, como resultado de uma ou mais etapas de desdiferenciação, em particular, pela perda do gene de supressão tumoral *TP53* (Figura 4) (3, 35).

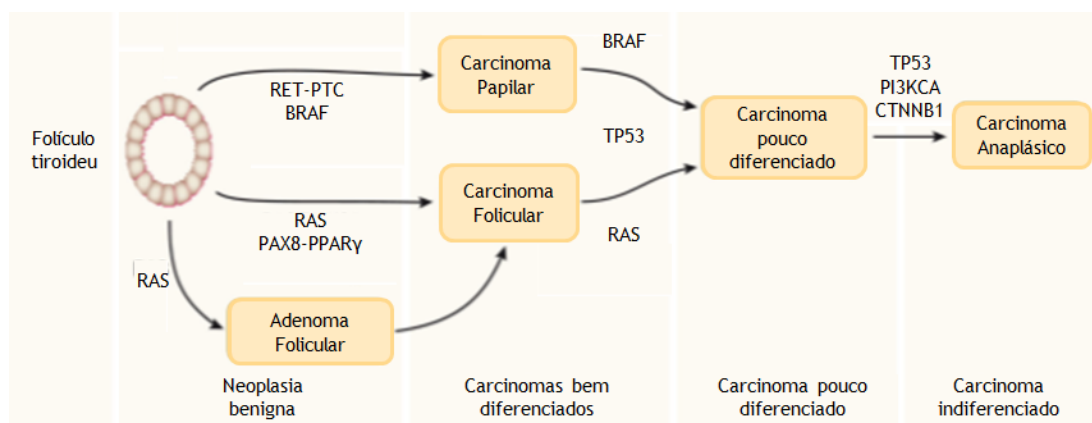


Figura 4 - Modelo de progressão dos carcinomas derivados das células foliculares (adaptado de Sastre-Perona, 2012, licença de utilização no anexo 4) (36).

1.3.4. Carcinoma Medular da tireoide

Os carcinomas medulares da tireoide representam cerca de 1 a 3% de todos CT, são mais homogêneos do que os carcinomas derivados das células foliculares e têm um pior prognóstico, produzindo metástases na região cervical, fígado, pulmão e osso. Cerca de 25% dos carcinomas medulares são hereditários, apresentando um modelo de transmissão autossômico dominante (23). A variante familiar desta patologia pode ocorrer como um evento isolado, o carcinoma medular da tireoide familiar, ou como parte da síndrome neoplásica endócrina múltipla tipo 2 (MEN 2), estando associado com mutações ativadoras do proto-oncogene *RET*. Mutações no gene *RET* também estão envolvidas na variante esporádica deste subtipo de CT (37, 38).

Não existem causas ambientais descritas, no entanto este carcinoma comporta-se como uma doença complexa impulsionada por múltiplas variantes que podem determinar a

suscetibilidade individual (23). Apesar da sua patogénese estar associada sobretudo a mutações no *RET*, existem casos de carcinoma medular que não apresentam mutações neste gene. Na maioria dos casos negativos para o *RET* foram encontradas mutações ativadoras no proto-oncogene *RAS* (23, 37, 39).

1.4.Etiologia

A etiologia dos tumores da tiroide é bastante complexa e permanece pouco conhecida. A sua origem multifatorial envolve fatores ambientais e genéticos, bem como a interação entre estes (19). A exposição à radiação ionizante e a deficiente ingestão de iodo têm sido apontadas como condicionantes ambientais de risco sobretudo para o PTC e FTC, respetivamente (19, 40-42). Verificou-se que o risco de CT tem condicionantes genéticas maiores do que qualquer outro tipo de cancro (18).

Estudos de incidência familiar, de ligação genómica e de associação com genes candidatos indicam a existência de uma importante contribuição de múltiplos genes de baixa e moderada penetrância para a suscetibilidade desta doença (43-45). Assim, o desenvolvimento de CT está associado a uma forte componente genética, uma vez que a presença de um familiar em primeiro grau com esta patologia, representa um importante fator de risco, comparativamente com outras neoplasias de hereditariedade não mendeliana, com um risco acrescido de cerca de 8.6 vezes, relativamente a indivíduos da população em geral, sobretudo para parentes masculinos de um probando masculino (19, 44-47). Tais observações exigem a identificação e validação de genes e das suas variantes como fatores de suscetibilidade, bem como a compreensão dos potenciais mecanismos envolvidos na carcinogénese tiroideia (19, 48).

Para além das condicionantes ambientes e genéticas, alguns autores sugerem que o risco de CT pode também estar relacionado com fatores hormonais ou alterações na função imune, apontando a inflamação crónica e/ou doenças auto-imunes como base para o aparecimento de células com alto risco de transformação maligna devido ao aumento de renovação celular (13, 45). Tem sido relatado também que a predisposição do sexo feminino para CT é menos relevante em casos induzidos pela radiação do que em casos de ocorrência natural de carcinomas da tiroide (49).

1.5. Genética molecular do cancro da tireoide

A genotipagem dos tumores pode ser uma ferramenta útil, dado que o genótipo de um tumor determina o seu comportamento biológico e, em alguns casos, a resposta a terapias específicas (27).

Alguns eventos genéticos já estão bem estabelecidos no processo tumorigénico da tireoide. Alterações somáticas nos oncogenes *BRAF* e *RAS*; mutações em genes mitocondriais e as translocações do *RET* (frequentes em cancros pediátricos, em indivíduos expostos a radiação ionizante e, em menor frequência, em indivíduos adultos com PTC esporádico) são frequentemente associadas ao PTC (50). A variante folicular do PTC está associada a mutações no *BRAF*, no *RAS* e a rearranjos *PAX8-PPAR γ* (51). As mutações no gene *RAS* estão também relacionadas com o FTC, tal como rearranjos *PAX8-PPAR γ* (13, 19, 20, 28, 51-54). Já mutações nos genes *TP53*, *CTNNB1* e *PI3KCA* estão relacionadas com o carcinoma anaplásico da tireoide (36). Mutações no promotor da telomerase (*TERT*) também tem sido apontadas como fator de suscetibilidade para os CTs, sobretudo para os subtipos mais agressivos (55, 56).

Genes envolvidos no desenvolvimento e função normais da glândula tireoide têm sido alvo de estudo, entre eles encontram-se o *TSHR* (*Thyroid-Stimulating Hormone Receptor*), *TPO* (*Thyroid Peroxidase*), *TG* (*Thyroglobulin*), *PDS* (*Solute Carrier Family 26, Member 4*), e *PAX8* (*Paired Box Gene 8*) (57).

1.6. Fator de transcrição FOXE1

O gene *FOXE1*, também designado por *Thyroid Transcription Factor 2* (*TTF2*), localiza-se no cromossoma 9q22.23 e é constituído por um único exão que codifica um fator de transcrição de 376 aminoácidos, cuja expressão é regulada, *in vitro*, pela presença de tirotropina, insulina e fator de crescimento semelhante à insulina-1 (11, 24, 52, 58, 59).

O *FOXE1* pertence à família de fatores de transcrição *forkhead*. Estes fatores partilham um domínio de ligação ao DNA em hélice, de 110 aminoácidos, altamente conservado, capaz de interagir com os nucleossomas e alterar a estrutura da cromatina criando um domínio local exposto necessário para a ação de outros fatores de transcrição (6, 19).

São muitos os fatores de transcrição cuja regulação é efetuada por diversos mecanismos de fosforilação, que podem afetar tanto a ligação ao DNA como a atividade transcricional. Alguns membros da família de fatores de transcrição *forkhead* são fosfoproteínas incluindo o *TTF2*, cuja modificação pós-traducional pode estar envolvida na modulação da sua atividade em resposta a diferentes estímulos (58). Além disto, os membros desta família de fatores de transcrição participam na regulação da proteína *WNT5A*, que é uma importante reguladora da

proliferação, diferenciação e mobilidade celular, embora o seu papel na tumorigénese ainda não seja claro (60).

A proteína nuclear de 42kDa, codificada por *TTF2*, apresenta elevada expressão nas células foliculares da tireoide e tem dupla função no desenvolvimento desta glândula. O *FOXE1* é expresso durante o desenvolvimento embrionário, sendo fundamental na organogénese, migração do precursor do tirócito e morfogénese da glândula tireoide. Nesta fase, o *FOXE1* reprime a atividade transcricional de genes específicos como o *TG* e *TPO*. Já na tireoide adulta é responsável pela ativação da transcrição dos genes anteriormente referidos, permitindo o auxílio na manutenção do estado diferenciado da tireoide (7, 11, 19, 21, 45, 52, 58, 61-64), mas também dos genes *NIS* e *DUOX2* (10).

Outros genes alvo da proteína nuclear *FOXE1* já estão descritos como fatores importantes no desenvolvimento da tireoide, nomeadamente o gene *T1560* (65, 66).

Para além disto, o *FOXE1* é também importante para a formação da pituitária. É encontrado em folículos pilosos, células exócrinas dos túbulos seminíferos, timo, epitélio da orofaringe e queratinócitos basais da epiderme, onde está envolvido em certas vias de sinalização (59, 64, 67, 68).

1.6.1. Sequência de polialaninas do FOXE1

As proteínas eucariotas possuem sequências homopoliméricas de determinados aminoácidos, também conhecidas como repetições de aminoácidos em *tandem*, que estão associadas ao desenvolvimento de algumas patologias. Estas sequências tendem a ter teores de guanina e citosina muito altos e apresentam um elevado grau de polimorfismo. (69). Os aminoácidos mais frequentemente encontrados nestas regiões são o ácido glutâmico, seguido da prolina, alanina, serina, leucina, glicina e glutamina.

A alanina é um aminoácido hidrofóbico apolar que tem facilidade em formar sequências repetitivas, possivelmente causadas pela derrapagem da polimerase. As sequências de polialaninas (polyA) encontradas em 494 proteínas humanas originam pelo menos nove doenças no ser humano incluindo atraso mental e malformações cerebrais, e em condições fisiológicas normais têm a capacidade de formar estruturas secundárias do tipo β , que são extremamente resistentes à desnaturação química e degradação enzimática (70-72). Estas sequências são encontradas em diversas espécies estando, na sua maioria, envolvidas na regulação da transcrição.

Do ponto de vista estrutural, a proteína *FOXE1* apresenta uma região rica em repetições do aminoácido alanina, a região de polialaninas (Figura 5), e a presença de polimorfismos que envolvem esta região foi primeiramente reportada por Macchia, em 1999 (15). Esta região, neste gene, varia entre 11 a 22 resíduos de alaninas, sendo que 14 e 16 representam mais de 98% dos alelos relatados (24, 73).

Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tireoide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1

```
.ATGACTGCCGAGAGCGGGCCGCCGCCGCCGAGCCGGAGGTGCTGGCTACCGTGAAGGA
-M--T--A--E--S--G--P--P--P--P--Q--P--E--V--L--A--T--V--K--E
60 AGAGCGCGGCGAGACGGCAGCAGGGGCCGGGTCCCAGGGGAGGCCACGGGCGCGGGG
20 --E--R--G--E--T--A--A--G--A--G--V--P--G--E--A--T--G--R--G--A
120 GGGCGGGCGGCGCCGCAAGCGCCCCCTGCAGCGCGGAAGCCGCCCTACAGCTACATCGC
40 --G--G--R--R--R--K--R--P--L--Q--R--G--K--P--P--Y--S--Y--I--A
180 GCTCATCGCCATGGCCATCGCGCACGCGCCGAGCGCCGCCTCACGCTGGGCGGCATCTA
60 --L--I--A--M--A--I--A--H--A--P--E--R--R--L--T--L--G--G--I--Y
240 CAAGTTCATCACCGAGCGCTTCCCCTTCTACCGCGACAACCCAAAAAGTGGCAGAACAG
80 --K--F--I--T--E--R--F--P--F--Y--R--D--N--P--K--K--W--Q--N--S
300 CATCCGCCACAACCTCACACTCAACGACTGCTTCTCAAGATCCCGCGCGAGGCCGGCCG
100 --I--R--H--N--L--T--L--N--D--C--F--L--K--I--P--R--E--A--G--R
360 CCCGGTAAGGGCAACTACTGGGCGCTTGACCCCAACGCGGAGGACATGTTTCGAGAGCGG
120 --P--G--K--G--N--Y--W--A--L--D--P--N--A--E--D--M--F--E--S--G
420 CAGCTTCTGCGCCGCGCAAGCGCTTCAAGCGCTCGGACCTCTCCACCTACCCGGCTTA
140 --S--F--L--R--R--R--K--R--F--K--R--S--D--L--S--T--Y--P--A--Y
480 CATGCACGACCGCGCGGCTGCCGAGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCCAT
160 --M--H--D--A--A--A--A--A--A--A--A--A--A--A--A--A--A--A--A--I
540 CTTCCCAGGCGCGGTGCCGCCGCCGCCGCCGCCCTACCCGGGCGCGTCTATGCAGGCTA
180 --F--P--G--A--V--P--A--A--R--P--P--Y--P--G--A--V--Y--A--G--Y
600 CGCGCCGCCGTCGCTGGCCGCGCCGCTCCAGTCTACTACCCGCGGCGTGCAGCCGGCCC
200 --A--P--P--S--L--A--A--P--P--P--V--Y--Y--P--A--A--S--P--G--P
660 TTGCCGCGTCTTCGGCCTGGTTCCTGAGCGCCGCTCAGCCCAGAGCTGGGGCCCCGACC
220 --C--R--V--F--G--L--V--P--E--R--P--L--S--P--E--L--G--P--A--P
720 GTCGGGGCCCGGCGGCTCTTGCCTTTCGCTCCGCCGGCGCCCCGCTACCACCACCGG
240 --S--G--P--G--G--S--C--A--F--A--S--A--G--A--P--A--T--T--T--G
780 CTACCAGCCCGCAGGCTGCACCGGGGCCCGGCCGCAACCCCTCCGCTATGCGGCTGC
260 --Y--Q--P--A--G--C--T--G--A--R--P--A--N--P--S--A--Y--A--A--A
840 CTACGCGGGCCCCGACGGCGGTACCCGAGGGCGCCGCGCAGTGCATCTTTGCCGCTGC
280 --Y--A--G--P--D--G--A--Y--P--Q--G--A--G--S--A--I--F--A--A--A
900 TGGCCGCTGGCGGGACCCGCTTCGCCCCAGCGGGCGGCAGCAGTGGCGGCGTGGAGAC
300 --G--R--L--A--G--P--A--S--P--P--A--G--G--S--S--G--G--V--E--T
960 CACGGTGGACTTCTACGGGCGCACGTCGCCCGCCAGTTCGGAGCGCTGGGAGCCTGCTA
320 --T--V--D--F--Y--G--R--T--S--P--G--Q--F--G--A--L--G--A--C--Y
1020 CAACCCTGGCGGGCAGCTCGGAGGGGCCAGTGCAGGCGCCTACCATGCTCGCCATGCTGC
340 --N--P--G--G--Q--L--G--G--A--S--A--G--A--Y--H--A--R--H--A--A
1080 CGCTTATCCCGGTGGGATAGATCGGTTTCGTGTCCGCCATGTGA.....
360 --A--Y--P--G--G--I--D--R--F--V--S--A--M--*.....
```

Figura 5 - Sequência parcial de cDNA do FOXE1. A amarelo são zonas UTR e a azul está assinalada a região repetitiva com 16 resíduos de alanina (sequência disponível em http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000178919;r=9:97853254-97856715;t=ENST00000375123).

A função destas sequências repetitivas é desconhecida, mas sabe-se que quando se encontram em genes codificantes de fatores de transcrição podem induzir perda ou ganho de funções (72). As variações no tamanho desta região resultam portanto em alterações da atividade transcricional da proteína, sugerindo que uma modificação conformacional ligada ao número de alaninas altera a interação do fator de transcrição com genes alvo, por influenciar a estabilidade da proteína em causa. Além disso, pode levar à agregação proteica e retenção citoplasmática (52, 74-77). Apesar do seu papel na tumorigénese ser ainda um pouco controverso, o ganho ou perda de função, em combinação com fatores de risco adicionais sejam eles genéticos ou ambientais, podem representar fatores de risco para o CT (75).

1.6.2. FOXE1 e patologias tiroideias

Encontramos descritas na literatura, duas mutações do tipo *missense* no gene *FOXE1*, em casos de agnesia tiroideia (78). Em 2011, Denny e os seus colaboradores analisaram 4 SNPs (rs7850258, rs965513, rs925489, e rs10759944) e verificaram que o rs965513 é o principal alelo de risco associado com o hipotireoidismo primário (52).

Dada a especificidade tecidual deste fator de transcrição e a sua associação com anomalias da tireoide, colocou-se a questão do seu papel no desenvolvimento de neoplasias deste órgão. Diversos estudos apontam para uma associação entre variantes genéticas do *FOXE1* e a suscetibilidade para o desenvolvimento de CT (Figura 6).

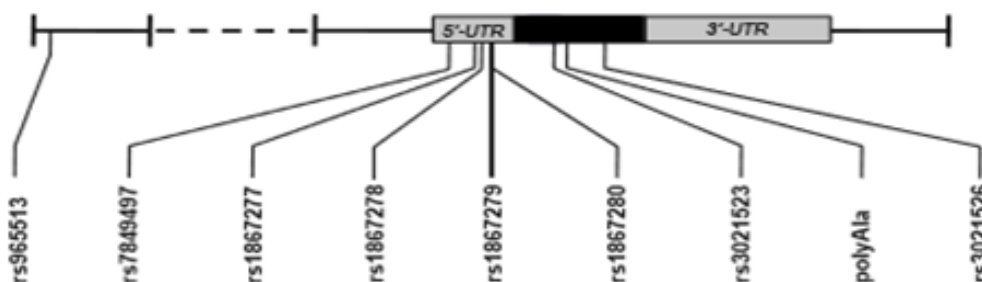


Figura 6 - Gene *FOXE1*, no cromossoma 9, incluindo nove variantes já estudadas em diversas populações. A preto está esquematizado o único exão deste gene (adaptado de Tomaz, 2012, licença de utilização no anexo 5) (24).

Gudmundsson et al (18), em 2009, realizaram um estudo de *Genome Wide Association* (GWA) utilizando doentes islandeses e outros de ascendência europeia, com carcinomas papilar (PTC) ou folicular da tireoide (FTC). Estes autores mostraram que os polimorfismos rs944289 (localizado no cromossoma 5 14q13.3 na proximidade do gene *NKX2-1*) e rs965513 (localizado

Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tireoide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1

no cromossoma 9q22.33 na proximidade do gene *FOXE1*) aumentam o risco para ambos os subtipos de carcinoma da tireoide (CT) (18).

Landa et al (19), em 2009, verificaram a associação entre uma variante na região promotora do gene *FOXE1* (rs187277; c.-283G>A) e a suscetibilidade para o CT (PTC e FTC), em 615 doentes espanhóis e 482 italianos. Propuseram que a presença desta alteração poderá influenciar os níveis de transcrição deste gene, por alterações no recrutamento de outros fatores de transcrição, nomeadamente USF1/USF2 (19).

A exposição à radiação após o acidente nuclear de Chernobyl levou a um aumento, de 3 a 75 vezes, da incidência do PTC sobretudo em crianças, já que a glândula tiroideia é mais sensível aos efeitos carcinogénicos da radiação nesta faixa etária (49). Takahashi *et al* (79), em 2010, realizaram um estudo com 667 pacientes Bielorrussos, cuja idade no acidente de Chernobyl variava entre os 0 e os 18 anos. Verificaram a associação entre as variantes rs187277, na região 5'UTR, e rs965513 do *FOXE1* e o desenvolvimento de PTC relacionado com exposição à radiação (79).

Matsuse *et al* (41), em 2011, analisaram 509 doentes japoneses com PTC esporádicos. Verificaram a associação de rs965513 (*FOXE1*) e rs944289 (*NKX2-1*) com o aumento do risco de PTC esporádico (41).

Bychkov *et al* (21), em 2013, realizaram um estudo imuno-histoquímico de *FOXE1* em 48 doentes japoneses com PTC e, posteriormente detetaram as variantes rs965513 (G>A) e rs1867277 (c.-238G>A). Verificaram que a expressão da proteína FOXE1 diminui com a distância entre a fronteira do tumor e o tecido normal adjacente, existindo uma acumulação excessiva no citoplasma em detrimento do núcleo. Assim, propõem a existência de cascatas de sinalização que promovem modificações na FOXE1, levando à sua exportação para o citoplasma. Estes autores tentaram também associar a expressão de *FOXE1* com os SNPs acima mencionados, tendo verificado que o alelo de risco era o rs1867277 (21). Outros autores admitem que a perda de expressão nuclear de *FOXE1* poderá estar associada à desdiferenciação celular observada nas células tumorais (80).

Penna-Martinez *et al* (81), em 2014, genotiparam 196 doentes alemães com PTC e 47 com FTC para o rs965513 (A/G), no *FOXE1*, e o rs944289 (C/T), no *NKX2-1*. Observaram uma associação entre o rs965513 e a suscetibilidade de PTC e FTC, verificando que o risco aumentava em tumores num estadio mais avançado. Foi sugerido que o *FOXE1* poderá servir para controlar o crescimento da tireoide tanto em fases embrionárias precoces como durante a vida adulta (81).

A sequência de polialaninas do gene *FOXE1* tem sido implicada na fenda palatina, cancro da pele, e falência prematura do ovário (6, 59, 82-84), bem como, no desenvolvimento de patologias tiroideias, nomeadamente hipotiroidismo congénito e disgenesia da tireoide (6, 59, 85).

Carré A *et al* (74), em 2007, realizaram um estudo com 115 doentes franceses e demonstraram que a extensão de polyA do FOXE1 está relacionada com a disgenesia da tireoide, sendo um fator de risco mas não a causa da doença, uma vez que muitos controlos

apresentaram o genótipo 14Ala/14Ala. Verificaram um efeito protetor do genótipo 16Ala/16Ala para os casos de disgenesia da tireoide, contrastando com o risco associado ao genótipo 14Ala/14Ala. Também observaram que os alelos 14 e 16 eram os mais frequentes tanto nos controlos como nos doentes, sobretudo o 14 (74). Resultados semelhantes foram obtidos por outro grupo que estudou crianças com hipotireoidismo congénito e disgenesia da tireoide (86).

Santarpia *et al* (87), em 2007, evidenciaram a representação excessiva do genótipo 16Ala/16Ala em 57 pacientes sicilianos com hipotireoidismo congénito, e menor representação do genótipo 14Ala/14Ala (87).

Kallel *et al* (57), em 2010, fizeram um estudo com 261 tunisinos com doenças auto-imunes da tireoide e com 170 espanhóis com CT, tendo genotipado a sequência de polialaninas e o rs1867277 do *FOXE1*. Estes autores verificaram que o alelo 16Ala e o genótipo homozigótico 16Ala/16Ala aumentavam o risco de desenvolvimento de CT, tal como acontecia com o rs1867277 (57).

Szczepanek *et al* (88), em 2011, analisaram o tamanho da sequência polyA do *FOXE1*, num grupo de 40 pacientes polacos com hemiagenesia da tireoide, incluindo seis casos familiares. Verificaram que as sequências repetitivas com 12 resíduos de alaninas não eram encontrados nestes pacientes e as sequências com 16 ou mais alaninas só estavam presentes em pacientes com esta doença na forma familiar. Assim, apesar do pequeno número de pacientes, inferiram que sequências polyA maiores podem contribuir para a genética molecular da forma familiar de hemiagenesia da tireoide mas não para a forma esporádica (88).

Bullock *et al* (73), em 2012, efetuaram um estudo com o objetivo de avaliar a associação entre a sequência de polialaninas do *FOXE1* com o risco de PTC, em 70 doentes australianos. Analisaram os seguintes polimorfismos rs3758249 (G>A), rs907577 (A>G), rs1867277 (G>A), rs3021526 (T>C), rs907580 (C>T) e a sequência de polialaninas. Estes autores constataram que, sobretudo 16 resíduos de alaninas e o rs1867277 estavam relacionados com o PTC (73).

Tomaz *et al* (24), em 2012, realizaram um estudo na população portuguesa que visou associar nove variantes do *FOXE1* com cancros da tireoide não medulares, em 80 doentes com a forma esporádica e 60 com a forma familiar. As variantes estudadas incluíram rs7849497, rs1867277, rs1867278, rs1867279 e rs1867280, localizadas no promotor do *FOXE1*; rs965513 localizada a montante do *FOXE1*; rs3021523 e rs3021526 localizadas na região exónica de *FOXE1*; e a sequência de polialaninas do *FOXE1*. Estes autores concluíram que as nove variantes estão associadas ao risco de CT, sobretudo as variantes rs965513 e a sequência de polialaninas contendo 16 ou mais resíduos (24).

Maillard *et al* (89), em 2015, realizaram um estudo na Polinésia Francesa, com 177 doentes com PTC e 52 com FTC. Analisaram as variantes rs944289 do *NKX2-1*; rs965516, rs1867277 e rs71369530 (sequência polyA) do *FOXE1* e rs1801516 do *ATM*. Os autores demonstraram a influência do *FOXE1* e *ATM* na etiologia dos carcinomas da tireoide bem diferenciados e evidenciaram a relevância dos rs965516 e rs71369530 como marcadores de suscetibilidade para PTC e FTC (89).

Pereda *et al* (90), em 2015, realizaram um estudo semelhante ao anterior, em 203 doentes cubanos com carcinomas da tireoide bem diferenciados, mostrando a influência destes SNP nesta população (90).

Todos os estudos que abordaram a variabilidade da sequência repetitiva de alaninas do FOXE1 indicaram que os alelos 14 e 16 são os mais frequentes numa grande diversidade de populações e que 16 ou mais resíduos de alaninas estão associadas com o risco de CT. Porém, do ponto de vista funcional, os resultados são controversos e inconclusivos relativamente à capacidade de transactivação dos diferentes alelos da região repetitiva do FOXE1 (73, 74). A falta de resultados mais esclarecedores deve-se também ao pequeno número de indivíduos estudados por cada equipa.

1.7. Objetivos do estudo

O objetivo principal deste estudo foi determinar o efeito da variabilidade da sequência de polialaninas do gene *FOXE1* sobre a suscetibilidade ao cancro da tireoide esporádico, na população portuguesa. Como objetivos adicionais, foi avaliado o efeito da variabilidade desta região repetitiva sobre o tipo histológico do tumor, as suas dimensões, o sexo, a idade e a presença de metástases.

2. Materiais e Métodos

2.1. População em estudo

Este estudo incluiu um grupo de 500 doentes caucasianos com carcinoma da tireoide esporádico (411 do sexo feminino e 89 do sexo masculino, cuja média de idades \pm DP era de 46.3 ± 14.0 anos) identificados pelo Instituto Português de Oncologia de Coimbra (IPO-Coimbra) e um grupo de 502 controlos caucasianos (372 do sexo feminino e 130 do sexo masculino, cuja média de idades \pm DP era de 38.3 ± 13.4 anos) recrutados em colheitas organizadas em colaboração com o Instituto Português do Sangue (incluindo os distritos de Aveiro, Castelo Branco, Coimbra, Guarda, Leiria e Viseu).

A recolha de amostras biológicas foi realizada após o consentimento informado de todos os doentes e controlos, sendo este um estudo previamente aprovado pelas Comissões de Ética das instituições envolvidas.

2.2. Genotipagem

2.2.1. Extração de DNA a partir de sangue fresco

O procedimento de extração de DNA foi baseado no método de *salting-out*, adaptado de Miller (1988) (91). O DNA foi extraído a partir dos leucócitos existentes em 10 mL de sangue periférico recolhido para um tubo de EDTA e armazenado a 4°C até manipulação. A amostra de sangue foi transferida do tubo de EDTA para um tubo de *Falcon* de 50 mL devidamente identificado, no qual foi adicionado tampão de lise de glóbulos vermelhos (RBC: 155 mM NH₄Cl, 20 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA, pH 7.4) até perfazer um volume final de 40 mL. O tubo foi agitado manualmente e incubado em gelo durante 15 min, com inversões frequentes. Após incubação, o tubo foi centrifugado (*Allegra™ X-22R Centrifuga Beckman Coulter, EUA*) a 2500 rpm durante 10 min a 4°C, e seguidamente fez-se a decantação cuidadosa do sobrenadante preservando-se o *pellet* contendo os leucócitos. Ao *pellet* foi adicionado 5 mL de tampão de extracção secundária (SE: 75 mM NaCl, 25 mM Na₂EDTA, pH 8.0), 12.5 µL de proteinase K (20 mg/ml) e 500 µL de SDS 10%, seguido de agitação no vórtex, até ressuspender completamente o precipitado, e incubação durante a noite a 55°C. Depois da digestão, adicionou-se 3 mL de NaCl saturado (6 M) e agitou-se no vórtex. Seguiu-se nova incubação de 10 min a 55°C, com posterior agitação no vórtex e centrifugação a 4000 rpm durante 30 min a 15°C. O sobrenadante foi decantado para um novo tubo de *Falcon* de 50 mL identificado,

evitando a formação de espuma e o arrastamento de *pellet*. Para precipitar o DNA adicionou-se, ao sobrenadante, cerca de 10 mL de etanol 100% frio e inverteu-se o tubo suavemente cerca de 50 vezes, tendo-se observado a formação do novelo de DNA que foi cuidadosamente transferido, juntamente com cerca de 750 µL da solução, para um *epENDORF*. Efetuou-se uma centrifugação do *epENDORF* (*Micro 20, Hettich Zentrifugen, Alemanha*) a 13000 rpm durante 5 min e o sobrenadante foi decantado e descartado. O sedimento de DNA foi lavado duas vezes com 750 µL de etanol 70% frio, centrifugando-se a 13000 rpm durante 5 min. Decantou-se o sobrenadante e deixou-se secar o *pellet* (DNA) ao ar durante 30 min, depois foi hidratado com 1 mL de tampão Tris-EDTA (TE) e deixado em agitação lenta e permanente (*Rotator Mixer, RM Multi-1, Starlab, Alemanha*) durante a noite à temperatura ambiente.

2.2.2. Quantificação do DNA

Amostras com concentrações de DNA muito baixas ou muito altas ou com a presença de impurezas vão condicionar metodologias posteriores. Assim, a análise da quantidade e qualidade de uma amostra de DNA é da máxima importância, tendo sido efetuada por determinação espectrofotométrica (*NanophotometerTM, Implen, Alemanha*). É possível estimar a concentração precisa de ácidos nucleicos numa amostra através da análise da absorção de raios ultra violeta (UV) pelos nucleótidos. As purinas e pirimidinas têm absorção máxima por volta dos 260 nanómetros (nm) (dATP:259nm; dCTP:272nm; dTTP:247nm) se a amostra de DNA for pura, sem contaminação significativa de proteínas ou outros componentes, como o RNA. Para obter o grau de pureza é determinado o rácio DO260/DO280. Um rácio entre 1.8 - 2.0 significa que a absorção é feita pelos ácidos nucleicos. Um rácio inferior indica a presença de proteínas ou outros absorventes de UV. Um rácio superior a 2.0 significa que as amostras estão contaminadas por RNA. Após quantificação, todas as amostras foram diluídas em TE para a mesma concentração final (100 ng/µL).

2.2.3. Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Para a amplificação exponencial, *in vitro*, de uma região específica do DNA efetuou-se a técnica PCR (*Polimerase Chain Reaction*) desenvolvida em 1985 por Kary Mullis, que consiste numa reação em cadeia catalisada por uma enzima polimerase.

No presente trabalho foi estudado o gene *FOXE1*, mais especificamente fragmentos deste gene contendo a sequência de polialaninas. Para a análise de fragmentos por eletroforese capilar foram necessários fragmentos marcados com três fluorocromos diferentes combinados com três tamanhos distintos. Para tal, foram usados *primers forward* (cadeia sense) com a mesma sequência, que diferiam no fluorocromo com o qual estavam marcados na

Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tireoide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1

extremidade 5' (Cy5, D2 e D3), combinados com três *primers reverse* (cadeia anti-sense) cuja sequência era diferente e portanto, originavam fragmentos de diferentes tamanhos (Tabela 2). Para cada combinação de *primers* foi necessário proceder à otimização das condições de PCR, ajustando concentrações de MgCl₂, temperaturas de *annealing*, diferentes aditivos e até diferentes enzimas. Depois de otimizadas, todas as reações PCR foram realizadas para um volume final de 5 µL: 0.7 ng/µL DNA, 0.2 µmol de *primer forward* e de *reverse* (Stabvida, Portugal), 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 1 U de *Supreme Master Mix* (20 nM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% (v/v) glicerol) (Nzytech, Portugal), 5 M de betaína, 5% de DMSO e água destilada estéril para perfazer o volume final. Para cada reação foi efetuado um controlo negativo, que permitiu despistar possíveis contaminações, tendo sido efetuado em simultâneo e sujeito às mesmas condições das restantes reacções, contendo todos os constituintes reacionais atrás referidos excepto o DNA. As reações de PCR foram processadas num termociclador (*T100TM Thermal Cycler*, Bio Rad, EUA) e o perfil de ciclos de amplificação térmica iniciou-se com uma desnaturação inicial a 98°C durante 5 min, seguida de 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo de amplificação englobou a desnaturação do DNA a 95°C durante 30 seg; a hibridação dos *primers* com o DNA à temperatura de *annealing* ótima para cada par (55-64°C) durante 30 seg (Tabela 2); e a polimerização das novas cadeias a 72°C durante 1 min. Após os ciclos de amplificação, seguiu-se uma extensão final a 72°C, durante 10 min, uma vez que os fragmentos amplificados, apesar de relativamente pequenos, tinham grande conteúdo C/G.

Tabela 2 - Lista das combinações dos *primers forward* marcados com diferentes fluorocromos e dos *primers reverse* com diferentes tamanhos e respetivas condições de PCR.

<i>Primer Forward</i> (5'-3')	<i>Primer Reverse</i> (5'-3')	Tamanho do fragmento correspondente a 16 alaninas (pb)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)
D2 (DY751): CTTCAAGCGCTCGGACCTCTC	100: GCGTAGCCTGCATAGACGGCG	159	56
	200: ACGCCGCGGGGTAGTAGACTG	206	58
	250: AGCTCTGGGCTGAGCGGCCG	264	58
D3 (DY681): CTTCAAGCGCTCGGACCTCTC	100: GCGTAGCCTGCATAGACGGCG	159	56
	200: ACGCCGCGGGGTAGTAGACTG	206	58
	250: AGCTCTGGGCTGAGCGGCCG	264	61
D4 (Cy5): CTTCAAGCGCTCGGACCTCTC	100: GCGTAGCCTGCATAGACGGCG	159	56
	200: ACGCCGCGGGGTAGTAGACTG	206	58
	250: AGCTCTGGGCTGAGCGGCCG	264	64

Para os indivíduos que foram amplificados por PCR e seguidamente analisados por *heteroduplex* ou por sequenciação direta usou-se o *primer forward* 5'CTTCAAGCGCTCGGACCTCTC 3' (sequência igual às anteriores sem marcação com

fluorocromo) e o *primer reverse* 5' TGCAGCCTGCGGGCTGGTAG 3', cujo fragmento resultante correspondente a 16 alaninas tinha 356 pb. As condições da PCR foram iguais às referenciadas anteriormente para a temperatura de *annealing* de 64°C excetuando os ciclos de amplificação que foram aumentados para 36.

2.2.4. Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose permitiu separar fragmentos de DNA produzidos na PCR. A concentração do polímero (*agarose LE Seakem®*, Brasil e Suíça) no gel pode variar e quanto maior for, melhor será a resolução da separação. As concentrações usadas para separar os fragmentos entre 150-300 pares de bases (pb) estavam compreendidas entre 1.5 e 1.75% (m/v). Para a preparação do gel, dissolveu-se a agarose necessária numa solução tamponada TAE 1x, sob aquecimento. Após arrefecimento da solução, adicionou-se *GreenSafe* (Nzytech, Portugal) 1 mL/mL e verteu-se a solução num berço previamente montado com os pentes necessários. Após solidificar, retiraram-se os pentes e o gel foi submerso na tina de eletroforese horizontal contendo uma solução tamponada TAE 1x. Em seguida, carregaram-se os poços com 2 µl dos produtos da PCR e outro com 1 µl marcador de peso molecular (*HyperLadder II*, Bioline, Reino Unido), que foi usado como tamanho-padrão permitindo estimar o tamanho das bandas relativas aos fragmentos. Seguidamente as separações decorreram sob uma diferença de potencial de cerca de 170 V durante 25 min. O gel foi observado sob radiação UV, num transiluminador UVITEC (*Uvitec Cambridge*, Reino Unido), acoplado a um sistema de aquisição de imagem.

2.2.5. Análise de fragmentos

A análise de fragmentos por eletroforese capilar é uma técnica que permite determinar o genótipo de um indivíduo, já que separa por tamanhos os fragmentos marcados com fluorocromos obtidos na PCR.

Devido ao elevado número de amostras deste estudo, rentabilizamos os recursos injetando, no mesmo capilar, diferentes indivíduos amplificados com as várias combinações de *primers* referidas na PCR. Teve-se o cuidado de não colocar na mesma corrida mais do que um indivíduo amplificado com cada uma das 9 combinações possíveis.

Ao contrário da sequenciação, os produtos da PCR submetidos a esta técnica não necessitaram de ser purificados mas sim diluídos. A preparação das amostras para injeção no capilar consistiu na adição de 100 µL de água mili-Q a cada 2 µL de produto da PCR e homogeneizou-se. Seguidamente, colocou-se num novo tubo PCR 18 µL de formamida, 2 µL de marcador 600 (*GenomaLab™*, Beckman Coulter, EUA) e 0.5 µL de nove produtos da PCR,

diluídos, de indivíduos amplificados com as diferentes combinações. Depois de uma ligeira homogeneização, transferiu-se a solução para o poço, na placa de sequenciação, evitando bolhas. Cobriram-se os poços utilizados com óleo mineral e noutra placa colocou-se tampão de sequenciação comercial, nas posições correspondentes. A análise foi efetuada num sequenciador automático (*GenomaLab™ GeXP, Genetic Analysis System, Beckman Coulter, EUA*) utilizando o método de execução “FragTest”, conjugado com modelo quártico e a calibração de mobilidade AE-Ver2 Dye.

Os tamanhos dos fragmentos dado pelo software foram obtidos por comparação com o marcador.

2.2.6. Análise heteroduplex

Para confirmar os resultados obtidos na análise de fragmentos por eletroforese capilar efetuou-se uma análise *heteroduplex* numa amostra aleatória de indivíduos. Esta técnica fundamenta-se na separação das cadeias de DNA por desnaturação térmica formando-se posteriormente cadeias híbridas. As moléculas híbridas são separadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida não-desnaturante, apresentando diferentes migrações eletroforéticas. Para a preparação do gel de acrilamida a 8% adicionou-se, num tubo de *Falcon* de 50 mL, 13.3 mL de solução comercial de acrilamida:bisacrilamida 29:1; 22.3 mL de água destilada, 4 mL de TBE 10x, 360 µL de APS e 72 µL de TEMED, agitou-se e verteu-se para o sistema vertical previamente montado, deixando-o polimerizar cerca de uma hora. Os fragmentos resultantes da PCR foram desnaturados a 98°C durante 5 min e imediatamente carregados no gel. Seguidamente, as separações decorreram sob uma diferença de potencial de 165 V durante 3 horas. O gel foi retirado do sistema, colocado numa tina de coloração com TBE 1x e aproximadamente 15 µL de *GreenSafe (Nzytech, Portugal)* e deixado a corar durante toda a noite. O gel foi observado sob radiação UV, num transiluminador UVITEC (*Uvitec Cambridge, Reino Unido*), acoplado a um sistema de aquisição de imagem.

2.2.7. Sequenciação de DNA

A confirmação dos resultados de genotipagem foi realizada por sequenciação de DNA de amostras representativas de cada genótipo e em casos de genótipo duvidoso. A preparação das amostras para a sequenciação foi dividida em 4 passos:

- Purificação enzimática dos fragmentos resultantes da PCR: adicionou-se 0.5 µL de FastAP (*Thermosensitive Alkaline Phosphatase*) (*Fermentas, Reino Unido*) e 0.25 µL Exo I (*Exonuclease I*) (*Fermentas, Reino Unido*) a cada produto da PCR e incubou-se 20 min a 37°C seguidos de 20 min a 80°C;

Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tireoide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1

- Reação de sequenciação: num tubo de PCR novo adicionou-se 2 µL de produto da PCR purificado, 6.75 µL de água mili-Q, 2 µL de mix de sequenciação comercial (*Beckman Coutter, EUA*) e 0.25 µL de *primer forward* sem marcação com fluorocromo e colocou-se no termociclador, cujo protocolo iniciou com uma desnaturação de 5 min a 96°C, sucedida de 29 ciclos englobando 20 seg a 96°C, 20 seg a 55°C e 4 min a 60°C, seguidos de 8 min a 60°C.

- Precipitação dos fragmentos: a cada reação adicionou-se 1 µL de acetato de sódio, 1 µL de EDTA, 0.5 µL de glicerol e 60 µL de etanol 95% frio. Colocou-se sob rotação, na Vortex Mixer (*VELP Scientifica, Starlab, Alemanha*), durante cerca de 20 min e descartou-se o sobrenadante. Ao *pellet*, adicionou-se 150 µL de etanol 70% frio e agitou-se de novo durante 20 min. Retirou-se o sobrenadante e deixou-se secar o *pellet* à temperatura ambiente.

- Ressuspensão dos fragmentos em formamida: a cada *pellet* adicionou-se 15 µL de formamida, homogeneizou-se e deixou-se repousar durante 10 min. Transferiu-se a solução para o poço na placa de sequenciação evitando bolhas. Cobriram-se os poços utilizados com óleo mineral e noutra placa colocou-se tampão de sequenciação comercial, nas posições correspondentes.

A sequenciação foi realizada seguindo o protocolo GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing com Quick Start Kit para o sequenciador GenomeLab™ GExp, Sistema de Análise Genética (*Beckman Coulter, EUA*).

2.3. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada para analisar o efeito da variabilidade da sequência de polialaninas do gene *FOXE1* no cancro da tireoide esporádico. Também se avaliou este efeito em particular nos subtipos papilar e folicular de CT; nos microcarcinomas papilares comparativamente com PTCs de maiores dimensões; no sexo feminino; no sexo masculino; em indivíduos com idade inferior a 45 anos; em indivíduos com idade igual ou superior a 45 anos; e em função da presença de metástases ganglionares ou à distância. As percentagens genotípicas e alélicas em doentes e controlos foram feitas por contagem direta e avaliou-se se as frequências genotípicas se desviavam das esperadas de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para analisar os resultados obtidos utilizou-se o teste do qui-quadrado (χ^2), onde os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados

3.1. Genotipagem

As amostras de DNA dos doentes e dos controlos foram amplificadas por PCR com diferentes combinações de *primers*. Uma parte do volume do produto resultante da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose, cuja finalidade era despistar possíveis contaminações, ampliações inespecíficas e falhas na amplificação (Figura 7).

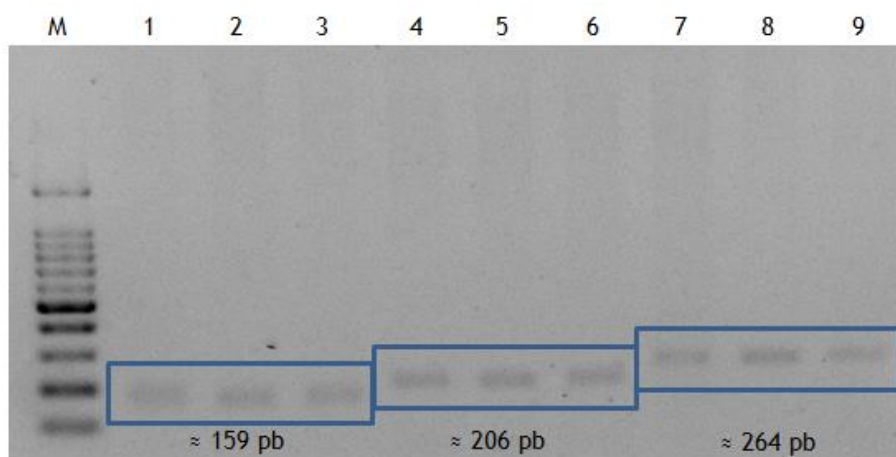


Figura 7 - Resultados da amplificação por PCR com diferentes combinações de *primers*, em gel de agarose a 1.5%. M - marcador de peso molecular; 1, 2 e 3 - produtos de PCR amplificados com o *primer reverse* 100 combinado com os *primers forward* marcados com D2, D3 e D4, respetivamente; 4, 5 e 6 - produtos de PCR amplificados com o *primer reverse* 200 combinado com os *primers forward* marcados com D2, D3 e D4, respetivamente; 7, 8 e 9 - produtos de PCR amplificados com o *primer reverse* 250 combinado com os *primers forward* marcados com D2, D3 e D4, respetivamente.

Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tireoide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1

A população em estudo foi genotipada por análise de fragmentos por eletroforese capilar. Efetuou-se a genotipagem de nove indivíduos por capilar em cada injeção. Os produtos da PCR foram previamente diluídos antes de serem colocados em formamida (Figura 8).

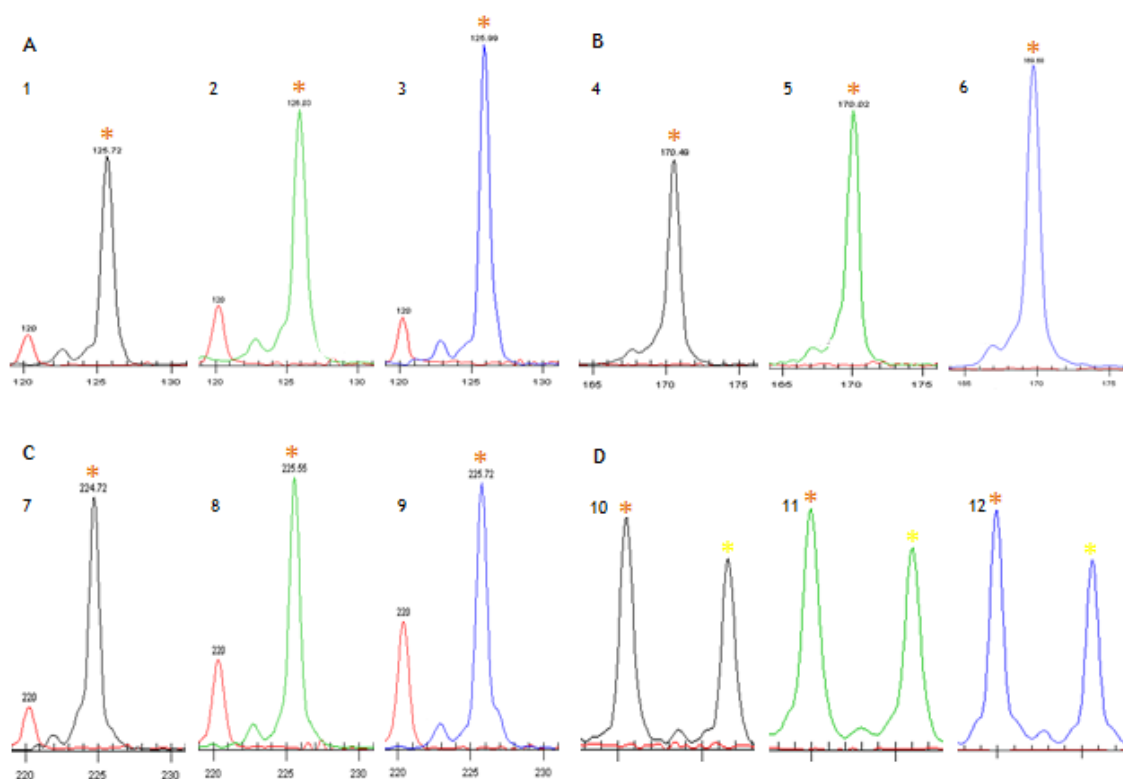


Figura 8 - Resultados da análise de fragmentos por eletroforese capilar. A: indivíduos cujos fragmentos 100 apresentam genótipos homozigóticos. B: indivíduos cujos fragmentos 200 apresentam genótipos homozigóticos. C: indivíduos cujos fragmentos 250 apresentam genótipos homozigóticos. D: exemplos de indivíduos que apresentam genótipos heterozigóticos. 1, 4, 7 e 10 - fragmentos marcados com o fluorocromo D2; 2, 5, 8 e 11 - fragmentos marcados com o fluorocromo D3; 3, 6, 9 e 12 - fragmentos marcados com o fluorocromo D4; a vermelho está representado o marcador; os símbolos a laranja representam 14 alaninas e os símbolos a amarelo representam 16 alaninas.

Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tireoide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1

Os indivíduos cujo genótipo deixou dúvidas pelo método anterior foram de novo sujeitos à PCR com o *primer forward* sem marcação com fluorocromo e o *primer reverse* 300. Realizou-se a análise *heteroduplex* que permitiu agrupar os genótipos dos diversos indivíduos por padrões de migração. Além disso, compararam-se estes resultados com padrões de migração de genótipos conhecidos, o que permitiu esclarecer alguns dos genótipos duvidosos (Figura 9).

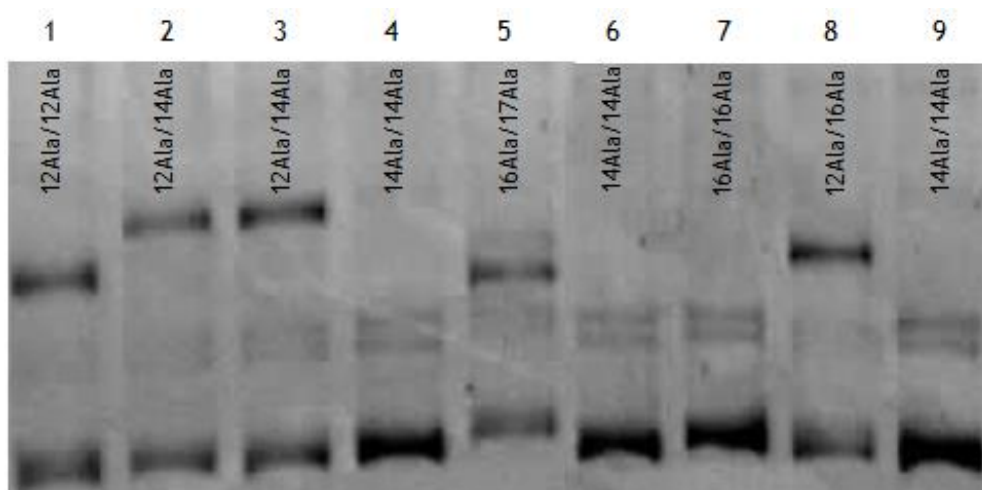


Figura 9 - Resultados da análise *heteroduplex*. Eletroforese dos produtos da PCR em gel de poliacrilamida 8%. 1, 2, 3, 5 e 8 - indivíduos com genótipos heterozigóticos; 4, 6, 7 e 9 - indivíduos com genótipos homozigóticos.

Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tireoide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1

Como modo de confirmação de alguns genótipos efetuou-se a sequenciação de alguns indivíduos. Metade do volume do produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1.5% e o restante foi sequenciado somente com o *primer forward* (Figura 10).

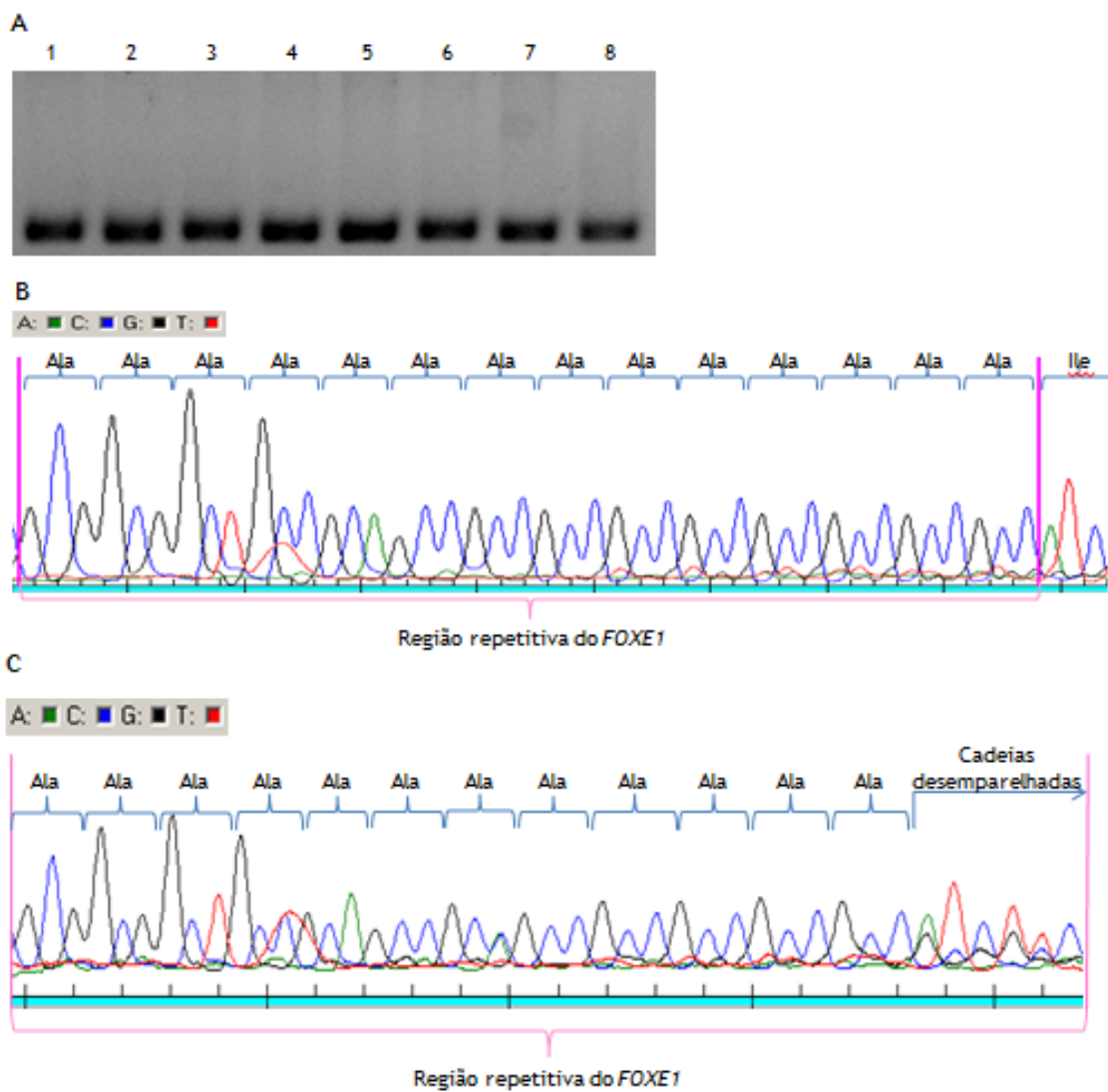


Figura 10 - Resultados da sequenciação de DNA. A - Eletroforese dos produtos da PCR para sequenciar (1 a 8) em gel de agarose a 1.5%. B - Parte da sequenciação de um indivíduo homocigótico com genótipo 14Ala/14Ala. C - Parte da sequenciação de um indivíduo heterocigótico com genótipo 12Ala/14Ala.

3.2. Análise estatística

As frequências genóticas dos doentes e dos controlos não se desviaram das esperadas, de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, já que os valores de p obtidos foram 0.4386 e 0.3077, respetivamente.

A comparação entre amostras foi efetuada pelo teste do qui-quadrado, onde os valores de p inferiores a 0.05 sugerem diferenças estatisticamente significativas. Analisando a Tabela 3, verifica-se que os dois valores de p são inferiores a 0.05 o que indica a existência de diferenças significativas nas prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes com carcinoma da tiroide bem diferenciado, na variante esporádica.

Nas Tabelas 4 e 5 observa-se que as diferenças nas prevalências dos genótipos e alelos na população masculina dos controlos e dos doentes são mais notórias do que na população feminina.

Nas Tabelas 6 e 7 pode observar-se que existem diferenças significativas nas prevalências dos genótipos e alelos dos controlos em relação aos doentes com PTC. O mesmo não é observado no subtipo folicular, onde os valores de p são muito superiores a 0.05.

Na Tabela 8, os dois valores de p são inferiores a 0.05 indicando que há diferenças nas prevalências dos genótipos e alelos nos carcinomas papilares consoante o seu tamanho.

Analisando as Tabelas 9 e 10 pode observar-se que há diferenças significativas nas prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes com carcinoma da tiroide esporádico em todas as faixas etárias, sendo mais notórias na população com idade igual ou superior a 45 anos.

Na Tabela 11, os dois valores de p são muito superiores a 0.05 indicando que não há diferenças significativas nas prevalências dos genótipos e alelos em função da presença de metástases ganglionares ou à distância.

Tabela 3 - Comparação das prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes.

	Controlos, n (%)	Doentes, n (%)	Valor de p
Genótipos	n=502	n=500	
12Ala/12Ala	0 (0)	1 (0.20)	0.0012
12Ala/14Ala	11 (2.19)	15 (3.00)	
12Ala/16Ala	2 (0.40)	11 (2.20)	
12Ala/17Ala	1 (0.20)	0 (0)	
14Ala/14Ala	217 (43.2)	167 (33.4)	
14Ala/16Ala	207 (41.2)	201 (40.2)	
14Ala/17Ala	14 (2.79)	21 (4.20)	
14Ala/18Ala	0 (0)	1 (0.20)	
16Ala/16Ala	42 (8.37)	69 (13.8)	
16Ala/17Ala	8 (1.59)	13 (2.60)	
17Ala/17Ala	0 (0)	1 (0.20)	
Alelos	n=1004	n=1000	
12Ala	14 (1.39)	28 (2.80)	0.0001
14Ala	666 (66.3)	572 (57.2)	
16Ala	301 (30.0)	363 (36.3)	
17Ala	23 (2.29)	36 (3.60)	
18Ala	0 (0)	1 (0.10)	

Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tireoide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1

Tabela 4 - Comparação das prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes do sexo feminino.

	Controlos do sexo feminino, n (%)	Doentes do sexo feminino, n (%)	Valor de p
Genótipos	n=372	n=411	
12Ala/12Ala	0 (0)	1 (0.24)	0.1262
12Ala/14Ala	10 (2.69)	13 (3.16)	
12Ala/16Ala	2 (0.54)	9 (2.19)	
12Ala/17Ala	1 (0.29)	0 (0)	
14Ala/14Ala	153 (41.1)	139 (33.8)	
14Ala/16Ala	153 (41.1)	165 (40.1)	
14Ala/17Ala	11 (2.96)	18 (4.38)	
14Ala/18Ala	0 (0)	1 (0.24)	
16Ala/16Ala	34 (9.14)	52 (12.7)	
16Ala/17Ala	8 (2.15)	12 (2.92)	
17Ala/17Ala	0 (0)	1 (0.24)	
Alelos	n=744	n=822	
12Ala	13 (1.75)	24 (2.92)	0.0255
14Ala	480 (64.5)	475 (57.8)	
16Ala	231 (31.0)	290 (35.3)	
17Ala	20 (2.69)	32 (3.89)	
18Ala	0 (0)	1 (0.12)	

Tabela 5 - Comparação das prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes do sexo masculino.

	Controlos do sexo masculino, n (%)	Doentes do sexo masculino, n (%)	Valor de p
Genótipos	n=130	n=89	
12Ala/12Ala	0 (0)	0 (0)	0.0086
12Ala/14Ala	1 (0.77)	2 (2.25)	
12Ala/16Ala	0 (0)	2 (2.25)	
12Ala/17Ala	0 (0)	0 (0)	
14Ala/14Ala	64 (49.2)	28 (31.5)	
14Ala/16Ala	54 (41.5)	36 (40.4)	
14Ala/17Ala	3 (2.31)	3 (3.37)	
14Ala/18Ala	0 (0)	0 (0)	
16Ala/16Ala	8 (6.15)	17 (19.1)	
16Ala/17Ala	0 (0)	1 (1.12)	
17Ala/17Ala	0 (0)	0 (0)	
Alelos	n=260	n=178	
12Ala	1 (0.38)	4 (2.25)	0.0017
14Ala	186 (71.5)	97 (54.5)	
16Ala	70 (26.9)	73 (41.0)	
17Ala	3 (1.15)	4 (2.25)	
18Ala	0 (0)	0 (0)	

Tabela 6 - Comparação das prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes com carcinoma papilar da tireoide.

	Controlos, n (%)	Doentes com PTC, n (%)	Valor de p	
Genótipos	n=502	n=436		
12Ala/12Ala	0 (0)	1 (0.23)	0.0001	
12Ala/14Ala	11 (2.19)	14 (3.21)		
12Ala/16Ala	2 (0.40)	10 (2.29)		
12Ala/17Ala	1 (0.20)	0 (0)		
14Ala/14Ala	217 (43.2)	147 (33.7)		
14Ala/16Ala	207 (41.2)	169 (38.7)		
14Ala/17Ala	14 (2.79)	18 (4.12)		
14Ala/18Ala	0 (0)	1 (0.23)		
16Ala/16Ala	42 (8.37)	63 (14.4)		
16Ala/17Ala	8 (1.59)	12 (2.75)		
17Ala/17Ala	0 (0)	1 (0.23)		
Alelos	n=1004	n=872		
12Ala	14 (1.39)	26 (2.98)		0.0001
14Ala	666 (66.3)	496 (56.9)		
16Ala	301 (30.0)	317 (36.4)		
17Ala	23 (2.29)	32 (3.67)		
18Ala	0 (0)	1 (0.11)		

Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tireoide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1

Tabela 7 - Comparação das prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes com carcinoma folicular da tireoide.

	Controlos, n (%)	Doentes com FTC, n (%)	Valor de p
Genótipos	n=502	n=60	
12Ala/12Ala	0 (0)	0 (0)	0.5933
12Ala/14Ala	11 (2.19)	0 (0)	
12Ala/16Ala	2 (0.40)	1 (1.67)	
12Ala/17Ala	1 (0.20)	0 (0)	
14Ala/14Ala	217 (43.2)	20 (33.3)	
14Ala/16Ala	207 (41.2)	30 (50.0)	
14Ala/17Ala	14 (2.79)	2 (3.33)	
14Ala/18Ala	0 (0)	0 (0)	
16Ala/16Ala	42 (8.37)	6 (10.0)	
16Ala/17Ala	8 (1.59)	1 (1.67)	
17Ala/17Ala	0 (0)	0 (0)	
Alelos	n=1004	n=120	
12Ala	14 (1.39)	1 (0.83)	0.4772
14Ala	666 (66.3)	72 (60.0)	
16Ala	301 (30.0)	44 (36.7)	
17Ala	23 (2.29)	3 (2.50)	
18Ala	0 (0)	0 (0)	

Tabela 8 - Comparação das prevalências dos genótipos e alelos entre microcarcinomas papilares e carcinomas papilares maiores que um centímetro.

	Microcarcinoma papilar, n (%)	Carcinomas papilares maiores, n (%)	Valor de p	
Genótipos	n=90	n=346		
12Ala/12Ala	0 (0)	1 (0.29)	0.0296	
12Ala/14Ala	0 (0)	14 (4.05)		
12Ala/16Ala	2 (2.22)	8 (2.31)		
12Ala/17Ala	0 (0)	0 (0)		
14Ala/14Ala	42 (46.7)	105 (30.3)		
14Ala/16Ala	28 (31.1)	141 (40.8)		
14Ala/17Ala	4 (4.44)	14 (4.05)		
14Ala/18Ala	1 (1.11)	0 (0)		
16Ala/16Ala	9 (10.0)	54 (15.6)		
16Ala/17Ala	4 (4.44)	8 (2.31)		
17Ala/17Ala	0 (0)	1 (0.29)		
Alelos	n=180	n=692		
12Ala	2 (1.11)	24 (3.47)		0.0218
14Ala	117 (65.0)	379 (54.8)		
16Ala	52 (28.9)	265 (38.3)		
17Ala	8 (4.44)	24 (3.47)		
18Ala	1 (0.56)	0 (0)		

Tabela 9 - Comparação das prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes com carcinoma da tiroide com idade inferior a 45 anos.

	Controlos com idade < 45 anos, n (%)	Doentes com idade < 45 anos, n (%)	Valor de p
Genótipos	n=342	n=228	
12Ala/12Ala	0 (0)	0 (0)	0.0825
12Ala/14Ala	9 (2.63)	7 (3.07)	
12Ala/16Ala	1 (0.29)	6 (2.63)	
12Ala/17Ala	1 (0.29)	0 (0)	
14Ala/14Ala	135 (39.5)	69 (30.3)	
14Ala/16Ala	145 (42.4)	97 (42.5)	
14Ala/17Ala	10 (2.92)	11 (4.82)	
14Ala/18Ala	0 (0)	1 (0.44)	
16Ala/16Ala	35 (10.2)	31 (13.6)	
16Ala/17Ala	6 (1.75)	5 (2.19)	
17Ala/17Ala	0 (0)	1 (0.44)	
Alelos	n=684	n=456	
12Ala	11 (1.61)	13 (2.85)	0.0289
14Ala	434 (63.5)	254 (55.7)	
16Ala	222 (32.5)	170 (37.3)	
17Ala	17 (2.49)	18 (3.95)	
18Ala	0 (0)	1 (0.22)	

Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tireoide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1

Tabela 10 - Comparação das prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes com carcinoma da tireoide com idade igual ou superior a 45 anos.

	Controlos com idade ≥ 45 anos, n (%)	Doentes com idade ≥ 45 anos, n (%)	Valor de p
Genótipos	n=160	n=272	
12Ala/12Ala	0 (0)	1 (0.37)	0.0024
12Ala/14Ala	2 (1.25)	8 (2.94)	
12Ala/16Ala	1 (0.63)	5 (1.84)	
12Ala/17Ala	0 (0)	0 (0)	
14Ala/14Ala	82 (51.3)	98 (36.0)	
14Ala/16Ala	62 (38.8)	104 (38.2)	
14Ala/17Ala	4 (2.50)	10 (3.68)	
14Ala/18Ala	0 (0)	0 (0)	
16Ala/16Ala	7 (4.38)	38 (14.0)	
16Ala/17Ala	1 (0.63)	8 (2.94)	
17Ala/17Ala	0 (0)	0 (0)	
Alelos	n=320	n=544	
12Ala	3 (0.94)	15 (2.76)	0.0004
14Ala	232 (72.5)	318 (58.5)	
16Ala	79 (24.7)	193 (35.5)	
17Ala	6 (1.88)	18 (3.31)	
18Ala	0 (0)	0 (0)	

Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tireoide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1

Tabela 11 - Comparação das prevalências dos genótipos e alelos entre doentes com metástases ganglionares ou à distância e doentes sem metástases.

	Doentes com metástases, n (%)	Doentes sem metástases, n (%)	Valor de p	
Genótipos	n=106	n=390		
12Ala/12Ala	0 (0)	1 (0.26)	0.4799	
12Ala/14Ala	2 (1.89)	12 (3.08)		
12Ala/16Ala	3 (2.83)	8 (2.05)		
12Ala/17Ala	0 (0)	0 (0)		
14Ala/14Ala	27 (25.5)	140 (35.9)		
14Ala/16Ala	47 (44.3)	152 (39.0)		
14Ala/17Ala	5 (4.72)	15 (3.85)		
14Ala/18Ala	0 (0)	1 (0.26)		
16Ala/16Ala	18 (17.0)	51 (13.1)		
16Ala/17Ala	4 (3.77)	9 (2.31)		
17Ala/17Ala	0 (0)	1 (0.26)		
Alelos	n=212	n=780		
12Ala	5 (2.36)	22 (2.82)		0.1709
14Ala	108 (50.9)	460 (59.0)		
16Ala	90 (42.5)	271 (34.7)		
17Ala	9 (4.25)	26 (3.33)		
18Ala	0 (0)	1 (0.13)		

4. Discussão e conclusão

A complexidade na identificação da suscetibilidade genética para o carcinoma da tireoide deve-se à inexistência de estudos num grande número de indivíduos, à pouca abordagem da heterogeneidade dos subtipos de carcinomas da tireoide e à falta de estudos funcionais dos polimorfismos encontrados, que seriam importantes para compreender a biologia do cancro (23). No presente trabalho pretendeu-se clarificar o efeito da variabilidade da sequência de polialaninas do gene *FOXE1* sobre a suscetibilidade ao cancro da tireoide esporádico, especificamente nos subtipos PTC e FTC, na população portuguesa.

Têm sido propostos diferentes mecanismos para a ocorrência de inserções e/ou deleções da sequência de polialaninas, que incluem a derrapagem durante a replicação ou *crossing-over* desigual (59, 72). Algumas repetições de alaninas são simplesmente codificadas por tripletos GCG, que podem facilmente ser explicadas por uma derrapagem durante a replicação (72, 92-94). Ou seja, quando existe um loop provocado pela repetição de tripletos, a DNA polimerase pode fazer uma pausa na replicação possibilitando a dissociação momentânea da nova cadeia com a cadeia molde. Posteriormente, as cadeias voltam a reassociar-se mas de uma forma desalinhada, o que gera a derrapagem. Se o deslize for para a frente ocorrerá eliminação de nucleótidos, se for para trás levará a sua inserção (92, 93).

Outras sequências de polialaninas são codificadas por tripletos diferentes que lhes conferem maior estabilidade e proteção de uma possível derrapagem durante a replicação. Nestes casos, o mecanismo de *crossing-over* desigual, defendido pela equipa de Brown, pode ser a causa da repetição dos tripletos (72).

A expansão das regiões homopoliméricas pode causar diversas patologias, uma vez que interferem na estrutura do DNA, na transcrição, na interação RNA-proteína e na conformação proteica (72, 95). Várias doenças tiroideias têm sido associadas com a região polyA do *FOXE1*. Landa et al (19), verificaram que o *FOXE1* age como um gene de baixa penetrância relacionado com CT, tendo um papel crucial no desenvolvimento e progressão do tumor, e alertaram para o seu papel emergente como potencial biomarcador (19). A sequência polyA do *FOXE1* já foi estudada para os subtipos PTC e FTC, na população japonesa, em certas populações europeias, incluindo num estudo que envolveu indivíduos portugueses, e recentemente na população cubana (24, 57, 59, 73, 89, 90). Concluíram que os genótipos mais frequentes eram 14 e 16 alaninas e que sequências repetitivas com 16 ou mais resíduos de alaninas podiam relacionar-se com a suscetibilidade ao PTC e FTC.

Os resultados deste trabalho são concordantes com estudos anteriores mostrando que, tanto em controlos como em doentes caucasianos portugueses, os alelos 14 (66.3% e 57.2%, respetivamente) e 16 (30.0% e 36.3%, respetivamente) são os mais frequentes. Os genótipos 14Ala/14Ala (43.2% e 33.4%, respetivamente) e 14Ala/16Ala (41.2% e 40.2%, respetivamente)

são os mais frequentemente encontrados na população portuguesa, seguidos do 16Ala/16Ala (8.4% e 13.8%, respetivamente). Analisando a Tabela 3 é possível afirmar que sequências de polialaninas do FOXE1 que tenham 16 ou mais resíduos são encontradas com maior frequência em doentes com carcinomas da tireoide bem diferenciados, na variante esporádica.

Além disto, quisemos avaliar a associação do efeito da variabilidade desta região repetitiva nos subtipos PTC e FTC; nos microcarcinomas papilares e carcinomas papilares com maiores dimensões; no sexo feminino; no sexo masculino; em indivíduos com idade inferior a 45 anos; em indivíduos com idade igual ou superior a 45 anos; e em função da presença de metástases ganglionares ou à distância.

Detetamos diferenças significativas nas prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes com carcinoma da tireoide ($p=0.0012$ e $p=0.0001$, respetivamente). Verificamos ainda, que as diferenças nas prevalências dos genótipos e alelos na população masculina ($p=0.0086$ e $p=0.0017$, respetivamente) dos controlos e dos doentes são mais notórias do que na população feminina ($p=0.1262$ e $p=0.0255$, respetivamente), o que não foi verificado pela equipa de Kallel (57) na população espanhola. Contudo, sabe-se que o ambiente hormonal influencia o tamanho e aparência da glândula tiroideia (9), o que também poderá ser a causa para estas diferenças observadas entre sexos. Houve também diferenças significativas nas prevalências dos genótipos e alelos entre controlos e doentes com carcinoma da tireoide em todas as faixas etárias, sendo mais notórias na população com idade igual ou superior a 45 anos ($p=0.0024$ e $p=0.0004$, respetivamente). Esta divisão etária foi efetuada uma vez que o limite dos 45 anos é usado para o estadiamento clínico dos tumores (96), porém a razão das diferenças encontradas consoante a faixa etária ainda não está bem estabelecida na literatura e carece de melhor clarificação. Contudo, atendendo às diferenças nas prevalências dos genótipos e alelos relatadas anteriormente pode-se especular sobre um possível efeito protetor do ambiente hormonal feminino, sobretudo em idade fértil, perante a variabilidade da região repetitiva de alaninas do FOXE1.

Observamos diferenças significativas nas prevalências dos genótipos e alelos dos controlos em relação aos doentes com PTC ($p=0.0001$ e $p=0.0001$, respetivamente), o que não se verifica no subtipo folicular onde os valores de p são muito superiores a 0.05 ($p=0.5933$ e $p=0.4772$, respetivamente). Estes resultados têm sido encontrados também em populações australianas e europeias (57, 73), e alguns autores justificam esta associação com o PTC devido a modificações funcionais no FOXE1 que alteram a sua afinidade para os genes alvo (73). Além disto, os mecanismos genéticos que conduzem aos dois subtipos de carcinoma da tireoide são diferentes, o que pode justificar a associação da sequência repetitiva do FOXE1 com o PTC e não com o FTC. Paralelamente, encontramos diferenças nas prevalências dos genótipos e alelos nos carcinomas papilares consoante o seu tamanho ($p=0.0296$ e 0.0218 , respetivamente). Na literatura existe controvérsia na caracterização dos carcinomas papilares, referindo que parte dos que sejam inferiores a um centímetro podem ter um comportamento biológico e clínico mais benigno, em comparação com os de maiores dimensões (97, 98). Estes

Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tireoide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1

dados suportam os resultados obtidos neste estudo, onde se verificaram diferenças nas prevalências dos genótipos e alelos nos carcinomas papilares consoante o seu tamanho.

Em contrapartida, não se verificaram diferenças nas prevalências dos genótipos e alelos em função da presença de metástases ganglionares ou à distância ($p=0.4799$ e $p=0.1709$, respetivamente), o que pode indicar a ausência de uma associação entre o *FOXE1* e a capacidade invasiva destes tumores.

Assim, dado o número elevado de indivíduos estudados, podemos concluir que a variabilidade da sequência repetitiva do *FOXE1* está associada com o subtipo PTC na população portuguesa, podendo relacionar-se com indivíduos do sexo masculino e com a população numa faixa etária igual ou superior a 45 anos. Estes dados podem vir a ser uma importante ferramenta clínica já que, para além de serem úteis na compreensão dos mecanismos de carcinogénese da tireoide, sugerem um possível papel do *FOXE1* como biomarcador para carcinomas diferenciados da tireoide.

Alguns autores admitem que a perda de expressão nuclear de *FOXE1* pode estar associada à desdiferenciação celular observada nas células tumorais de CT (80). Contudo, a influência da variabilidade da sequência de polialaninas na atividade de *FOXE1* como fator de transcrição ainda é um pouco controversa. Alguns estudos sugerem que 11, 12 e 14 resíduos de alaninas não alteram a capacidade de ativar o *TG*, ao contrário do que acontece com sequências polyA maiores que 14 alaninas (61, 74). Ou seja, a variabilidade da região repetitiva de alaninas no *FOXE1* resulta em alterações conformacionais que podem modificar a interação deste fator de transcrição com os genes alvo. No entanto, outro estudo demonstrou um ligeiro deficit da transcrição de promotores responsivos a *FOXE1*, quando compararam o alelo 16 com o 14 (73). Os resultados deste estudo podem ser explicados pelo efeito da sequência repetitiva do *FOXE1* com 16 ou mais resíduos de alaninas na sua função como fator de transcrição, propiciando a tumorigénese na tireoide. Devido à falta de estudos funcionais neste trabalho, esta premissa tem de ser confirmada laboratorialmente e portanto sugerimos futuros estudos funcionais de *FOXE1* com diferentes comprimentos da região repetitiva, uma vez que podem ser úteis para clarificar a sua interferência na suscetibilidade ao cancro da tireoide.

5. Bibliografia

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
3. Moretti F, Farsetti A, Soddu S, Misiti S, Crescenzi M, Filetti S, et al. p53 re-expression inhibits proliferation and restores differentiation of human thyroid anaplastic carcinoma cells. *Oncogene*. 1997;14(6):729-40.
4. Berdasco M, Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell*. 2010;19(5):698-711.
5. Ramsden JD. Angiogenesis in the thyroid gland. *J Endocrinol*. 2000;166(3):475-80.
6. Venza I, Visalli M, Tripodo B, Lentini M, Teti D, Venza M. Investigation into FOXE1 genetic variations in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2010;162(3):681-3.
7. Parlato R, Rosica A, Rodriguez-Mallon A, Affuso A, Postiglione MP, Arra C, et al. An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis. *Dev Biol*. 2004;276(2):464-75.
8. Fagman H, Nilsson M. Morphogenetics of early thyroid development. *J Mol Endocrinol*. 2011;46(1):R33-42.
9. Muro-Cacho CA, Ku NN. Tumors of the thyroid gland: histologic and cytologic features--part 1. *Cancer Control*. 2000;7(3):276-87.
10. Fernandez LP, Lopez-Marquez A, Martinez AM, Gomez-Lopez G, Santisteban P. New insights into FoxE1 functions: identification of direct FoxE1 targets in thyroid cells. *PLoS One*. 2013;8(5):e62849.
11. Civitareale D, Lonigro R, Sinclair AJ, Di Lauro R. A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter. *EMBO J*. 1989;8(9):2537-42.
12. Nitsch R, Di Dato V, di Gennaro A, de Cristofaro T, Abbondante S, De Felice M, et al. Comparative genomics reveals a functional thyroid-specific element in the far upstream region of the PAX8 gene. *BMC Genomics*. 2010;11:306.
13. Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):292-306.
14. Ortiz L, Zannini M, Di Lauro R, Santisteban P. Transcriptional control of the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 by thyrotropin, insulin, and insulin-like growth factor I. *J Biol Chem*. 1997;272(37):23334-9.
15. Macchia PE, Mattei MG, Lapi P, Fenzi G, Di Lauro R. Cloning, chromosomal localization and identification of polymorphisms in the human thyroid transcription factor 2 gene (TTF2). *Biochimie*. 1999;81(5):433-40.
16. Thomas PQ, Brown A, Beddington RS. Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development*. 1998;125(1):85-94.
17. Cuesta I, Zaret KS, Santisteban P. The forkhead factor FoxE1 binds to the thyroperoxidase promoter during thyroid cell differentiation and modifies compacted chromatin structure. *Mol Cell Biol*. 2007;27(20):7302-14.
18. Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Jonasson JG, Sigurdsson A, Bergthorsson JT, et al. Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations. *Nat Genet*. 2009;41(4):460-4.
19. Landa I, Ruiz-Llorente S, Montero-Conde C, Inglada-Perez L, Schiavi F, Leskela S, et al. The variant rs1867277 in FOXE1 gene confers thyroid cancer susceptibility through the recruitment of USF1/USF2 transcription factors. *PLoS Genet*. 2009;5(9):e1000637.
20. Trovisco V, Soares P, Preto A, Castro P, Maximo V, Sobrinho-Simoes M. Molecular genetics of papillary thyroid carcinoma: great expectations. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007;51(5):643-53.

21. Bychkov A, Saenko V, Nakashima M, Mitsutake N, Rogounovitch T, Nikitski A, et al. Patterns of FOXE1 expression in papillary thyroid carcinoma by immunohistochemistry. *Thyroid*. 2013;23(7):817-28.
22. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012;62(4):220-41.
23. Landa I, M. R. Association studies in thyroid cancer susceptibility: are we on the right track? *Journal of molecular endocrinology*. 2011;47(1):R43-58.
24. Tomaz RA, Sousa I, Silva JG, Santos C, Teixeira MR, Leite V, et al. FOXE1 polymorphisms are associated with familial and sporadic nonmedullary thyroid cancer susceptibility. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;77(6):926-33.
25. Cochand-Priollet B, Guillausseau PJ, Chagnon S, Hoang C, Guillausseau-Scholer C, Chanson P, et al. The diagnostic value of fine-needle aspiration biopsy under ultrasonography in nonfunctional thyroid nodules: a prospective study comparing cytologic and histologic findings. *Am J Med*. 1994;97(2):152-7.
26. Krohn K, Fuhrer D, Bayer Y, Eszlinger M, Brauer V, Neumann S, et al. Molecular pathogenesis of euthyroid and toxic multinodular goiter. *Endocr Rev*. 2005;26(4):504-24.
27. Sobrinho-Simoes M, Eloy C, Magalhaes J, Lobo C, Amaro T. Follicular thyroid carcinoma. *Mod Pathol*. 2011;24 Suppl 2:S10-8.
28. Fagin JA, Mitsiades N. Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008;22(6):955-69.
29. Bonora E, Tallini G, Romeo G. Genetic Predisposition to Familial Nonmedullary Thyroid Cancer: An Update of Molecular Findings and State-of-the-Art Studies. *J Oncol*. 2010;2010:385206.
30. Tielens ET, Sherman SI, Hruban RH, Ladenson PW. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma. A clinicopathologic study. *Cancer*. 1994;73(2):424-31.
31. Kebebew E, Greenspan FS, Clark OH, Woeber KA, McMillan A. Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors. *Cancer*. 2005;103(7):1330-5.
32. Takashima S, Morimoto S, Ikezoe J, Takai S, Kobayashi T, Koyama H, et al. CT evaluation of anaplastic thyroid carcinoma. *AJR American journal of roentgenology*. 1990;154(5):1079-85.
33. Soares P, Lima J, Preto A, Castro P, Vinagre J, Celestino R, et al. Genetic alterations in poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas. *Curr Genomics*. 2011;12(8):609-17.
34. Catalano MG, Fortunati N, Boccuzzi G. Epigenetics modifications and therapeutic prospects in human thyroid cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:40.
35. Martins TD, Carrilho, F., Leitão, P., Lemos, M.C., Campos, M.V., Geraldês, E., Carvalheiro, M. Carcinoma Anaplásico da Tireoide - Análise Retrospectiva de 12 Casos. *Acta Médica Portuguesa* 2004. 2003;17:349-52.
36. Sastre-Perona A, Santisteban P. Role of the wnt pathway in thyroid cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:31.
37. Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(5):367-75.
38. Dvorakova S, Vaclavikova E, Sykorova V, Vcelak J, Novak Z, Duskova J, et al. Somatic mutations in the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinomas. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;284(1-2):21-7.
39. Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Leite V. High prevalence of RAS mutations in RET-negative sporadic medullary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(5):E863-8.
40. Schneider AB, Sarne DH. Long-term risks for thyroid cancer and other neoplasms after exposure to radiation. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2005;1(2):82-91.
41. Matsuse M, Takahashi M, Mitsutake N, Nishihara E, Hirokawa M, Kawaguchi T, et al. The FOXE1 and NKX2-1 loci are associated with susceptibility to papillary thyroid carcinoma in the Japanese population. *J Med Genet*. 2011;48(9):645-8.
42. Lemos MC, Carrilho F, Rodrigues F, Coutinho E, Gomes L, Carvalheiro M, et al. Genetic polymorphism of CYP2D6 influences susceptibility to papillary thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;67(2):180-3.
43. Eng C. Familial papillary thyroid cancer--many syndromes, too many genes? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2000;85(5):1755-7.
44. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86(21):1600-8.

45. Brenner AV, Neta G, Sturgis EM, Pfeiffer RM, Hutchinson A, Yeager M, et al. Common single nucleotide polymorphisms in genes related to immune function and risk of papillary thyroid cancer. *PLoS One*. 2013;8(3):e57243.
46. Amundadottir LT, Thorvaldsson S, Gudbjartsson DF, Sulem P, Kristjansson K, Arnason S, et al. Cancer as a complex phenotype: pattern of cancer distribution within and beyond the nuclear family. *PLoS Med*. 2004;1(3):e65.
47. Hrafnkelsson J, Tulinius H, Jonasson JG, Sigvaldason H. Familial non-medullary thyroid cancer in Iceland. *J Med Genet*. 2001;38(3):189-91.
48. Zhu H, Xi Q, Liu L, Wang J, Gu M. Quantitative assessment of common genetic variants on FOXE1 and differentiated thyroid cancer risk. *PLoS One*. 2014;9(1):e87332.
49. Pacini F, Vorontsova T, Demidchik EP, Molinaro E, Agate L, Romei C, et al. Post-Chernobyl thyroid carcinoma in Belarus children and adolescents: comparison with naturally occurring thyroid carcinoma in Italy and France. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(11):3563-9.
50. Santos M, Azevedo T, Martins T, Rodrigues FJ, Lemos MC. Association of RET genetic polymorphisms and haplotypes with papillary thyroid carcinoma in the Portuguese population: a case-control study. *PLoS One*. 2014;9(10):e109822.
51. Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhaes J, Roque L, Trovisco V, et al. PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(1):213-20.
52. Denny JC, Crawford DC, Ritchie MD, Bielinski SJ, Basford MA, Bradford Y, et al. Variants near FOXE1 are associated with hypothyroidism and other thyroid conditions: using electronic medical records for genome- and phenome-wide studies. *Am J Hum Genet*. 2011;89(4):529-42.
53. Bongarzone I, Butti MG, Coronelli S, Borrello MG, Santoro M, Mondellini P, et al. Frequent activation of ret protooncogene by fusion with a new activating gene in papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res*. 1994;54(11):2979-85.
54. Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, et al. Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(8):3947-52.
55. Melo M, da Rocha AG, Vinagre J, Sobrinho-Simoes M, Soares P. Coexistence of TERT promoter and BRAF mutations in papillary thyroid carcinoma: added value in patient prognosis? *J Clin Oncol*. 2015;33(6):667-8.
56. Melo M, da Rocha AG, Vinagre J, Batista R, Peixoto J, Tavares C, et al. TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(5):E754-65.
57. Kallel R, Belguith-Maalej S, Akdi A, Mnif M, Charfeddine I, Galofre P, et al. Genetic investigation of FOXE1 polyalanine tract in thyroid diseases: new insight on the role of FOXE1 in thyroid carcinoma. *Cancer Biomark*. 2010;8(1):43-51.
58. Dathan N, Parlato R, Rosica A, De Felice M, R. DL. Distribution of the titf2/foxe1 gene product is consistent with an important role in the development of foregut endoderm, palate, and hair. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2002;224(4):450-6.
59. Watkins WJ, Harris SE, Craven MJ, Vincent AL, Winship IM, Gersak K, et al. An investigation into FOXE1 polyalanine tract length in premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod*. 2006;12(3):145-9.
60. Katoh M, Katoh M. Transcriptional mechanisms of WNT5A based on NF-kappaB, Hedgehog, TGFbeta, and Notch signaling cascades. *Int J Mol Med*. 2009;23(6):763-9.
61. Hishinuma A, Ohyama Y, Kuribayashi T, Nagakubo N, Namatame T, Shibayama K, et al. Polymorphism of the polyalanine tract of thyroid transcription factor-2 gene in patients with thyroid dysgenesis. *Eur J Endocrinol*. 2001;145(4):385-9.
62. Zannini M, Avantaggiato V, Biffali E, Arnone MI, Sato K, Pischetola M, et al. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *EMBO J*. 1997;16(11):3185-97.
63. Perrone L, Pasca di Magliano M, Zannini M, Di Lauro R. The thyroid transcription factor 2 (TTF-2) is a promoter-specific DNA-binding independent transcriptional repressor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;275(1):203-8.
64. Brancaccio A, Minichiello A, Grachtchouk M, Antonini D, Sheng H, Parlato R, et al. Requirement of the forkhead gene Foxe1, a target of sonic hedgehog signaling, in hair follicle morphogenesis. *Hum Mol Genet*. 2004;13(21):2595-606.

65. Hishinuma A, Ohmika N, Namatame T, Ieiri T. TTF-2 stimulates expression of 17 genes, including one novel thyroid-specific gene which might be involved in thyroid development. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;221(1-2):33-46.
66. Venza I, Visalli M, Parrillo L, De Felice M, Teti D, Venza M. MSX1 and TGF-beta3 are novel target genes functionally regulated by FOXE1. *Hum Mol Genet*. 2011;20(5):1016-25.
67. Eichberger T, Regl G, Ikram MS, Neill GW, Philpott MP, Aberger F, et al. FOXE1, a new transcriptional target of GLI2 is expressed in human epidermis and basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2004;122(5):1180-7.
68. Lidral AC, Liu H, Bullard SA, Bonde G, Machida J, Visel A, et al. A Single Nucleotide Polymorphism Associated with Isolated Cleft Lip and Palate, Thyroid Cancer and Hypothyroidism Alters the Activity of an Oral Epithelium and Thyroid Enhancer Near FOXE1. *Hum Mol Genet*. 2015.
69. Alba MM, Guigo R. Comparative analysis of amino acid repeats in rodents and humans. *Genome Res*. 2004;14(4):549-54.
70. Amiel J, Trochet D, Clement-Ziza M, Munnich A, Lyonnet S. Polyalanine expansions in human. *Hum Mol Genet*. 2004;13 Spec No 2:R235-43.
71. Forood B, Perez-Paya E, Houghten RA, Blondelle SE. Formation of an extremely stable polyalanine beta-sheet macromolecule. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;211(1):7-13.
72. Brown LY, Brown SA. Alanine tracts: the expanding story of human illness and trinucleotide repeats. *Trends Genet*. 2004;20(1):51-8.
73. Bullock M, Duncan EL, O'Neill C, Tacon L, Sywak M, Sidhu S, et al. Association of FOXE1 polyalanine repeat region with papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(9):E1814-9.
74. Carre A, Castanet M, Sura-Trueba S, Szinnai G, Van Vliet G, Trochet D, et al. Polymorphic length of FOXE1 alanine stretch: evidence for genetic susceptibility to thyroid dysgenesis. *Hum Genet*. 2007;122(5):467-76.
75. Messaed C, Rouleau GA. Molecular mechanisms underlying polyalanine diseases. *Neurobiol Dis*. 2009;34(3):397-405.
76. Lavoie H, Debeane F, Trinh QD, Turcotte JF, Corbeil-Girard LP, Dicaire MJ, et al. Polymorphism, shared functions and convergent evolution of genes with sequences coding for polyalanine domains. *Hum Mol Genet*. 2003;12(22):2967-79.
77. Chadwick BP, Obermayr F, Frischauf AM. FKHL15, a new human member of the forkhead gene family located on chromosome 9q22. *Genomics*. 1997;41(3):390-6.
78. Park SM, Chatterjee VK. Genetics of congenital hypothyroidism. *J Med Genet*. 2005;42(5):379-89.
79. Takahashi M, Saenko VA, Rogounovitch TI, Kawaguchi T, Drozd VM, Takigawa-Imamura H, et al. The FOXE1 locus is a major genetic determinant for radiation-related thyroid carcinoma in Chernobyl. *Hum Mol Genet*. 2010;19(12):2516-23.
80. Zhang P, Zuo H, Nakamura Y, Nakamura M, Wakasa T, Kakudo K. Immunohistochemical analysis of thyroid-specific transcription factors in thyroid tumors. *Pathol Int*. 2006;56(5):240-5.
81. Penna-Martinez M, Epp F, Kahles H, Ramos-Lopez E, Hinsch N, Hansmann ML, et al. FOXE1 association with differentiated thyroid cancer and its progression. *Thyroid*. 2014;24(5):845-51.
82. Qin CR, Yao JL, Zhu WJ, Wu WQ, Xie JS. FOXE1 polyalanine tract length screening by MLPA in idiopathic premature ovarian failure. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:158.
83. Moreno LM, Mansilla MA, Bullard SA, Cooper ME, Busch TD, Machida J, et al. FOXE1 association with both isolated cleft lip with or without cleft palate, and isolated cleft palate. *Hum Mol Genet*. 2009;18(24):4879-96.
84. Qin C, Yao J, Yuan Z, Ren X, Xie J, Wu W. [Association of FOXE1 gene polymorphism with idiopathic premature ovarian failure]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2015;50(2):116-9.
85. Castanet M, Park SM, Smith A, Bost M, Leger J, Lyonnet S, et al. A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. *Hum Mol Genet*. 2002;11(17):2051-9.
86. Mahjoubi F. HM, Moshiri F., Iranpour R., Amini M., Hovsepian S., Ghasemi M. Genetic analysis of TTF2 gene in congenital hypothyroid infants with thyroid dysgenesis. *Pak J Med Sci* 2013 29 (1):325-8.
87. Santarpia L, Valenzise M, Di Pasquale G, Arrigo T, San Martino G, Ciccio MP, et al. TTF-2/FOXE1 gene polymorphisms in Sicilian patients with permanent primary congenital hypothyroidism. *J Endocrinol Invest*. 2007;30(1):13-9.

88. Szczepanek E, Ruchala M, Szaflarski W, Budny B, Kilinska L, Jaroniec M, et al. FOXE1 polyalanine tract length polymorphism in patients with thyroid hemiagenesis and subjects with normal thyroid. *Horm Res Paediatr*. 2011;75(5):329-34.
89. Maillard S, Damiola F, Clero E, Pertesi M, Robinot N, Rachedi F, et al. Common Variants at 9q22.33, 14q13.3, and ATM Loci, and Risk of Differentiated Thyroid Cancer in the French Polynesian Population. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123700.
90. Pereda CM, Lesueur F, Pertesi M, Robinot N, Lence-Anta JJ, Turcios S, et al. Common variants at the 9q22.33, 14q13.3 and ATM loci, and risk of differentiated thyroid cancer in the Cuban population. *BMC Genet*. 2015;16:22.
91. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
92. Chen JM, Chuzhanova N, Stenson PD, Ferec C, Cooper DN. Meta-analysis of gross insertions causing human genetic disease: novel mutational mechanisms and the role of replication slippage. *Hum Mutat*. 2005;25(2):207-21.
93. Nag DK. Trinucleotide repeat expansions: timing is everything. *Trends Mol Med*. 2003;9(11):455-7.
94. Green H, Wang N. Codon reiteration and the evolution of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(10):4298-302.
95. Cummings CJ, Zoghbi HY. Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum Mol Genet*. 2000;9(6):909-16.
96. Hermanek LH, Sobin LH, editors. International Union Against Cancer. TNM classification of malignant tumors. 1989;4th ed. Berlin:Springer.
97. Kim E, Choi JY, Koo do H, Lee KE, Youn YK. Differences in the characteristics of papillary thyroid microcarcinoma ≤ 5 mm and >5 mm in diameter. *Head & neck*. 2015;37(5):694-7.
98. Wu LS, Milan SA. Management of microcarcinomas (papillary and medullary) of the thyroid. *Current opinion in oncology*. 2013;25(1):27-32.

6. Anexos (autorizações de utilização de figuras e tabelas)

Anexo 1 - Licença de utilização da figura 1

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

May 14, 2015

This is a License Agreement between Joana Raimundo ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Joana Raimundo
Customer address	Rua da Fonte Covilhã, 6230-040
License number	3627810401174
License date	May 14, 2015
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Cell
Licensed content title	Hallmarks of Cancer: The Next Generation
Licensed content author	Douglas Hanahan, Robert A. Weinberg
Licensed content date	4 March 2011
Licensed content volume number	144
Licensed content issue number	5
Number of pages	29
Start Page	646
End Page	674

Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tiroide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1

Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	2
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguesa
Original figure numbers	1.3
Title of your thesis/dissertation	Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tiroide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1
Expected completion date	Jul 2015
Estimated size (number of pages)	70
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 EUR
VAT/Local Sales Tax	0.00 EUR / 0.00 GBP
Total	0.00 EUR

Anexo 2 - Licença de utilização da figura 2 e tabela 1

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 14, 2015

This is a License Agreement between Joana Raimundo ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3627821383029
License date	May 14, 2015
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Cancer
Licensed content title	Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia
Licensed content author	Tetsuo Kondo, Shereen Ezzat and Sylvia L. Asa
Licensed content date	Apr 1, 2006
Volume number	6
Issue number	4
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	non-commercial (non-profit)
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	2
High-res required	No
Figures	Figure 1 Table 1
Author of this NPG article	No
Your reference number	None
Title of your thesis / dissertation	Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tiroide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1
Expected completion date	Jul 2015
Estimated size (number of pages)	70
Total	0.00 EUR

Anexo 3 - Licença de utilização da figura 3

Title: The Forkhead Factor FoxE1 Binds to the Thyroperoxidase Promoter during Thyroid Cell Differentiation and Modifies Compacted Chromatin Structure

Author: Isabel Cuesta, Kenneth S. Zaret, Pilar Santisteban et al.

Publication: Molecular and Cellular Biology

Publisher: American Society for Microbiology

Date: Oct 15, 2007

Permissions Request

ASM authorizes an advanced degree candidate to republish the requested material in his/her doctoral thesis or dissertation. If your thesis, or dissertation, is to be published commercially, then you must reapply for permission.

Anexo 4 - Licença de utilização da figura 4

Keywords: Wnt pathway, signaling network, thyroid cancer, proliferation, differentiation

Citation: Sastre-Perona A and Santisteban P (2012) Role of the Wnt pathway in thyroid cancer. *Front. Endocrin.* 3:31. doi: 10.3389/fendo.2012.00031

Received: 01 December 2011; **Accepted:** 09 February 2012;

Published online: 29 February 2012.

Edited by:

Carmelo Nucera, Beth Israel Deaconess Medical Center/Harvard Medical School, USA

Reviewed by:

Ettore Ciro Degli Uberti, University of Ferrara, Italy

Roberta Malaguarnera, University “Magna Graecia” of Catanzaro, Italy

Marialuisa Appetecchia, Regina Elena National Cancer Institute IRCCS, Italy

Copyright: © 2012 Sastre-Perona and Santisteban. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited.

***Correspondence:** Pilar Santisteban, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y Universidad Autónoma de Madrid, C/Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain. e-mail: psantisteban@iib.uam.es

Anexo 5 - Licença de utilização da figura 5

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 14, 2015

This Agreement between Joana Raimundo ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	3627840534296
License date	May 14, 2015
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Clinical Endocrinology
Licensed Content Title	FOXE1 polymorphisms are associated with familial and sporadic nonmedullary thyroid cancer susceptibility
Licensed Content Author	Rute A. Tomaz, Inês Sousa, Joana G. Silva, Catarina Santos, Manuel R. Teixeira, Valeriano Leite, Branca M. Cavaco
Licensed Content Date	Nov 9, 2012
Pages	8
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 1
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	1
Languages	Português
Title of your thesis / dissertation	Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tiroide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1
Expected completion date	Jul 2015
Expected size (number of pages)	70
Requestor Location	Joana Raimundo Rua da Fonte Covilhã, Portugal 6230-040 Attn: Joana Raimundo
Billing Type	Invoice

Suscetibilidade Genética ao Cancro da Tiroide: efeito dos polimorfismos do gene FOXE1

Billing Address

Joana Raimundo
Rua da Fonte

Covilhã, Portugal 6230-040
Attn: Joana Raimundo

Total

0.00 EUR