



Vias de sinalização da MAPK e SHH modulam a expressão da desidase tipo 3 no carcinoma papilar de tireoide

Rafaela Vanin Pinto Ribeiro e Ana Luiza Silva Maia

SEÇÃO DE TIREÓIDE, SERVIÇO DE ENDOCRINOLOGIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE,
FACULDADE DE MEDICINA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL,
PORTO ALEGRE, BRASIL



INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide constitui 1% das neoplasias malignas humanas e, no Brasil, é o 4º câncer mais frequente entre as mulheres. O carcinoma papilar de tireoide (CPT) representa aproximadamente 85% das neoplasias malignas da glândula e geralmente apresenta um desfecho favorável, com uma taxa de sobrevida média de 90% em 10 anos. No entanto, cerca de 5-20% dos pacientes pode apresentar doença recorrente e 10%, metástases. O hormônio tireoideano é conhecido por regular uma extensa gama de processos fisiológicos; dentre eles, promove o balanço entre proliferação e diferenciação celular. A ativação do pró-hormônio T4 a T3 ocorre via ação das iodotironinas desidases tipo 1 (D1) e tipo 2 (D2); já a inativação do T4 e T3 é catalisada via ação da desidase tipo 3 (*DIO3*, D3). Estudos indicam um papel da expressão das desidases na patogênese de diversas neoplasias humanas, sendo que estudo recente do nosso grupo demonstrou uma indução na expressão da D3 no (CPT), que esteve diretamente associado com o tamanho tumoral, presença de metástases e mutação BRAFV600E.

OBJETIVO

Avaliar as vias de sinalização envolvidas na reativação da *DIO3* no CPT.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagens celulares humanas de CPT (células K1 e TPC-1) e amostras tumorais humanas foram utilizadas. A expressão (RNAm) e atividade da D3 foram avaliadas através de PCR em tempo real e cromatografia descendente em colunas iônicas, respectivamente. As vias de sinalização foram avaliadas utilizando inibidores específicos. Para a avaliação proteica dos níveis de D3, utilizamos o método de Western Blot. RNA de interferência (siRNA), contagem celular e citometria de fluxo foram utilizados para avaliar proliferação celular.

RESULTADOS

Aumento nos níveis de RNAm e atividade da D3 foram detectados nas células K1 (BRAFV600E) e, em níveis menores, nas TPC-1 (RET/PTC1) (~5 vezes, $p < 0.001$; 14.9 vs 8.1 fmol/mg.prot.24hs, $p = 0.02$; respectivamente) [figura 1]. A inibição específica de efetores da via da MAPK – MEK (U0126; 10-20 μ M) e p38 (SB203580; 10-20 μ M) – e do oncogene BRAF (PLX4032; 3 μ M), foi associada à diminuição na expressão de *DIO3* nas células K1 e TPC-1 [figuras 2 e 3, respectivamente].

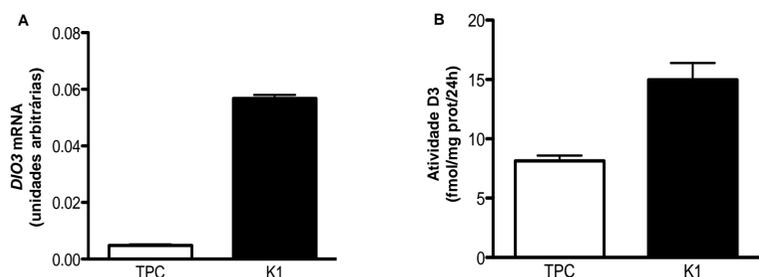


Figura 1: *DIO3* mRNA (A) e atividade da D3 (B) em células de CPT.

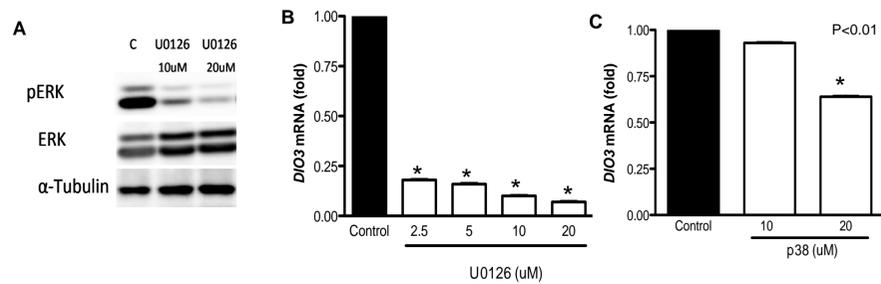


Figura 2: Expressão de *DIO3* ao inibir efetores da via da MAPK.

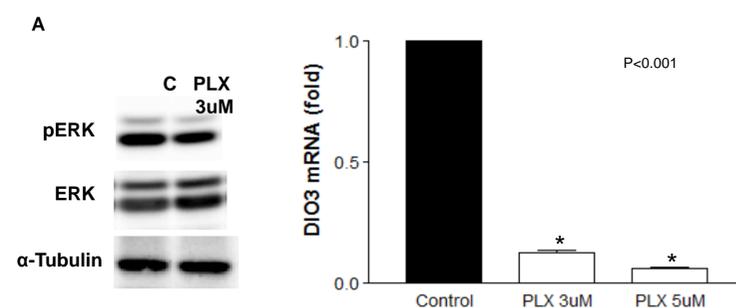


Figura 3: O tratamento com o inibidor específico de BRAF (PLX4032-5 μ M) em células K1.

Investigou-se também o efeito de alterações genéticas da via MAPK em 14 amostras CPT humanas. A idade média dos pacientes foi de $42,8 \pm 14,5$ anos, e 78,6% eram mulheres. O tamanho do tumor médio era de 2,3 cm (0.8-10); 10 pacientes (71,4%) tinham metástase linfática, enquanto seis (42,9%) tiveram metástases a distância no momento do diagnóstico. Sete (50%) das 14 amostras foram positivas para a mutação BRAF V600E, dois (10%) para RET/PTC1 e 5 (40%) eram negativos para essas alterações genéticas. Como demonstrado anteriormente em estudo do grupo (Romitti et al. 2012), os níveis de RNAm *DIO3* foram significativamente aumentados em amostras CPT em comparação com o tecido circundante normal da tireoide ($P < 0,001$). As amostras que possuem a mutação BRAFV600E exibiram níveis de expressão mais elevados da *DIO3* em comparação com as observadas em amostras com rearranjo RET/PTC1 ou negativo para ambos (8 vs 5,8 vs 5.4AU, respectivamente; $P < 0,001$).

Além disso, bloqueio da via Sonic Hedgehog (SHH) com ciclopamina (10 μ M) resultou em diminuição importante dos níveis de *DIO3* nas duas linhagens celulares [figura 4].

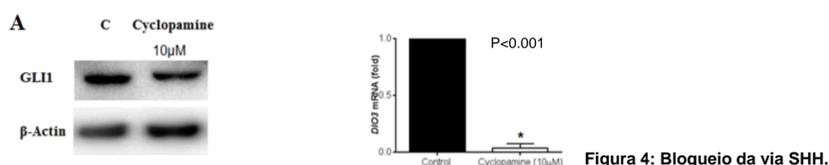


Figura 4: Bloqueio da via SHH.

Por último, o silenciamento gênico da *DIO3* através de siRNA resultou na redução da expressão de ciclina-D1 (proteína importante na regulação do ciclo celular) e pausa parcial na fase G1 do ciclo celular, sugerindo, assim, regulação de proliferação celular.

CONCLUSÃO

A ativação das vias MAPK e SHH modulam os níveis de expressão da *DIO3* no CPT. O silenciamento da *DIO3* foi associado com diminuição na proliferação celular, sugerindo papel da D3 em crescimento e agressividade tumoral. Assim, a inibição dessas vias e consequente diminuição da desidase tipo 3 pode ser um potencial alvo terapêutico no carcinoma papilar de tireoide.