



Aumento da desiodase tipo 3 no Carcinoma Papilar de Tireoide está associado a alterações na via MAPK e aumento da proliferação celular



Rohenkohl HC, Maia AL

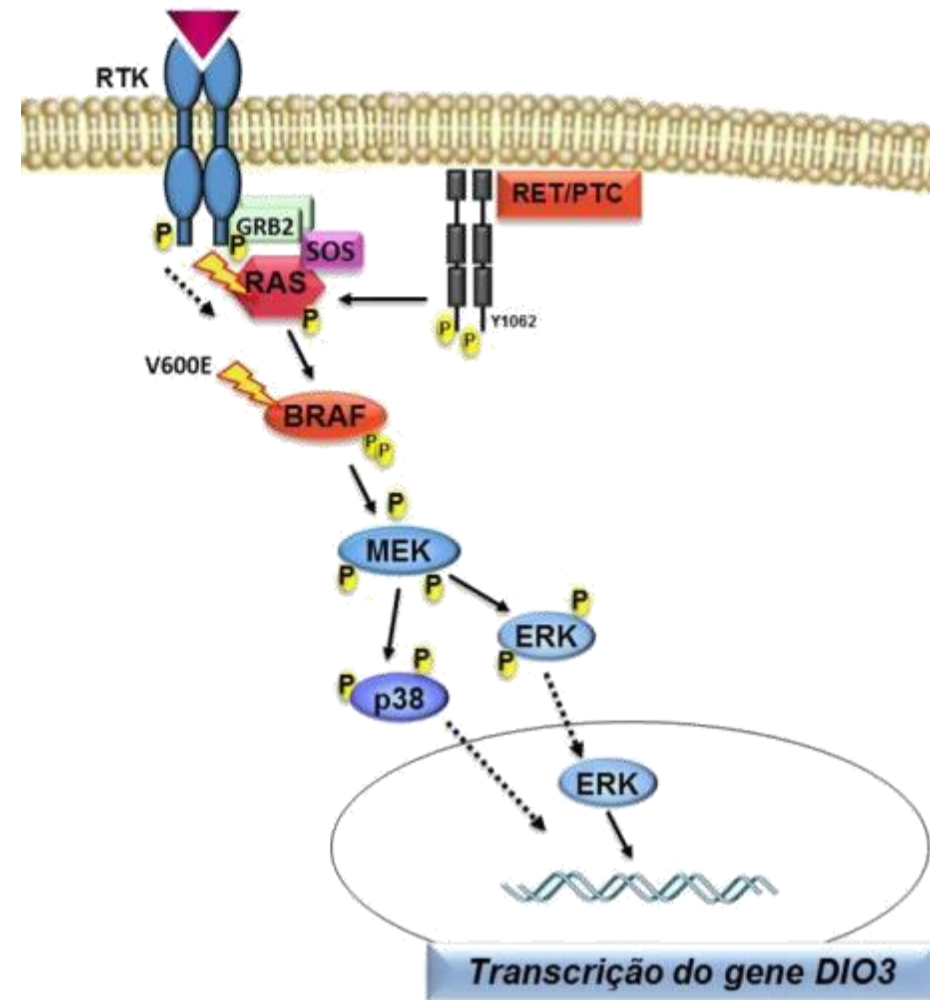
SEÇÃO DE TIREÓIDE, SERVIÇO DE ENDOCRINOLOGIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE,
FACULDADE DE MEDICINA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL,
PORTO ALEGRE, BRASIL

INTRODUÇÃO

O carcinoma papilar de tireoide (CPT) representa aproximadamente 85% das neoplasias malignas da glândula e na maioria dos casos o desfecho é favorável. No entanto, cerca de 5-20% dos pacientes pode apresentar doença recorrente e 10%, metástases.

Os hormônios tireoidianos participam de diversos processos biológicos, incluindo o balanço entre

a proliferação e diferenciação celular. A ativação do pró-hormônio T4 a T3 ocorre via ação das iodotironinas desiodases tipo 1 (D1) e tipo 2 (D2); já a inativação do T4 e T3 é catalisada via ação da desiodase tipo 3 (D3). Estudos indicam um papel da expressão das desiodases 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 do gene BRAFV600E. A ativação aberrante da via de sinalização MAPK devido a mutações ou rearranjos de genes é o evento genético mais comum no CPT e a mutação do BRAF está associada em até 50% dos casos de CPT.



OBJETIVO

Determinar os mecanismos moleculares envolvidos na indução da D3 no CPT

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizamos duas linhagens humanas de CPT, as células K1 que apresentam a mutação V600E no gene BRAF e as células TPC-1 as quais apresentam o rearranjo RET/PTC1. Inibidores e indutores específicos da via MAPK foram empregados. Silenciamento gênico (RNAi) foi utilizado para avaliar o efeito da D3 na proliferação celular. PCR em tempo real e Western Blotting foram utilizados para análise de expressão gênica e proteica. Citometria de fluxo foi utilizada para avaliação da proliferação.

RESULTADOS

Em nosso trabalho observamos que a D3 está induzida nas duas linhagens celulares estudadas, principalmente nas células K1 (BRAF)(FIGURA 1). A inibição do oncogene BRAF com bloqueador específico (PLX4032), reduziu os níveis da D3 ($p < 0.001$) e diminuiu a fosforilação de ERK, um dos principais efetores da via da MAPK (FIGURA 2). Posteriormente, nós utilizamos um inibidor específico de MEK que acarretou em uma redução da expressão de D3 quando utilizadas as doses de 10mM e 20mM do inibidor nas duas linhagens celulares. Essa redução também foi associada com diminuição na fosforilação da via da MAPK (FIGURA 3). Por fim incubamos as células com inibidor específico de P38 e observamos, da mesma maneira, redução nos níveis da D3 em ambas as células. Essa redução foi associada com diminuição da fosforilação da proteína de P38 (FIGURA 4).

Através do silenciamento gênico da D3 com RNAi avaliamos o efeito celular da indução da D3 sobre a proliferação celular. Nós observamos uma redução significativa no número total de células ($p < 0.001$) (FIGURA 5), bem como aumento de células na fase G1 do ciclo celular ($p < 0.005$) (FIGURA 6).

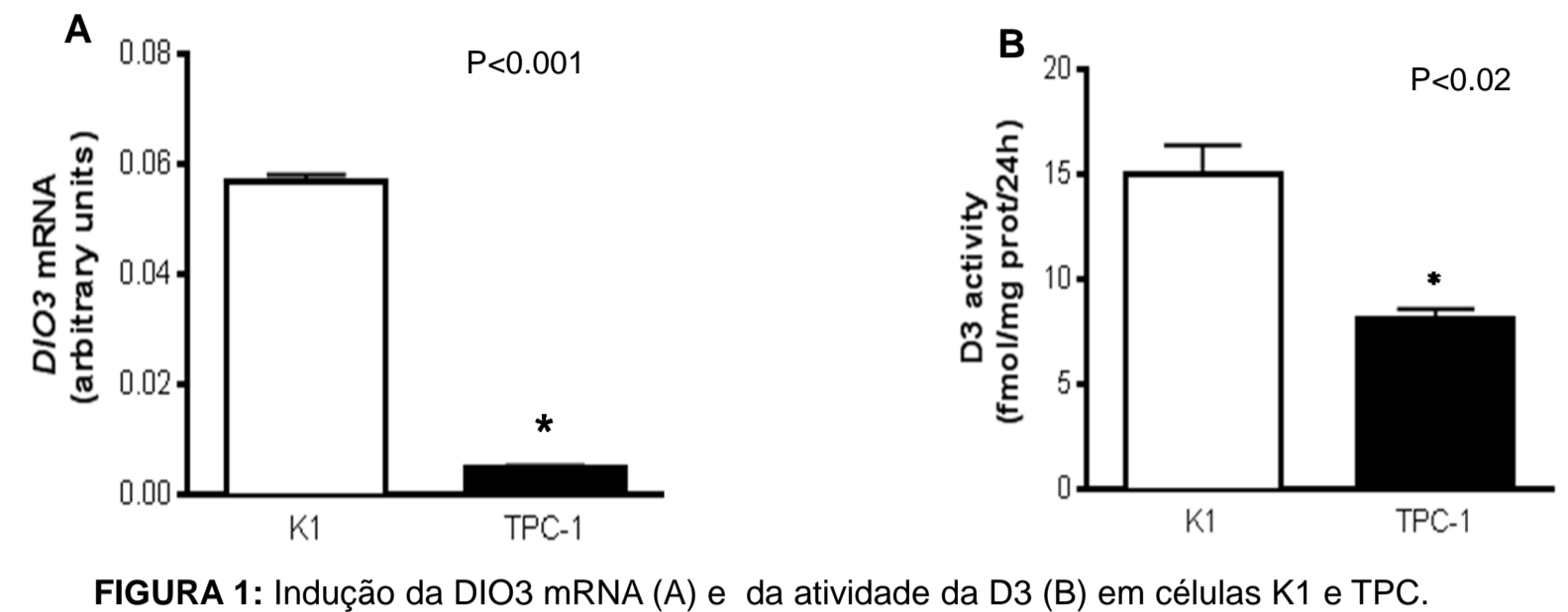


FIGURA 1: Indução da DIO3 mRNA (A) e da atividade da D3 (B) em células K1 e TPC-1.

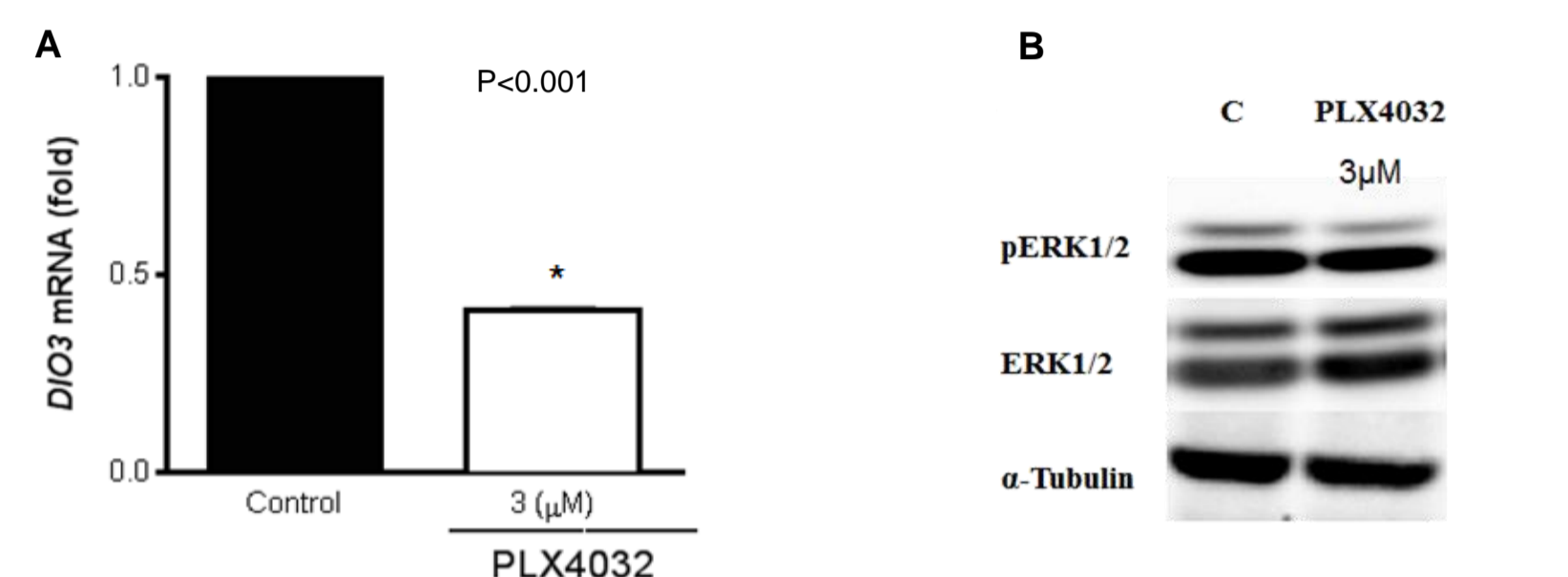


FIGURA 2: A inibição do gene BRAF (PLX4032-3µM) reduz DIO3 mRNA (A) e fosforilação de ERK em 20% (B) em células K1.

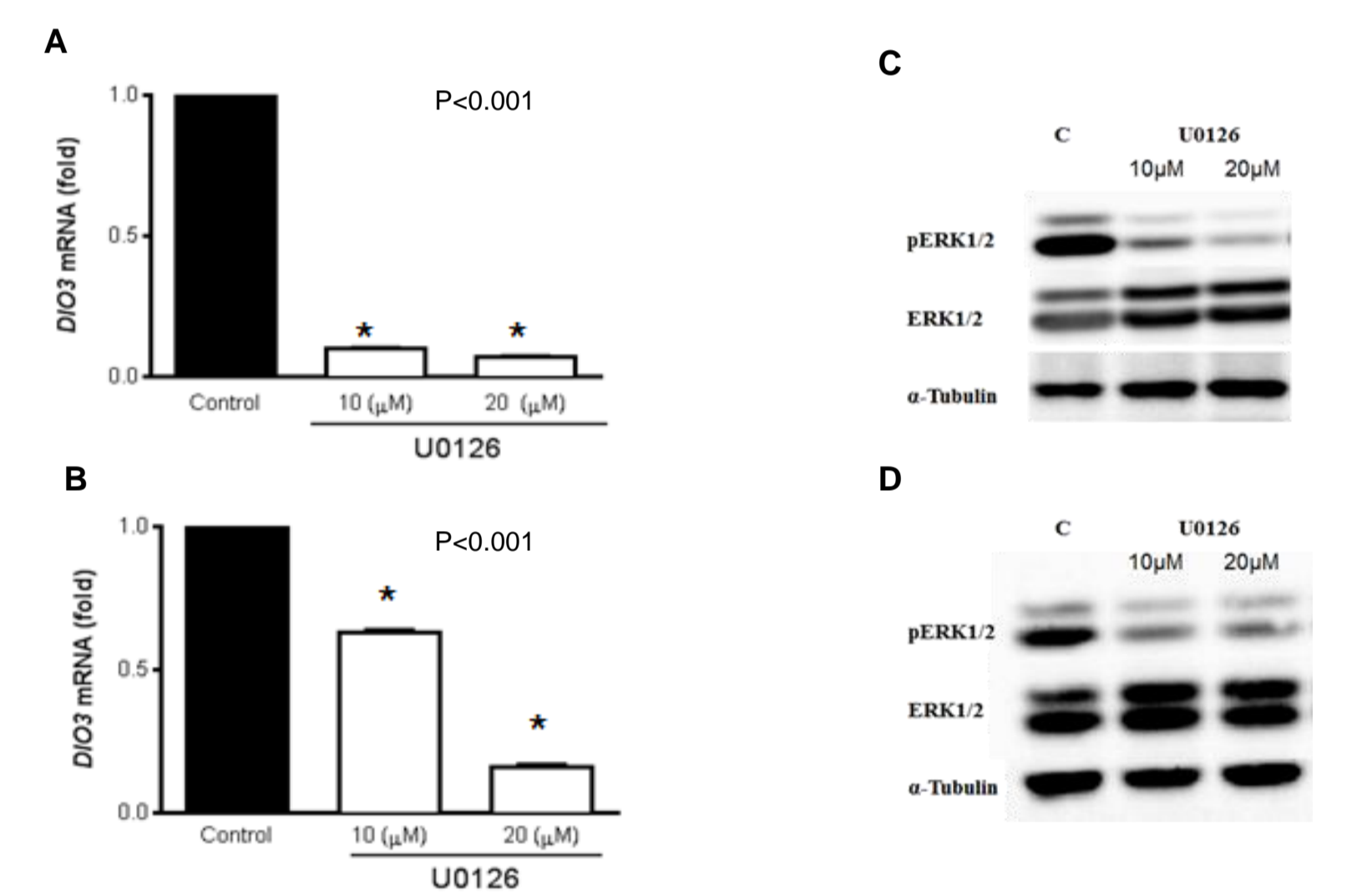


FIGURA 3: A inibição de MEK (U0126 10 e 20µM) reduz DIO3 mRNA (A e B) e fosforilação de ERK (C e D) em células K1 (A e C) e TPC (B e D).

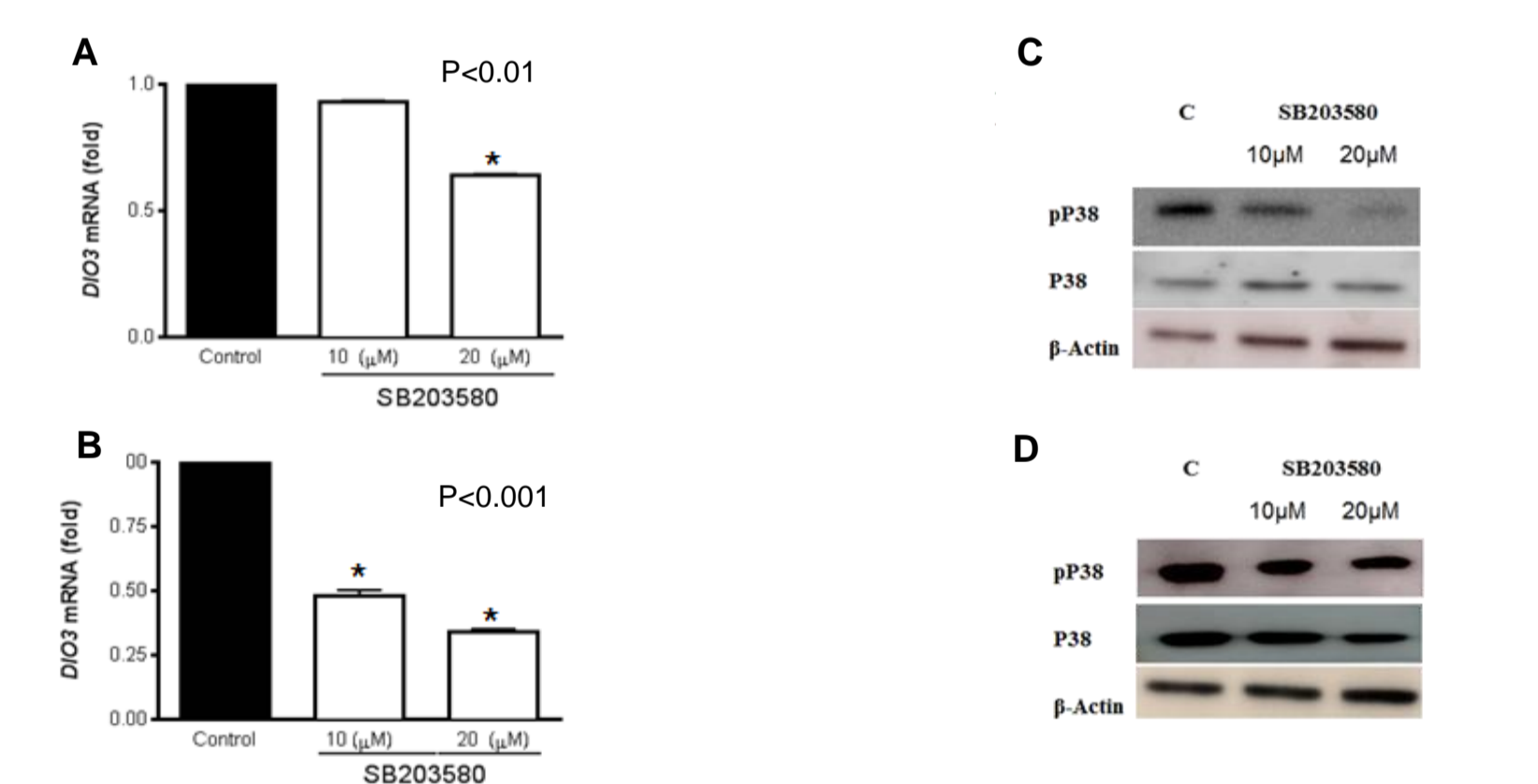


FIGURA 4: A inibição de P38 (SB203580 10 e 20µM) reduz DIO3 mRNA (A e B) e fosforilação de ERK (C e D) em células K1 (A e C) e TPC (B e D).

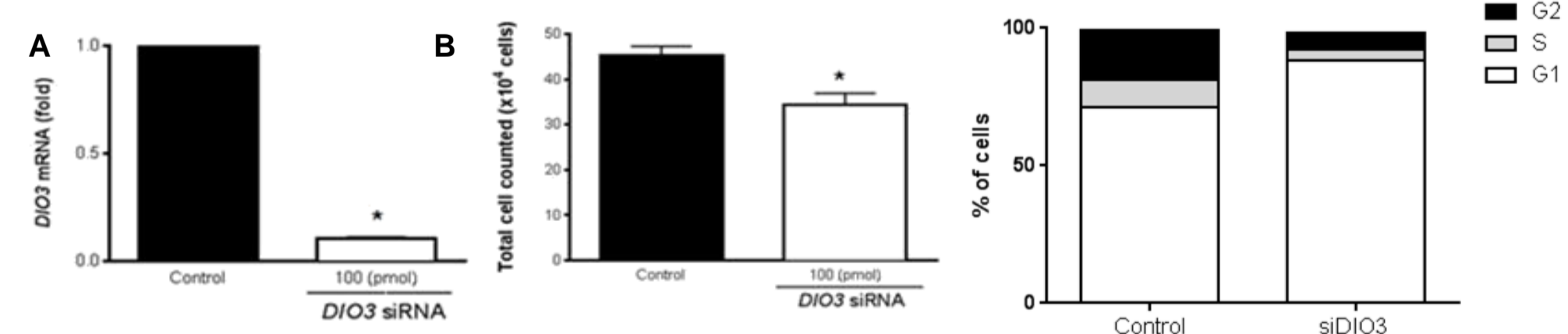


FIGURA 5: A inibição da D3 através de silenciamento gênico (RNAi) (A) gera uma redução na proliferação celular (B) em células K1. Os mesmos resultados foram encontrados nas células TPC ($p < 0.001$).

FIGURA 6: Aumento de células na fase G1 através do silenciamento da D3 (RNAi) em K1 ($p < 0.005$).

CONCLUSÃO

A indução da D3 no CPT ocorre principalmente via desregulação na sinalização da via MAPK devido a alterações genéticas específicas. A associação entre a reativação da D3 e a proliferação celular reforça a hipótese de que o hipotireoidismo intracelular tem um papel no desenvolvimento e agressividade tumoral. Dessa forma, a D3 parece ter um papel importante como marcador prognóstico e potencial alvo terapêutico no CPT.