

rais e a via TGF $\beta$ . Assim, avaliaremos o efeito de miR-17-92 na via TGF $\beta$  durante a ativação de BRAF e sua influência na oncogênese tireoidiana. **Materiais e métodos:** A linhagem PCC13 (tirócito normal de rato) foi modificada para expressar BRAFT1799A sob estímulo de doxíclina (BRA9-6), ou para superexpressar miR-17-92 (PCC13-miR-17-92). As linhagens BRA9-6 sem doxíclina e PCC13- $\phi$  (plasmídeo vazio) foram utilizadas como controle. A expressão de miR-17-92 foi avaliada por RT-PCR em tempo real pelo método Stem-loop, e a expressão de proteínas componentes da via de sinalização TGF $\beta$ , Smad4 e Tgfbr2 foi avaliada por Western-blotting; a responsividade dessa via ao TGF $\beta$  exógeno foi avaliada após tratamento com TGF $\beta$  recombinante (1-2 ng/mL) e ensaio de gene repórter com o plasmídeo p3TP-lux, que contém sequências responsivas à ativação da via TGF $\beta$ . A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT e a proliferação, por meio de contagem celular. **Resultados:** A ativação do oncogene BRAF aumenta a expressão do cluster miR-17-92 e reduz a expressão de Smad4 e Tgfbr2. A superexpressão de miR-17-92 (PCC13-miR-17-92) reduz a expressão proteica de Smad4 e Tgfbr2, que se reflete em resposta reduzida ao efeito inibitório do TGF $\beta$  exógeno. O ensaio de gene repórter (3TP-lux) mostra aumento da atividade luciferase em 8 e 12 vezes após o tratamento da linhagem PCC13- $\phi$  com 1 ng/ml e 2 ng/mL de TGF $\beta$  respectivamente, enquanto aumento de 4 e 6 vezes é observado em PCC13-miR-17-92. Além disso, observa-se aumento da proliferação e viabilidade de PCC13-miR-17-92 em 18% e 9%, respectivamente, comparado com PCC13- $\phi$ . **Conclusão:** miR-17-92 participa da oncogênese mediada por BRAF ao reduzir Smad4 e Tgfbr2 e restringir a responsividade da célula folicular tireoidiana ao TGF $\beta$ , além de induzir a proliferação e incrementar a viabilidade celular. Esse efeito de miR-17-92 poderia contribuir com a refratariedade ao sinal antimitogênico de TGF $\beta$ , comumente observada no câncer de tireoide. Apoio financeiro: Fapesp: 2010/51704-0.

#### OR4 AÇÃO DO HORMÔNIO TRIIODOTIRONINA (T3) ALTERA A EXPRESSÃO GÊNICA DO ONCOGENE AMPHIREGULIN (AREG) EM CÉLULAS TUMORAIS DE ADENOCARCINOMA DE MAMA

Maria Teresa de Sibo<sup>1</sup>, Sandro José Conde<sup>1</sup>, Miriane de Oliveira<sup>1</sup>, Fernanda Cristina Fontes Moretto<sup>1</sup>, Regiane Marques Castro Olimpio<sup>1</sup>, Aline Carbonera Luvizon<sup>1</sup>, Célia Regina Nogueira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

A incidência de câncer de mama (CM) tem aumentado de maneira alarmante nos últimos anos. Diversas pesquisas conduziram a descoberta de amphiregulin (AREG) como um oncogene, tendo sua expressão relacionada com diversos tipos de cânceres. Nosso grupo evidenciou a ação do T3 sobre diferentes genes em células de câncer de mama, por meio de *microarray*, porém nesse estudo não foi avaliado o mecanismo de ação pelo qual o T3 regula a expressão desses genes e o envolvimento do ER. A relação entre a expressão de AREG e a presença de HT permanece desconhecida, portanto, o objetivo do presente estudo foi verificar a ação nuclear e extranuclear do T3 na expressão gênica do oncogene AREG em linhagens celulares de adenocarcinoma de mama, MCF-7 e MDA-MB-231. As linhagens celulares foram submetidas ao tratamento com 10<sup>-8</sup>M de T3 nos tempos de 10', 30', 1h e 4h, na presença ou ausência de Fulvestrant (ICI 182,780), inibidor do ER, actinomicina D (ACTD) – inibidor da expressão gênica, ciclo-hexamida (CHX), inibidor da síntese proteica, e LY294002 – inibidor da via PI3K. O mRNA de AREG foi analisado pela técnica de RT-PCR. Para a análise dos dados, foi utilizado ANOVA complementado com teste de Tukey e adotada significância mínima de 5%. O T3 elevou os níveis de expressão gênica de AREG, em relação ao grupo controle, nas duas linhagens celulares, independente dos tempos de incubação. Nosso trabalho confirma que a expressão gênica de AREG está aumentada na presença T3, em ambas as linhagens e em todos os tempos estudados. Os dados

desse estudo indicam que T3 pode agir por meio de ER, diminuindo a expressão de AREG após 30' de tratamento nas células MCF-7 e não alterando a expressão desse gene nas células MDA-MB-231, as quais não possuem ER. Além disso, podemos sugerir que a ação de T3 sobre a expressão gênica de AREG ocorre de forma indireta. O T3 mantém a expressão de AREG mesmo após a inibição da transcrição. E a ativação da via PI3K pelo T3 é necessária para a modulação do gene AREG em ambas as linhagens estudadas. Apoio financeiro – Fapesp: 2009/15607-2.

#### OR5 TRATAMENTO PÓS-NATAL MOSTRA QUE O BISFENOL A TEM PAPEL DE ANTAGONISTA DO HORMÔNIO TIROIDIANO

Marina Malta Letro Kizys<sup>1</sup>, Kelen Carneiro Oliveira<sup>1</sup>, Renata M. Romano<sup>1</sup>, Leonardo Lira<sup>1</sup>, Rui Monteiro de Barros Maciel<sup>1</sup>, Gisele Giannocco<sup>2</sup>, Magnus R. Dias-da-Silva<sup>1</sup>, Marco A. Romano<sup>3</sup>, Maria Izabel Chiamolera<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Paulo; <sup>2</sup> Faculdade de Medicina do ABC; <sup>3</sup> Unicentro

Bisfenol A (BPA) é um componente de materiais plásticos já implicado como desregulador endócrino pelas constatações iniciais de suas ações estrogênicas e sua ação no eixo gonadal. Posteriormente, foi constatada sua ação de antagonista sobre os receptores do hormônio tireoidiano (TR) *in vitro* e em alguns estudos *in vivo*. O objetivo desse estudo foi analisar a ação do BPA no eixo hipotálamo-hipófise-tireoidiano e na expressão de genes regulados pelo hormônio tireoidiano *in vivo*, para isso ratas Wistar (90d) foram cruzadas, e o início da gestação foi confirmado por esfregaço vaginal. A prole de machos foi acompanhada desde o 23º dia até o 102º dia após o nascimento (PND). O período de lactação se estendeu até o PND22 e, após esse período, os animais tiveram água e ração comercial *ad libitum*. Os tratamentos iniciaram-se no PND23 e encerraram-se no PND58, com duração de 36 dias de tratamento, nas doses diárias de 5 e 25 mg/kg (grupos teste) ou 0 mg/kg (grupo controle). No PND102, a prole masculina (n = 10/grupo) foi decapitada e o sangue do tronco foi coletado para a realização de dosagens hormonais (TSH, T3 e T4). RNA total foi extraído do hipotálamo, hipófise, fígado e coração. Analisaram-se a expressão gênica da isoforma beta da tirotropina (Tshb, desidases tipo 1 e 3 (Dio1 e Dio3), isoformas alfa e beta dos TRs, hormônio liberador do TSH (Trh), e as isoformas alfa e beta da cadeia pesada da miosina cardíaca (a-Mhc e b-Mhc). Observou-se que os animais tratados mostraram tendência a aumento de TSH com paradoxal tendência a aumento de T3 total, padrão semelhante ao da síndrome de resistência aos hormônios tireoidianos (RHT). Contraditoriamente, os animais apresentaram queda dos níveis de T4 com o tratamento com BPA, o que poderia ser explicado em parte pelo aumento de expressão de Dio1 observado no tecido hepático. Na hipófise, o Tshb teve sua expressão gênica aumentada nos animais expostos ao BPA, enquanto a de Dio3 foi reprimida. No coração, houve diminuição dos níveis dos transcritos de a-Mhc, enquanto os de b-Mhc permaneceram inalterados. O padrão de expressão gênica apresentado por esses animais é semelhante ao dos animais com hipotireoidismo, podendo ser justificado pela ação de antagonista de TR do BPA observada em outros estudos. Porém, estudos funcionais adicionais são necessários para esclarecer se essas alterações são devidas a essa ação antagonista do BPA sobre o TR ou sua ação estrogênica em um mecanismo de regulação associada ao T3.

#### OR6 O PAPEL DE VARIANTES GENÉTICAS 3'UTR DO PROTO-ONCOGENE RET NA EVOLUÇÃO CLÍNICA ASSOCIADA AO POLIMORFISMO S836S NO CARCINOMA MEDULAR DA TIROIDE

Lucieli Ceolin<sup>1</sup>, Debora Rodrigues Siqueira<sup>1</sup>, Mirian Romitti<sup>1</sup>, Carla Vaz Ferreira<sup>1</sup>, Rodolfo Vieira Maximiliano<sup>2</sup>, Tauanne Dias Amarante<sup>2</sup>, Miriam Celi de Souza Nunes<sup>2</sup>, Gerald Weber<sup>2</sup>, Ana Luiza Maia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul; <sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais

**Introdução:** Polimorfismos no proto-oncogene RET têm sido implicados na patogênese e progressão do carcinoma medular da tireoide (CMT). A presença da variante genética silenciosa S836S tem sido associada com o risco de desenvolver ou modificar o curso clínico do CMT. No entanto, o mecanismo exato com que esse polimorfismo exerce seu efeito ainda é pouco compreendido. Uma das hipóteses é que outras variantes funcionais do RET possam estar em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo S836S, sendo essas capazes de modular a expressão gênica. Em pacientes com doença de Hirschsprung, polimorfismos das regiões 3'UTR do RET foram associados com risco e/ou proteção para o desenvolvimento dessa patologia. **Objetivo:** Avaliar a frequência dos polimorfismos rs76759170 e rs3026785 da região 3'UTR do proto-oncogene RET em pacientes com CMT e verificar a presença de desequilíbrio de ligação com variante S836S. **Métodos:** Foram incluídos pacientes com CMT hereditário ou esporádico atendidos no Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O DNA foi extraído a partir de sangue periférico e as variantes S836S e 3'UTR (rs76759170 e rs3026785) foram genotipadas utilizando ensaios TaqMan (Applied Biosystems, CA, USA). Os haplótipos foram construídos com base na combinação das variantes alélicas e suas frequências foram inferidas usando o programa Phase 2.1. **Resultados:** Duzentos e noventa e oito pacientes foram genotipados (168 hereditários e 130 esporádicos). A idade média dos pacientes foi de 35 ( $\pm 18$ ) anos e 51,3% foram do sexo feminino. A frequência do polimorfismo S836S foi 4,8%, enquanto das variantes 3'UTR (rs76759170 e rs3026785) foi de 5%. Observamos um forte desequilíbrio de ligação (DL) entre as duas variantes 3'UTR ( $|D'| = -1$ ;  $r^2 = 1$ ) e destas com o polimorfismo S836S ( $|D'| = -1$ ;  $r^2 = 0,989$ ). Não observamos associação entre esses polimorfismos e níveis de calcitonina, CEA, presença de feocromocitoma e hiperparatireoidismo ( $P > 0,05$ ). No entanto, indivíduos portadores das variantes genéticas 3'UTR do RET apresentaram doença metastática em idade mais jovem, quando comparados a indivíduos não portadores ( $P = 0,001$ ). De modo interessante, análises de bioinformática sobre a estrutura e flexibilidade do RNAm previram diferentes características para fragmentos normais e polimórficos. A sequência contendo os polimorfismos 3'UTR apresentou maior número de trechos de fita dupla e maiores níveis de energia livre, sugerindo uma maior estabilidade estrutural e termodinâmica no fragmento polimórfico. **Conclusão:** Nossos resultados demonstram associação de variantes genéticas do proto-oncogene RET com desenvolvimento de CMT metastático em idade mais jovem e corroboram a hipótese de que outras variantes em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo S836S podem explicar seu efeito sobre a patogênese da doença.

#### OR7 EXPRESSÃO REDUZIDA DO GENE HOMEBOX HOPX $\beta$ EM CÂNCER DIFERENCIADO DE TIREOIDE

Joaquim Custódio da Silva Júnior<sup>1</sup>, Erika Urbano de Lima<sup>2</sup>, Taíse Lima de Oliveira Cerqueira<sup>3</sup>, Mateus Fernandes da Silva Medeiros<sup>1</sup>, Virna Mendonça Sampaio Lima<sup>1</sup>, Luiz José Lobão Sampaio<sup>4</sup>, Cláudio Rogério Alves de Lima<sup>5</sup>, Luciano Espinheira Fonseca Júnior<sup>6</sup>, Ana Luiza Resende Galvão<sup>7</sup>, Igor Campos da Silva<sup>8</sup>, Ileana Gabriela Sánchez de Rubió<sup>7</sup>, Helton Estrela Ramos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biorregulação, Laboratório de Estudo da Tireoide (LET), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia; <sup>2</sup> Departamento de Morfologia e Genética, Laboratório de Bases Genéticas dos Tumores da Tireoide, Universidade Federal de São Paulo; <sup>3</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz (CPqGM), Curso de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa; <sup>4</sup> Serviço de Medicina Nuclear, Hospital São Rafael; <sup>5</sup> Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Hospital São Rafael; <sup>6</sup> Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia; <sup>7</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo; <sup>8</sup> Serviço de Anatomia Patológica, Hospital São Rafael

**Introdução:** A despeito de um bom prognóstico na maioria dos casos, o manejo do câncer diferenciado de tireoide (CDT) ainda carece de avanços em casos que envolvem doença mais agressiva. O uso

crecente da Biologia Molecular na Oncologia vem ganhando força como uma ferramenta útil no manejo de diversos tipos de câncer. Além da abordagem tradicional de busca de mutações relacionadas a tipos específicos de câncer, o estudo de características epigenéticas emerge como uma nova modalidade de análise e predição do comportamento dos tumores. HOPX $\beta$  é um gene homeobox com função de supressão tumoral, cuja hipermetilação e consequente repressão têm sido estudadas em diversos tipos de câncer (pulmão, esôfago, estômago, pâncreas, cólon e útero). Em câncer de cólon, a hipermetilação do gene HOPX $\beta$  confere fenótipo mais agressivo e piora do prognóstico. HOPX $\beta$  possui papel controlador de diversas oncoproteínas (Cyr61, EMP1, EphA2, c-Fos, c-Jun, EGFR e GLUT-3). **Objetivos:** Analisar o perfil de expressão gênica do gene homeobox HOPX $\beta$  em amostras de CDT, comparando com o tecido não tumoral adjacente e buscar correlação com a presença da mutação BRAFV600E. **Material e métodos:** Foram extraídos 10 pares de amostras de tecido tumoral (T) e não tumoral (NT) adjacente de pacientes com diagnóstico de carcinoma papilífero de tireoide. As amostras foram conservadas em nitrogênio líquido. Foi procedida extração de DNA genômico (QIAmp DNA Mini) e RNA total pelo método Trizol. Realizaram-se amplificação por PCR em termo-ciclador Veriti (Applied Biosystems) do Exon 15 do gene BRAF e sequenciamento direto no equipamento ABI 377. Foram realizadas síntese de cDNA (Invitrogen) e quantificação da expressão gênica por RT-PCR em tempo real do gene HOPX $\beta$ , usando Rotor-Gene 3000 e estojo SYBR Green qPCR SuperMix-UDG. O gene S8 foi utilizado como controle interno para normalização da expressão. Para cálculo da expressão gênica, foi empregado o método  $\Delta\Delta CT$ . A comparação da expressão gênica entre tecidos NT e T foi realizada utilizando testes de Wilcoxon; as análises, considerando a presença da mutação BRAF realizada com o teste Kruskal-Wallis. **Resultados:** Verificou-se significativa redução (54%) da expressão gênica de HOPX $\beta$  nas amostras T quando comparadas com as NT ( $2,74 \pm 2,67$  vs.  $1,48 \pm 0,92$ ) ( $p \leq 0,05$ ). Entre as amostras tumorais, 7/10 apresentaram redução de expressão do gene HOPX $\beta$  ao comparar tecido NT e 40% dos pacientes apresentaram a mutação BRAF V600E. Não houve correlação entre a mutação BRAF V600E e redução da expressão do HOPX $\beta$ . **Conclusão:** Esses achados preliminares indicam que o gene HOPX $\beta$  está marcadamente suprimido em tecido tumoral no subgrupo de pacientes com carcinoma papilífero de tireoide. Estudos adicionais podem elucidar e confirmar a importância do gene HOPX $\beta$  na gênese e progressão do CDT, propiciando a criação de novos alvos terapêuticos.

#### OR8 INVESTIGAÇÃO DA METILAÇÃO COMO MECANISMO EPIGENÉTICO DE PERDA DA EXPRESSÃO DO GENE ABI3, UM POTENCIAL SUPRESSOR TUMORAL, NOS CARCINOMAS DA TIREOIDE

Lais Moraes<sup>1</sup>, Ana Luiza Resende Galvão<sup>1</sup>, Ileana Gabriela Sánchez de Rubió<sup>1</sup>, Janete Maria Cerutti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Paulo

**Introdução:** Nosso grupo observou uma redução da expressão de ABI3 em lesões malignas de carcinomas da tireoide humana quando comparadas às benignas. Demonstramos que a reexpressão de ABI3 *in vitro* em linhagem de carcinoma folicular (WRO) diminui a invasividade, migração, crescimento e viabilidade celular, associados a um aumento da senescência, e diminui a capacidade de formação de tumor *in vivo*. Esses dados sugerem que ABI3 desempenha um importante papel na carcinogênese, atuando como um potencial supressor tumoral. Porém, ainda não é conhecido o mecanismo genético/epigenético associado a sua perda de expressão nos carcinomas da tireoide. **Objetivos:** Investigar possíveis ilhas ou sítios CpG na região promotora do gene ABI3 e avaliar se a hipermetilação das regiões candidatas no gene ABI3 podem estar associadas a sua perda da expressão nos carcinomas da tireoide. **Metodologia:** As análises *in*