



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Fernanda Cristina Fontes Moretto Arena

**PARTICIPAÇÃO DO T3 NO CONTROLE PÓS-
TRANSCRICIONAL DA EXPRESSÃO DE *HIF1A* E
TGFA EM LINHAGEM CELULAR DE
ADENOCARCINOMA DE MAMA E AVALIAÇÃO DO
ENVOLVIMENTO DE POTENCIAIS *miRNAs***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Titular Célia Regina Nogueira
Coorientadora: Dra. Maria Teresa De Sibio

Fernanda Cristina Fontes Moretto Arena

**PARTICIPAÇÃO DO T3 NO CONTROLE PÓS-
TRANSCRICIONAL DA EXPRESSÃO DE *HIF1A*
E *TGFA* EM LINHAGEM CELULAR DE
ADENOCARCINOMA DE MAMA E AVALIAÇÃO
DO ENVOLVIMENTO DE POTENCIAIS miRNAs**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Titular Célia Regina Nogueira
Coorientadora: Dra. Maria Teresa De Sibio

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Arena, Fernanda Cristina Fontes Moretto.

Participação do T3 no controle pós-transcricional da expressão de *HIF1A* e *TGFA* em linhagem celular de adenocarcinoma de mama e avaliação do envolvimento de potenciais miRNAs / Fernanda Cristina Fontes Moretto Arena. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Célia Regina Nogueira

Coorientador: Maria Teresa De Sibio

Capes: 40101002

1. Mamas - Câncer. 2. Adenocarcinoma. 3. Fator 1 induzível por hipóxia. 4. Hormônios tireoidianos. 5. Fatores de crescimento transformadores. 6. MicroRNAs.

Palavras-chave: Adenocarcinoma de mama; *HIF1A*; Hormônio tireoidiano; *TGFA*; miRNA.

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida,

A **Deus**, por me capacitar e fazer com
que meu sonho se tornasse realidade.

Aos **meus pais**, que estiveram ao meu lado em
todos os momentos deste trabalho, me dando
força e incentivo. Em especial a minha mãe
Fátima, pelo amor incondicional e atenção,
devo a você a pessoa que me tornei hoje, seus
esforços e dedicação foram essenciais para as
minhas conquistas. Amor eterno!

Ao meu irmão **Júnior**, pelo amor em
todas as etapas da minha vida, por ser
aquele que eu sei que sempre estará
comigo “amor de irmão será sempre
amor de irmão”.

Ao meu marido **Felipe**, pelo carinho, paciência,
companheirismo e por todo apoio provido para
a concretização de meus sonhos.

Agradecimentos

A ***Deus***, por mais uma etapa concluída e nesse caminho se fez presente a cada instante. Agradeço ao Senhor Deus por possibilitar a realização de mais uma conquista e por ter me abençoado na realização desse trabalho!!

Aos meus pais, *Valério, Fátima* e meu irmão *Júnior*, que sempre me apoiaram e me deram forças para realizar cada objetivo. Vocês são fundamentais na minha vida!

Ao meu marido *Felipe*, pelos conselhos, paciência, carinho e compreensão. Sempre me apoiando em minha caminhada. Agradeço a Deus por ter você na minha vida.

À *minha família*, a todos os tios e tias que são como meus pais, aos primos e primas que são verdadeiros irmãos.

Aos *meus amigos*, que são a família que eu escolhi. Sem vocês tudo seria mais difícil e menos divertido.

À minha orientadora *Célia Regina Nogueira*, pela competência na orientação e oportunidade em realizar este trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

À *Regi, Maria Teresa e Helena* conhecer vocês fez toda diferença nessa caminhada. Obrigada pela paciência, pela dedicação e por tudo que me ensinaram, sempre prestativas e presentes em todas as etapas deste trabalho.

À *Laura Martin, Dani Vileigas e Dijon Campos* sempre prestativos! Obrigada por todo o conhecimento técnico e científico, torço muito por vocês!

À *Renata, Paulinha, Corina e Regina* por compartilharem momentos de alegrias e dificuldades, sempre prontas para me auxiliar em diversos assuntos. Obrigada pela amizade e pelos momentos que passamos juntas!

Aos *amigos do Laboratório “Bio Mol”*: *Regi, Maria Teresa, Helena, Dari, Bia, Lucas, Bruna, Miriane, Lari e Sarah*, sempre dispostos a ajudar no que é preciso. Obrigada pela amizade construída e muito sucesso a vocês!

Aos *amigos da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX)*, obrigada a todos pela amizade e pelos momentos que passamos juntos.

A todos os *funcionários da UNIPEX*, pela convivência, colaboração e auxílios prestados.

À *Paulinha, Vick e Igor* por todo auxílio disponibilizado e ensinamentos. Muito obrigada pelo apoio!

À *Sueli Clara* pela amizade e sempre disponível para ajudar no que fosse necessário.

Aos funcionários da *Seção Técnica de Pós-Graduação* pela paciência e eficiência nas soluções de problemas

Aos membros da banca de qualificação *Dra. Márcia Guimarães e Dr. Robson Carvalho*, pelas correções e sugestões proferidas no exame geral de qualificação, contribuindo para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Comissão Examinadora de Defesa de Tese *Dra. Paula Hokama, Dr. Robson Carvalho, Dra. Patrícia Saraiva e Dra. Nancy Figueiredo* pela disponibilidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Doutorado e por viabilizar a realização deste estudo. Muito obrigada! (Processo: 2014/15209-5)

A todas as pessoas que estiveram envolvidas, direta ou indiretamente, em todas as etapas de execução deste estudo, contribuindo para que o mesmo fosse realizado da melhor maneira possível. Obrigada a todos!

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado com certeza vai mais longe.”

(Clarice Lispector)

“O sucesso nasce do querer,
da determinação e
persistência em se chegar a
um objetivo. Mesmo não
atingindo o alvo, quem busca
e vence obstáculos, no mínimo
fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

Resumo

O câncer de mama (CM) é o primeiro em taxa de mortalidade em mulheres no mundo e o segundo mais frequente entre as mulheres no Brasil. Os fatores de risco estão relacionados com a idade, fatores ambientais, comportamentais, genéticos/hereditários, história reprodutiva e hormonal, bem como os hormônios tireoidianos (HT) que têm sido propostos por influenciar o desenvolvimento de CM. A superexpressão do fator induzido por hipóxia 1 subunidade alfa (*HIF1A*) e o fator transformador de crescimento alfa (*TGFA*) está positivamente relacionada com a agressividade do tumor e com a progressão maligna em neoplasias humanas, porém não foi avaliada a participação do hormônio triiodotironina (T3) na expressão desses genes em vias extranucleares MAPK/ERK e integrina $\alpha\text{v}\beta 3$. No CM, a desregulação na expressão de microRNAs (miRNA) têm sido detectada em casos metastáticos e de pior prognóstico, sugerindo funções importantes na oncogênese mamária e na progressão do câncer. Nosso objetivo foi verificar o envolvimento do T3 no controle pós-transcricional da expressão de mRNA *HIF1A* e *TGFA* e avaliar se os miRNAs envolvidos no CM, let-7a-5p, miR-200a-3p e miR-335-5p, são modulados por esse hormônio em células de adenocarcinoma de mama MCF7. A linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF7 foi submetida ao tratamento com T3 na dose suprafisiológica (10^{-8}M) por 1 hora, na presença ou ausência de drogas específicas para o bloqueio de vias de sinalização intracelulares para abordagem de ações extranucleares dos HT, como PD98059 (inibidor da MAPK/ERK), Peptídeo RGD (que se liga a integrina $\alpha\text{v}\beta 3$) e α -amanitina (inibidor específico da RNA polimerase II), com posterior análise de expressão gênica de *HIF1A* e *TGFA*, assim como, os miRNAs let-7a-5p, miR-200a-3p e miR-335-5p por meio da técnica de RT-qPCR. Os resultados demonstram que a ativação das vias MAPK/ERK e integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ pelo T3 são necessárias para modular a expressão de

mRNA de *HIF1A* e *TGFA* e a inibição da transcrição gênica demonstra que o T3 não mantém a estabilidade pós-transcricional dos mRNAs estudados em células MCF7. O T3 exerceu efeito supressor na expressão do miRNA let-7a-5p, podendo estar correlacionado com pior progressão tumoral e não interfere na expressão de miR-200a-3p e miR-335-5p nessa linhagem celular.

Palavras-chave: Hormônio tireoidiano, Adenocarcinoma de mama, *HIF1A*, *TGFA* e miRNAs.

Abstract

Breast cancer (BC) has the highest mortality rate among women in the world and is the second most frequent among women in Brazil. Risk factors are related to age, environmental, behavioral, genetic/hereditary, reproductive and hormonal history, as well as thyroid hormones (TH), that have been proposed to influence the development of BC. The overexpression of the hypoxia inducible factor 1 subunit alpha (*HIF1A*) and the transforming growth factor alpha (*TGFA*) is positively related to tumor aggressiveness and malignant progression in human neoplasias, but the participation of the hormone triiodothyronine (T3) in the expression of these genes in extranuclear pathways MAPK / ERK and integrin $\alpha\beta3$. In BC, dysregulation in the expression of miRNAs has been detected in metastatic cases and worse prognosis, suggesting important functions in mammary oncogenesis and cancer progression. Our objective was to verify the pathways of T3 actions, through the use of specific drugs to block intracellular signaling pathways as an approach to mapping TH extranuclear actions in the expression of *HIF1A* and *TGFA*. We jointly evaluated whether the miRNAs involved in CM, let-7a-5p, miR-200a-3p and miR-335-5p are modulated by T3 in MCF7 breast adenocarcinoma cells. The MCF7 breast adenocarcinoma cell line was treated with T3 at the 10^{-8} M dose for 1 hour in the presence or absence of specific drugs for the blockade of intracellular signaling pathways to approach HT extranuclear actions such as PD98059 (MAPK/ERK inhibitor), RGD peptide (which binds $\alpha\beta3$ integrin) and α -amanitin (specific inhibitor of RNA polymerase II), with subsequent gene expression analysis of *HIF1A* and *TGFA*, as well as the miRNAs let-7a-5p, miR-200a-3p and miR-335-5p by the RT-qPCR technique. The results demonstrate that the activation of both the MAPK/ERK and $\alpha\beta3$ integrin pathways by T3 is required to modulate the gene expression of *HIF1A* and *TGFA* and by inhibiting gene transcription

we demonstrated that T3 does not maintain the post-transcriptional stability of the mRNAs studied in cells MCF7. T3 had a suppressive effect on the miRNA let-7a-5p expression, which may be correlated with worse tumor progression and does not interfere with miR-200a-3p and miR-335-5p expression in this cell line.

Keywords: Thyroid hormone, breast cancer, *HIF1A*, *TGFA* and miRNAs.

Capítulo 1 – Introdução estendida

Introdução.....	14
Objetivos.....	22
Referências.....	24

Capítulo 2 – Artigo científico

Capa.....	32
Resumo.....	33
Introdução.....	34
Materiais e Métodos.....	36
Resultados.....	38
Discussão e conclusão.....	42
Referências.....	45

Capítulo 3 – Anexos

Anexo 1 – Comitê de Ética.....	50
Anexo 2 – Tratamentos das células com hormônio e inibidores.....	52
Anexo 3 – Cultivo das células MCF7.....	53
Anexo 4 – Quantificação de RNA.....	54
Anexo 5 – Influência do T3 na expressão dos miRNAs 200a-3p e 335-5p em células MCF7.....	56

Capítulo 1
Introdução estendida

O câncer de mama (CM) é uma doença causada como consequência de alterações genéticas em algum conjunto de células da mama, podendo ocorrer tanto no ducto quanto nos glóbulos mamários. Esse processo é causado pela proliferação anormal e descontrolada de células oriundas de uma célula previamente normal, que sofreu uma ou mais mutações e que tem a capacidade de se espalhar pelo organismo podendo resultar em tumor maligno(1). De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o CM é o primeiro em taxa de mortalidade em mulheres no mundo e o segundo mais frequente entre as mulheres no Brasil. A estimativa do número de casos novos de CM em mulheres no Brasil foi de 59.700, para o ano de 2018, correspondendo cerca de 29% dos casos novos a cada ano(1).

Inúmeros fatores de riscos ambientais, condições patológicas e agentes fisiológicos(2–5), bem como os hormônios tireoidianos (HT) têm sido propostos por influenciar o desenvolvimento de CM(6). Estudos do nosso grupo relatam relação entre o CM em mulheres na pós-menopausa e hipertireoidismo(7–9).

Durante a progressão tumoral, ocorre um processo dependente da formação de novos vasos, denominado angiogênese tumoral(10). A angiogênese consiste no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes, sendo essencial em processos fisiopatológicos, tais como o desenvolvimento e a disseminação dos tumores(11). Quando a proliferação de células cancerosas ultrapassa a taxa de angiogênese, resulta em hipóxia tecidual(12). A adaptação celular à hipóxia é considerada um dos estímulos mais importantes para a angiogênese em tumores malignos(13) e um passo fundamental na progressão do tumor(14). Essa adaptação é regulada principalmente pelo fator indutor de hipóxia 1 (HIF-1), que é conhecido por desempenhar um papel essencial na homeostase(15–19), sendo fundamental na resposta celular em condições de baixa concentração de oxigênio(13).

A hipóxia estimula as proteínas HIF-1, que ativa a transcrição de genes envolvidos nos aspectos da biologia celular, regulando processos, como metabolismo, angiogênese, proliferação celular, apoptose e remodelamento celular(20). Esse fator é composto por duas subunidades, a alfa (α) e a beta (β), ambas membros de uma família de proteínas (bHLH). A subunidade α é a funcional, regulada pelo oxigênio e apresenta 3 tipos diferentes de unidades (1α , 2α e 3α)(21). Já a β , é constitutiva, mantida em níveis constantes de expressão, independente da concentração de oxigênio(20,22,23).

Em condições de normóxia tecidual são detectadas pequenas quantidades de *HIF1A* sendo sintetizado e degradado, na condição de hipóxia há aumento significativo dessa expressão(24,25), além disso, tumores submetidos à hipóxia parecem ser mais agressivos, com redução da apoptose e aumento de resistência a drogas(26–28).

Um estudo realizado por Zong et al.(29), mostrou que *HIF1A* é superexpresso em vários tumores humanos (cólon, mama, estômago, pulmão, pele, ovário, próstata, renal e carcinomas pancreáticos) quando comparado com tecidos normais, sendo também mais expresso em lesões pré-malignas do que em lesões benignas(29). Esses resultados enfatizam que *HIF1A* desempenha um papel importante no crescimento do tumor e na progressão a metástase(30).

A superexpressão de *HIF1A* no CM humano apresenta importância funcional e provavelmente prognóstica, estando relacionados à carcinogênese mamária e modificações moleculares decorrentes do processo de vascularização tumoral(31) sugerindo potencial de lesões pré-cancerosas(29) o que o torna um alvo promissor para o tratamento preventivo(32,33).

Além do *HIF1A*, o fator transformador de crescimento alfa (*TGFA*) também é secretado por muitos tumores e possui propriedades angiogênicas(34).

O gene *TGFA* é um fator de crescimento característico dos mamíferos, sua expressão ocorre em diversos tecidos desde a embriogênese até a fase adulta(35). Seu principal efeito é o estímulo da proliferação celular(36), sendo potente indutor de mitoses durante o desenvolvimento da mama(37). É secretado por vários tipos de células e estimula sua proliferação, diferenciação e desenvolvimento(38). Sua expressão foi detectada durante diferentes estágios de desenvolvimento mamário(39). Têm sido descrito como um fator produzido por células tumorais(34) e sua superexpressão pode ocorrer durante a progressão maligna(40).

A literatura indica que as citocinas interleucina-17A (IL-17A) e *TGFA* estão envolvidas na iniciação e progressão de doenças mamárias estando correlacionado com tumor mamário(38,41,42).

Em estudo recente, os níveis séricos de *TGFA* em pacientes com carcinoma ductal foram significativamente maior em relação a indivíduos saudáveis, sugerindo que o *TGFA* pode promover o desenvolvimento de tumores e estar associado a um estágio clínico mais grave de carcinoma. Assim, essa citocina pode ser desenvolvida como biomarcadores diagnósticos e prognósticos do câncer(43).

Estudos anteriores demonstraram que a superexpressão de *HIF1A* e *TGFA* está positivamente relacionada com a agressividade do tumor e com a progressão maligna em neoplasias humanas(40,44,45).

Em trabalho prévio demonstramos que o tratamento com triiodotironina (T3) na dose suprafisiológica (10^{-8} M), em células de adenocarcinoma de mama MCF7, promove aumento da expressão de mRNA de *HIF1A* e *TGFA*(46).

A via de sinalização dos hormônios tireoidianos (HT) é complexa e altamente regulada devido à expressão de transportadores específicos, presença de múltiplas isoformas de receptores de HT (TRs) e interações que ocorrem entre esses mediadores

nas células e tecidos(47,48). Além disso, em muitos casos, as vias de sinalização dos HT estão envolvidas em uma variedade de outras vias de sinalização(49,50).

As ações dos HT podem ser iniciadas no núcleo(51) ou por meio de mecanismos denominados extranucleares por terem sítio de ativação na membrana plasmática, citoplasma ou nas mitocôndrias das células(52).

No modelo nuclear de indução da expressão gênica pelos HT, os TRs ligam-se como heterodímeros em associação com o receptor de ácido retinóico (RXR) ou como homodímeros aos elementos responsivos aos hormônios tireoidianos (TRE) (Fig. 1)(51).

A ligação de alta afinidade do HT ao receptor pode induzir ou suprimir a expressão de genes alvos. Nos genes alvos regulados positivamente, a ausência do ligante favorece o recrutamento de co-repressores, enquanto que na presença de T3 ocorre liberação de co-repressores e recrutamento de complexos co-ativadores, levando à ativação da transcrição gênica. Este mecanismo atrai um grande número de proteínas incluindo o complexo da RNA polimerase II para a transcrição do gene alvo. A ação nuclear também pode levar ao aumento da expressão de genes desprovidos de TRE, os quais são genes alvos para fatores de transcrição induzidos por este mecanismo(52).

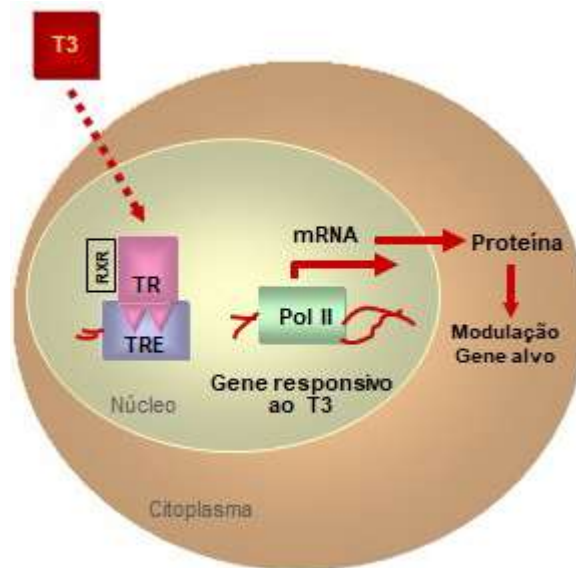


Figura 1. Ação nuclear dos hormônios tireoidianos (HT). Ação nuclear requer elemento responsivo ao hormônio tireoidiano (TRE) para transcrição de genes alvos. T3, triiodotironina; TR, receptores de HT; RXR, receptor de ácido retinóico; Pol II, polimerase II; mRNA, ácido ribonúcleico mensageiro.

Estudos demonstram que os HT podem agir por meio de outros mecanismos (Fig. 2), além da ação nuclear TR/TRE(51), esses mecanismos podem ser denominados extranucleares por terem o sítio de iniciação na membrana plasmática ou no citoplasma. Os sítios de iniciação são proteínas caracterizadas como receptores de iodoironinas(47). Os mecanismos denominados extranucleares podem influenciar potencialmente a expressão gênica. O início da via de ação é extranuclear, por dependerem de vias alternativas, mas as consequências incluem aumento da transcrição(51). Isto demonstra que pode haver uma inter-relação entre ação nuclear e extranuclear dos HT.

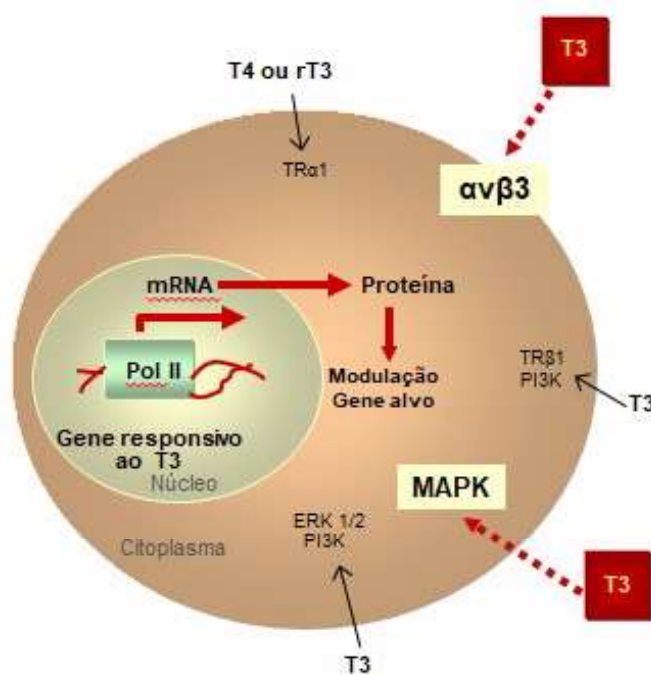


Figura 2. Representação esquemática de ações extranucleares dos hormônios tireoidianos. 1) Ações de HT via integrina $\alpha\text{v}\beta 3$. 2) Ações de HT via MAPK. 3) Algumas ações de HT via $\text{TR}\alpha$, receptor alfa dos HT; $\text{TR}\beta 1$, receptor beta dos HT; PI3K, fosfatidilinositol 3 quinase (modificado de Cheng et al., 2010(47)).

Sobre as ações extranucleares dos HT, as evidências são de que existem sítios localizados na membrana plasmática, ribossomos, mitocôndrias, citosol com os quais os HT podem interagir(53–55). Neste tipo de mecanismo, seus locais de iniciação podem estar na membrana plasmática, como na ativação da integrina $\alpha\text{v}\beta 3$, que ativa a ERK1/2 e culmina nas ações locais de membrana nos sistemas de transporte de íons, tais como Na^+/H^+ , ou em eventos celulares complexos ou no citoplasma(51,56,57).

Há evidências de que o HT pode afetar a organização do citoesqueleto, mecanismo pelo qual poderia interferir com o tráfego de vesículas para a membrana, e que parece envolver a integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ ou um $\text{TR}\alpha$ truncado, receptor de HT que não apresenta domínio de ligação ao DNA, ficando no citoplasma, onde pode se associar com outras proteínas/enzimas(47). Dessa maneira, vêm duas diferentes possibilidades

pelas quais os HT poderiam atuar num mesmo evento, sendo uma delas por uma ação na membrana e outra intracelularmente.

Bergh et al.(58) demonstraram a existência de um sítio ligante com alta afinidade pelos HT, numa proteína estrutural de membrana plasmática, a integrina $\alpha\beta3$. Esta reconhece proteínas de matriz extracelular que apresentam o domínio RGD (Arg-Gly-Asp). A integrina $\alpha\beta3$ possui dois sítios de ligação ao HT denominados Sítio 1 (S1) e 2 (S2). O S1 se liga somente ao T3 e o S2 se liga ao T4 com maior afinidade do que o T3(59). A ligação de S1 ao T3 ativa por meio da cinase Src, a enzima fosfatidil inositol-3-quinase (PI3K) e a ligação de T4 ou T3 a S2 ativa a via da via MAPK/ERK1/2(51,59). Da interação dos HT com a integrina, ocorre a ativação da via da MAPK, a qual medeia os efeitos extranucleares do T3 sobre a angiogênese(58).

Pelo receptor de integrina os HT estimulam as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e proteínas pertencentes ao grupo das MAPK, como as quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2)(47). Ao ser estimulada pelos HT, a MAPK ativa a proliferação de células tumorais ou a angiogênese. Por meio da fosfolipase C (PLC) e proteína quinase C ($PKC\alpha$), o hormônio ativa a ERK1/2 promovendo o transporte de proteínas específicas situadas no citoplasma para o núcleo, onde ocorre a fosforilação de nucleoproteínas, assim fosforilando proteínas alvo, como receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$) ou $TR\beta1$ (57).

Estudos envolvendo o perfil genômico completo de seres humanos e banco de dados do genoma humano, têm reportado desregulações (aumento ou diminuição) em microRNAs (miRNAs) envolvidos no CM, como let-7a, miR-200a e miR-335(60–65).

Os miRNAs são uma classe de pequenas moléculas não codificadoras de proteínas que regulam a expressão gênica durante a etapa de tradução. Esta regulação é feita por meio do pareamento de bases com o mRNA alvo, resultando na supressão da tradução

ou na clivagem do mRNA(66,67), podendo participar como reguladores de processos biológicos como proliferação, diferenciação, apoptose celular e associando uma nova possibilidade de interferência de ação dos HT nesse nível(66).

Estudos mostram a expressão de miRNAs em tecidos tumorais em relação aos seus respectivos tecidos normais, de forma que os miRNAs se tornem marcadores para diagnóstico de tumores(68). No CM, a desregulação na expressão de miRNAs têm sido detectadas em casos metastáticos e de pior prognóstico, sugerindo funções importantes na oncogênese mamária e na progressão do câncer(62,69,70). Em estudo com linhagens tumorais, miRNAs foram descritos como relacionados à agressividade do CM e a sensibilidade de linhagens tumorais mamárias humanas(71).

Considerando a importância dos miRNAs como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica e o seu envolvimento em várias doenças, incluindo o câncer(66), ainda são poucos dados na literatura sobre a regulação da expressão de miRNAs específicos por HT. Contudo estudos mostram expressão alterada de alguns miRNAs no CM, como let-7a, miR-200 e miR-335(72–74).

Neste estudo avaliamos a linhagem de células eternizadas de CM MCF7, essa célula vem sendo utilizada desde a década de 1980, como modelo de estudo para tumores de mama que expressam receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$) (principal ER expresso nessa célula) e β e também $TR\alpha$ e β (75–78). Essas células foram isoladas em 1970 de uma mulher caucasiana de 69 anos de idade, que passou por duas mastectomias onde a primeira o tecido removido possuía alterações de caráter benigno, porém, cinco anos mais tarde durante sua segunda cirurgia, um adenocarcinoma foi encontrado(79). Durante a remoção dos nódulos da parede peitoral, uma efusão pleural foi descoberta, a partir da qual a linhagem MCF7 foi derivada. Esta linhagem celular possui diversas características de um epitélio mamário diferenciado, incluindo a habilidade de processar

o estradiol por meio de receptores de estrogênio citoplasmáticos (ER) e capacidade de formação de nódulos(79).

Visto que o T3 está associado à proliferação celular e que exerce ação sobre os genes *HIF1A* e *TGFA*, o objetivo desse estudo foi verificar se o T3 ativa as vias MAPK/ERK e integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ para modular a expressão de *HIF1A* e *TGFA*, além de avaliar a capacidade do T3 na manutenção da estabilidade do mRNA desses genes após a inibição da transcrição, em células MCF7. Em paralelo avaliamos se os miRNAs relacionados ao CM, let-7a-5p, miR-200a-3p e miR-335-5p são diferencialmente modulados pelo T3.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Verificar o envolvimento do T3 no controle pós-transcricional da expressão de mRNA *HIF1A* e *TGFA* e avaliar se os miRNAs envolvidos no CM, let-7a-5p, miR-200a-3p e miR-335-5p, são modulados por esse hormônio em células de adenocarcinoma de mama MCF7.

Objetivos específicos

- Analisar a ação do T3 na expressão gênica de *HIF1A* e *TGFA* em células MCF7.
- Analisar se a ação do T3 sobre os níveis de expressão gênica de *HIF1A* e *TGFA* depende da via MAPK/ERK, por meio da administração do inibidor PD98059.
- Analisar se a ação do T3 sobre os níveis de expressão gênica de *HIF1A* e *TGFA* depende da via integrina $\alpha\text{v}\beta 3$, por meio da administração do Peptídeo RGD, o qual se liga ao sítio da integrina $\alpha\text{v}\beta 3$, impedindo a ligação do T3 ao mesmo.

- Analisar a ação do T3 na expressão gênica de *HIF1A* e *TGFA* após a inibição da transcrição em células MCF7, por meio da administração do inibidor específico da RNA polimerase II (α -amanitina).
- Analisar a influência do T3 na expressão dos miRNAs envolvidos no CM, let-7a-5p, miR-200a-3p e miR-335p.

REFERÊNCIAS:

1. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA). Tipos de câncer: Câncer de Mama. [Internet]. [cited 2018 Oct 11]. Available from: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>
2. Fan M, Rickert EL, Chen L, Aftab SA, Nephew KP, Weatherman R V. Characterization of molecular and structural determinants of selective estrogen receptor downregulators. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;103(1):37–44.
3. Prentice RL, Caan B, Chlebowski RT, Ockene JK, Karen L, Limacher MC, et al. Low-Fat Dietary Pattern and Risk of Invasive Breast Cancer. *Am Med Assoc.* 2006;295(6):629–42.
4. Michels KB, Mohllajee AP, Roset-Bahmanyar E, Beehler GP, Moysich KB. Diet and breast cancer: A review of the prospective observational studies. *Cancer.* 2007;109(12 SUPPL.):2712–49.
5. Tworoger SS, Missmer SA, Eliassen AH, Barbieri RL, Dowsett M, Hankinson SE. Physical activity and inactivity in relation to sex hormone, prolactin, and insulin-like growth factor concentrations in premenopausal women: Exercise and premenopausal hormones. *Cancer Causes Control.* 2007;18(7):743–52.
6. Dinda S, Sanchez A, Moudgil V. Estrogen-like effects of thyroid hormone on the regulation of tumor suppressor proteins, p53 and retinoblastoma, in breast cancer cells. *Oncogene.* 2002;21(5):761–8.
7. Conde SJ, Luvizotto R de AM, SÍbio MT de, Saraiva PP, Brentani MM, Nogueira CR. Perfil dos hormônios da tireoide em pacientes com câncer de mama em estado de menopausa. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2012;56(4):238–43.
8. Saraiva PP, Figueiredo NB, Padovani CR, Brentani MM, Nogueira CR. Profile of thyroid hormones in breast cancer patients. *Brazilian J Med Biol Res.* 2005;38(5):761–5.
9. Conde SJ, Luvizotto R de AM, de SÍbio MT, Nogueira CR. Thyroid Hormone Status Interferes with Estrogen Target Gene Expression in Breast Cancer Samples in Menopausal Women. *ISRN Endocrinol.* 2014;2014:1–8.
10. Sauer G DH. Angiogenesis: prognostic and therapeutic implications in gynecologic and breast malignancies. *Curr Opin Obs Gynecol.* 2003;15(1):45–9.

11. Haubner R, Finsinger D, Kessler H. Stereoisomeric Peptide Libraries and Peptidomimetics for Designing Selective Inhibitors of the $\alpha v \beta 3$ Integrin for a New Cancer Therapy. *Angew Chemie Int Ed English*. 1997;36(1314):1374–89.
12. Dang C V, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends in Biochemical Sciences - Cell Press*. 1999;24(1):68–72.
13. Liao D, Johnson RS. Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(2):281–90.
14. Maxwell PH, Wlesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999;399(6733):271–5.
15. Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Biol*. 1999;15:551–78.
16. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol Physiol*. 1996;271(4):1172–80.
17. Wang GL, Jiang B-H, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Genetics*. 1995;92(June):5510–4.
18. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1a. *GENES Dev*. 1998;15:149–62.
19. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*. 2000;88:1474–80.
20. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):721–32.
21. Lundgren K, Holm C, Landberg G. Hypoxia and breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(24):3233–47.
22. Soitamo AJ, Rabergh CM, Gassmann M, Sistonen L, Nikinmaa M. Characterization of a Hypoxia-inducible Factor (HIF-1a) from Rainbow Trout. Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension. *J Biol Chem*. 2001;276(8):19699–705.
23. Sendoel A, Kohler I, Fellmann C, Lowe SW, Hengartner MO. HIF-1 antagonizes p53-mediated apoptosis through a secreted neuronal tyrosinase. *Nature*. 2010;465(7298):577–83.

24. Rocha S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem Sci.* 2007;32(8):389–97.
25. Ke Q, Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol.* 2006;70(5):1469–80.
26. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature.* 1996;379:88–91.
27. Rofstad EK. Microenvironment-induced cancer metastasis. *Int J Radiat Biol.* 2000;76(5):589–605.
28. Subarsky P, Hill RP. The hypoxic tumor microenvironment and metastatic progression. *Clin Exp Metastasis.* 2003;20(3):237–50.
29. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999;59(22):5830–5.
30. Kaur B. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol.* 2005;7(2):134–53.
31. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med.* 2004;36(1):1–12.
32. Duffy JP, Eibl G, Reber HÁ, Hines OJ. Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer. *Mol Cancer.* 2003;2:1–10.
33. Post DE, Devi NS, Li Z, Brat DJ, Kaur B, Nicholson A, et al. Cancer therapy with a replicating oncolytic adenovirus targeting the hypoxic microenvironment of tumors. *Clin Cancer Res.* 2004;10(24):8603–12.
34. Verheul HMW, Voest EE, Schlingemann RO. Are tumours angiogenesis-dependent? *J Pathol.* 2004;202(1):5–13.
35. Rappolee DA, Brenner CA, Schultz R, Mark D, Werb Z. Developmental expression of PDGF, TGF-alpha, and TGF-beta genes in preimplantation mouse embryos. *Science.* 1988;30:1823–5.
36. Mead JE, Fausto N. Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(5):1558–62.
37. Plaut K. Role of epidermal growth factor and transforming growth factors in mammary development and lactation. *J Dairy Sci.* 1993;76(6):1526–38.

38. Booth BW, Smith GH. Roles of transforming growth factor- α in mammary development and disease. *Growth Factors*. 2007;25(4):227–35.
39. Plath A, Einspanier R, Peters F, Sinowatz F, Schams D. Expression of transforming growth factors alpha and beta-1 messenger RNA in the bovine mammary gland during different stages of development and lactation. *J Endocrinol*. 1997;155(3):501–11.
40. Pavelic K, Hrascan R, Kapitanovic S, Karapandza N, Vranes Z, Belicza M, et al. Multiple genetic alterations in malignant metastatic insulinomas. *J Pathol*. 1995;177:395–400.
41. DeNardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: Crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2007;9(4):1–10.
42. Cochaud S, Giustiniani J, Thomas C, Laprevotte E, Garbar C, Savoye AM, et al. IL-17A is produced by breast cancer TILs and promotes chemoresistance and proliferation through ERK1/2. *Sci Rep*. 2013;3:1–10.
43. Lv Z, Liu M, Shen J, Xiang D, Ma Y, Ji Y. Association of serum interleukin-10, interleukin-17A and transforming growth factor- α levels with human benign and malignant breast diseases. *Exp Ther Med*. 2018;15(6):5475–80.
44. Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: Role of hypoxia and anemia. *Med Oncol*. 2001;18(4):243–59.
45. Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, et al. The hypoxia-inducible factor-1 α is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene*. 2003;22(21):3213–20.
46. Moretto FCF, De Sibio MT, Luvizon AC, Olimpio RMC, De Oliveira M, Alves CAB, et al. Triiodothyronine (T3) induces HIF1A and TGFA expression in MCF7 cells by activating PI3K. *Life Sci*. 2016;154:52–7.
47. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev*. 2010;31(2):139–70.
48. Williams GR. Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. *J Neuroendocrinol*. 2008;20(6):784–94.
49. Bernal J. Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007;3(3):249–59.
50. Liu Y, Brent G a. Thyroid Hormone Crosstalk with Nuclear Receptor Signaling in Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(3):166–73.

51. Moeller LC, Broecker-Preuss M. Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. *Thyroid Res.* 2011;4(SUPPL. 1):S6.
52. Moeller LC, Cao X, Dumitrescu AM, Seo H, Refetoff S. Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor β through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Nucl Recept Signal.* 2006;4:3–6.
53. Segalf J, Ingbar SH. Evidence that an Increase in Cytoplasmic Calcium Is the Initiating Event in Certain Plasma Membrane-Mediated. *Endocrinology.* 2015;124(4):1949–55.
54. Davis J, Davis FB. Nongenomic Actions of Thtroid Hormone. *Thyroid.* 1996;6(5):497–504.
55. Incerpi S, Luly P, De Vito P, Farias RN. Short-term effects of thyroid hormones on the Na/H antiport in L-6 myoblasts: High molecular specificity for 3,3',5-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology.* 1999;140(2):683–9.
56. Cheng SY. Thyroid hormone receptor mutations and disease: Beyond thyroid hormone resistance. *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16(4):176–82.
57. Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol.* 2008;29(2):211–8.
58. Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, et al. Integrin $\alpha V\beta 3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology.* 2005;146(7):2864–71.
59. Davis PJ, Davis FB, Mousa SA, Luidens MK, Lin H-Y. Membrane Receptor for Thyroid Hormone: Physiologic and Pharmacologic Implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2011;51(1):99–115.
60. Gravgaard KH, Lyng MB, Laenkholtm AV, Sokilde R, Nielsen BS, Litman T, et al. The miRNA-200 family and miRNA-9 exhibit differential expression in primary versus corresponding metastatic tissue in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;134(1):207–17.
61. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.* 2008;10(5):593–601.
62. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.*

- 2005;65(16):7065–70.
63. Lee YM, Lee JY, Ho CC, Hong QS, Yu SL, Tzeng CR, et al. miRNA-34b as a tumor suppressor in estrogen-dependent growth of breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):R116.
 64. Sun X, Qin S, Fan C, Xu C, Du N, Ren H. Let-7: A regulator of the ER α signaling pathway in human breast tumors and breast cancer stem cells. *Oncol Rep.* 2013;29(5):2079–87.
 65. Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature.* 2008;10:147–52.
 66. Pallante P, Visone R, Croce CM, Fusco A. Deregulation of microRNA expression in follicular cell-derived human thyroid carcinomas. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17(1):91–104.
 67. Khoshnaw SM, Green AR, Powe DG, Ellis IO. MicroRNA involvement in the pathogenesis and management of breast cancer. *J Clin Pathol.* 2009;62(5):422–8.
 68. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435(7043):834–8.
 69. Silveri L, Tilly G, Vilotte JL, Le Provost F. MicroRNA involvement in mammary gland development and breast cancer. *Reprod Nutr Dev.* 2006;46(5):549–56.
 70. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene.* 2007;26(19):2799–803.
 71. Zhao JJ, Lin J, Yang H, Kong W, He L, Ma X, et al. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor α and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *J Biol Chem.* 2008;283(45):31079–86.
 72. Tang J, Ahmad A, Sarkar FH. The role of microRNAs in breast cancer migration, invasion and metastasis. *Int J Mol Sci.* 2012;13(10):13414–37.
 73. Uhlmann S, Zhang JD, Schwäger A, Mannsperger H, Riazalhosseini Y, Burmester S, et al. MiR-200bc/429 cluster targets PLC γ 1 and differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR-200a/141 in breast cancer. *Oncogene.* 2010;29(30):4297–306.
 74. Dangi-Garimella S, Yun J, Eves EM, Newman M, Erkeland SJ, Hammond SM, et al. Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7. *EMBO J.* 2009;28(4):347–58.

75. Nogueira CR, Brentani MM. Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1996;59(3–4):271–9.
76. Brandes LJ, Hermonat MW. Receptor status and subsequent sensitivity of subclones of MCF-7 human breast cancer cells surviving exposure to diethylstilbestrol. *Cancer Res.* 1983;43(6):2831–5.
77. Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL, Levin ER. Plasma Membrane Estrogen Receptors Exist and Functions as Dimers. *Mol Endocrinol.* 2004;18(12):2854–65.
78. McGuire WL, Chamness GC, Costlow ME, Shepherd RE. Hormone dependence in breast cancer. *Metabolism.* 1974;23:75–100.
79. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51(5):1409–16.

Capítulo 2
Artigo científico

Efeito da triiodotironina (T3) no controle pós-transcricional de *HIF1A* e *TGFA* e o envolvimento do miRNA let-7a em células de adenocarcinoma de mama MCF7.

Autores:

Fernanda Cristina Fontes Moretto¹ e Célia Regina Nogueira¹.

¹Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu/São Paulo- Brasil.

Endereço para correspondência:

Fernanda Cristina Fontes Moretto

Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP – Campus de Botucatu

Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX)

Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n – 18618687 - Botucatu/SP – Brasil

E-mail: fer_fontesbtu@hotmail.com

Resumo

O câncer de mama (CM) é o primeiro em taxa de mortalidade em mulheres no mundo e o segundo mais frequente entre as mulheres no Brasil. Os fatores de risco estão relacionados com a idade, fatores ambientais, comportamentais, genéticos/hereditários, história reprodutiva e hormonal, bem como os hormônios tireoidianos (HT) que têm sido propostos por influenciar o desenvolvimento de CM. A superexpressão do fator induzido por hipóxia 1 subunidade alfa (*HIF1A*) e o fator transformador de crescimento alfa (*TGFA*) está positivamente relacionada com a agressividade do tumor e com a progressão maligna em neoplasias humanas, porém não foi avaliada a participação do hormônio triiodotironina (T3) na expressão desses genes em vias extranucleares MAPK/ERK e integrina $\alpha\beta3$. No CM, a desregulação na expressão de microRNAs (miRNA) têm sido detectada em casos metastáticos e de pior prognóstico, sugerindo funções importantes na oncogênese mamária e na progressão do câncer. Nosso objetivo foi verificar o envolvimento do T3 no controle pós-transcricional da expressão de mRNA *HIF1A* e *TGFA* e avaliar se o miRNA let-7a-5p é modulado por esse hormônio em células de adenocarcinoma de mama MCF7. A linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF7 foi submetida ao tratamento com T3 na dose suprafisiológica (10^{-8} M) por 1 hora, na presença ou ausência de drogas específicas para o bloqueio de vias de sinalização intracelulares para abordagem de ações extranucleares dos HT, como PD98059 (inibidor da MAPK/ERK), Peptídeo RGD (que se liga a integrina $\alpha\beta3$) e α -amanitina (inibidor específico da RNA polimerase II), com posterior análise de expressão gênica de *HIF1A* e *TGFA*, assim como, o miRNA let-7a-5p por meio da técnica de RT-qPCR. Os resultados demonstram que a ativação das vias MAPK/ERK e integrina $\alpha\beta3$ pelo T3 são necessárias para modular a expressão de mRNA de *HIF1A* e *TGFA* e a inibição da transcrição gênica demonstra que o T3 não mantém a estabilidade pós-transcricional dos mRNAs estudados em células MCF7. O T3 exerceu efeito supressor na expressão do miRNA let-7a-5p, podendo estar correlacionado com pior progressão tumoral.

Palavras-chave: Hormônio tireoidiano, Adenocarcinoma de mama, *HIF1A*, *TGFA* e miRNA.

1. Introdução

O câncer de mama (CM) é causado pela proliferação anormal e descontrolada de células que sofreram uma ou mais mutações que tem a capacidade de se espalhar pelo organismo podendo resultar em tumor maligno(1).

A superexpressão de alguns genes como o fator indutor de hipóxia 1 subunidade alfa (*HIF1A*) e fator transformador de crescimento alfa (*TGFA*) está positivamente relacionada com a agressividade do tumor e com a progressão maligna em neoplasias humanas(2–4).

Em trabalho prévio demonstramos que o tratamento com o hormônio triiodotironina (T3) na dose suprafisiológica (10^{-8} M), em células de adenocarcinoma de mama MCF7, promove aumento da expressão de mRNA de *HIF1A* e *TGFA*, demonstrando a relação desse hormônio no crescimento tumoral mamário(5).

O gene *HIF1A* é superexpresso em vários tumores humanos (cólon, mama, estômago, pulmão, pele, ovário, próstata, renal e carcinomas pancreáticos) quando comparado com tecidos normais, sendo também mais expresso em lesões pré-malignas do que em lesões benignas(6). Esses resultados enfatizam que *HIF1A* desempenha um papel importante no crescimento do tumor e na progressão a metástase(7). A superexpressão de *HIF1A* no CM humano apresenta importância funcional e provavelmente prognóstica, estando relacionados à carcinogênese mamária e modificações moleculares decorrentes do processo de vascularização tumoral(8), sugerindo seu potencial como biomarcador de lesões pré-cancerosas(6) o que o torna um alvo promissor para o tratamento preventivo(9,10).

O principal efeito do gene *TGFA* é o estímulo da proliferação celular(11), sua expressão foi detectada durante diferentes estágios de desenvolvimento mamário(12). É secretado por vários tipos de células e estimula sua proliferação, diferenciação e

desenvolvimento(13). Têm sido descrito como fator produzido por células tumorais(14) e sua superexpressão pode ocorrer durante a progressão maligna(4).

Estudos mostram a expressão de miRNAs em tecidos tumorais em relação aos seus respectivos tecidos normais, de forma que os miRNAs se tornem marcadores para diagnóstico de tumores(15). Em estudos com linhagens tumorais, o miRNA let-7a foi descrito como relacionado à agressividade do CM(16–18).

As ações dos hormônios tireoidianos (HT) podem ser iniciadas no núcleo por meio dos receptores do HT (TRs), como homodímeros aos elementos responsivos aos hormônios tireoidianos (TRE)(19) ou por meio de mecanismos denominados extranucleares por terem sítio de iniciação na membrana plasmática, citoplasma ou nas mitocôndrias das células(20). Sobre as ações extranucleares dos HT, seus locais de iniciação podem estar na membrana plasmática, como na ativação da integrina $\alpha\text{v}\beta 3$, que ativa a ERK1/2. Ao ocorrer a interação com essa proteína, a via MAPK pode ser ativada que medeia os efeitos extranucleares do T3 sobre a angiogênese(21).

Sendo assim, visto que o T3 está associado à proliferação celular e que exerce ação sobre os genes *HIF1A* e *TGFA*, o objetivo desse estudo foi verificar se o T3 ativa as vias MAPK/ERK e integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ para modular a expressão de *HIF1A* e *TGFA*, além de avaliar a capacidade do T3 na manutenção da estabilidade do mRNA desses genes após a inibição da transcrição, em células MCF7. Em paralelo avaliamos se o miRNA let-7a-5p é modulado pelo T3.

2. Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

RPMI, soro fetal bovino (FBS) e solução de antibiótico-100X foram adquiridos da Gibco BRL (Grand Island, NY, EUA). PD98059 (PD); Peptídio (RGD), alfa-amanitina (α -amanitina), triiodotironina (T3), dimetilsulfóxido (DMSO), hidróxido de sódio (NaOH) e Charcoal Stripped FBS (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA).

2.2 Cultura de células

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Botucatu Faculdade de Medicina, protocolo 3367-2009-D.

A linhagem celular MCF7 (células imortalizadas de CM) foi obtida inicialmente a partir de uma cultura primária de células de CM originárias de uma efusão pleural de paciente do sexo feminino com metástase(22), estas células expressam ER α e β , bem como TR α e β (23–26). A linhagem celular de carcinoma mamário humano MCF7 foi adquirida no banco de células da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) – UNESP, Botucatu. Os experimentos foram realizados em triplicata. Células MCF7 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 1,2g/L de NaHCO₃, Hepes 10nM, pH 7,4 e 10% de FBS. As células foram mantidas a 37°C em 5% de CO₂. A troca de meio foi realizada a cada dois dias. Antes de iniciar o tratamento hormonal e com os inibidores, o meio de cultura foi substituído por meio isento de fenol e 10% de Charcoal Stripped FBS, para eliminar todas as fontes hormonais existentes no meio. Após a incubação, as células foram tratadas com T3 na dose suprafisiológica 10⁻⁸M durante 1h, associado ou não aos inibidores, PD (5 μ M; grupo T3+PD); RGD (100 μ g/ml; grupo T3+RGD) e α -amanitina (50 μ g/ml; grupo T3+ α -amanitina). O grupo não tratado recebeu apenas 0,1 % de NaOH (diluyente de T3) e foi utilizado como

controle (C). O RGD e α -amanitina foram adicionados ao meio 1h antes do tratamento com T3.

2.3 Expressão gênica

O RNA total foi extraído utilizando o kit mirVana™ miRNA Isolation Kit (Life Tech, EUA), seguindo-se a recomendação do fabricante. A transcrição reversa dos mRNAs obtidos da cultura celular foi realizada utilizando o kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Para a reação foram utilizados 4 μ L de Master Mix para a transcrição reversa ao qual foi adicionado 1 μ g de RNA e o volume final ajustado para 20 μ L com água livre de nucleases. A mistura foi incubada nas seguintes condições: 25°C por 5 min., 42°C por 30 min, seguido da inativação da transcriptase reversa a 85°C por 5 min. Para geração do cDNA de miRNA foi usado o kit Taqman microRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Foram utilizados 10ng de RNA total e *stem-loop primers* específicos para síntese de cada cDNA, para posterior análise por qPCR. As amostras foram feitas nas seguintes condições: 16°C por 30 min, 42°C por 30 min, seguido da inativação da transcriptase reversa a 85°C por 5 min. Cada amostra de cDNA (miRNA e mRNA) foi analisada com ensaios *TaqMan* (Life Technologies, EUA), contendo primers específicos para os mRNAs e miRNAs alvos. Para cada reação, foram utilizados 10 μ L de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technologies, EUA), 4 μ L do produto da reação de transcrição reversa e o volume final ajustado para 20 μ L com água livre de nucleases. As amostras foram normalizadas pelo controle interno *GAPDH*, para mRNA e o snRNA U6, para miRNA, e a quantificação da expressão foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (27).

2.4 Análise estatística

Os dados expressos em média $\pm$ desvio-padrão foram submetidos à ANOVA complementado com o teste de Tukey para a expressão de mRNA e teste t de Student para o miRNA. O nível de significância considerado foi 5%.

3. Resultados

3.1 PCR quantitativa em Tempo Real

Tratamentos com inibidores PD98059, RGD e α -amanitina não teve efeito na expressão de mRNA de *HIF1A* e *TGFA* em células MCF7 (Fig. 1A e 1B).

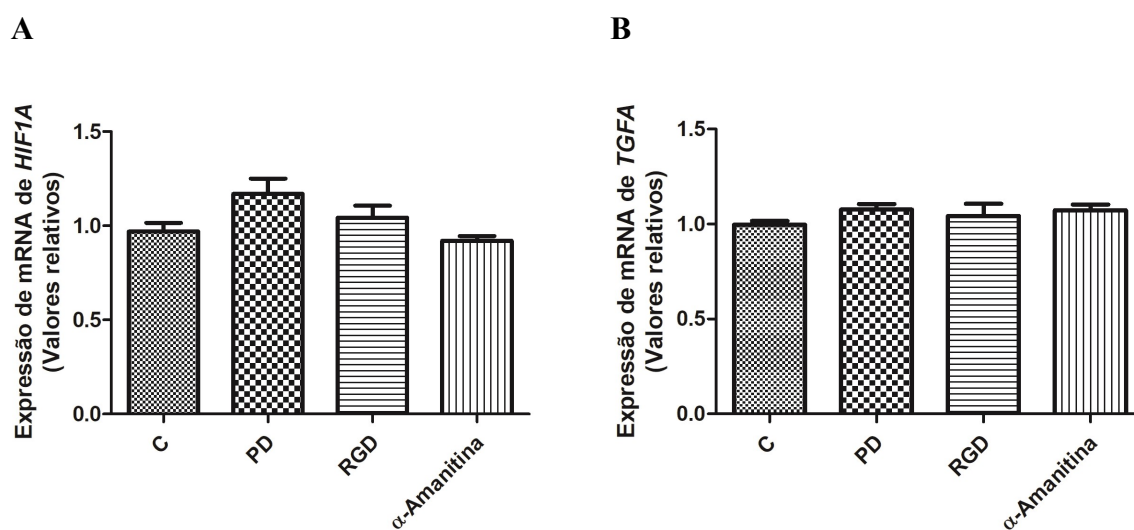


Figura 1. Tratamento com os inibidores PD98059, RGD e α -Amanitina comparados ao grupo controle (C) sobre a expressão de mRNA de *HIF1A* e *TGFA* em células MCF7. C, Controle = ausência de tratamento; PD, PD98059; RGD, Peptídeo RGD; α -amanitina, inibidor α -amanitina. Os tratamentos foram realizados no tempo de 1 hora. Dados expressos em média $\pm$ desvio-padrão, ANOVA complementada com o teste de Tukey; n = 3 em cada tratamento. *p<0.05.

3.1.1. Inibição da via MAPK/ERK diminui ação do T3 na expressão de mRNA de *HIF1A* e *TGFA* em células MCF7.

Para determinar se o tratamento com T3 tem efeito sobre a expressão de mRNA de *HIF1A* e *TGFA* pela via MAPK/ERK, utilizamos o inibidor PD98059. Após inibir a via MAPK/ERK ocorreu a diminuição da ação do T3 na expressão desses genes, comprovando o envolvimento desta via para a ação do T3 (Fig. 2A e 2B).

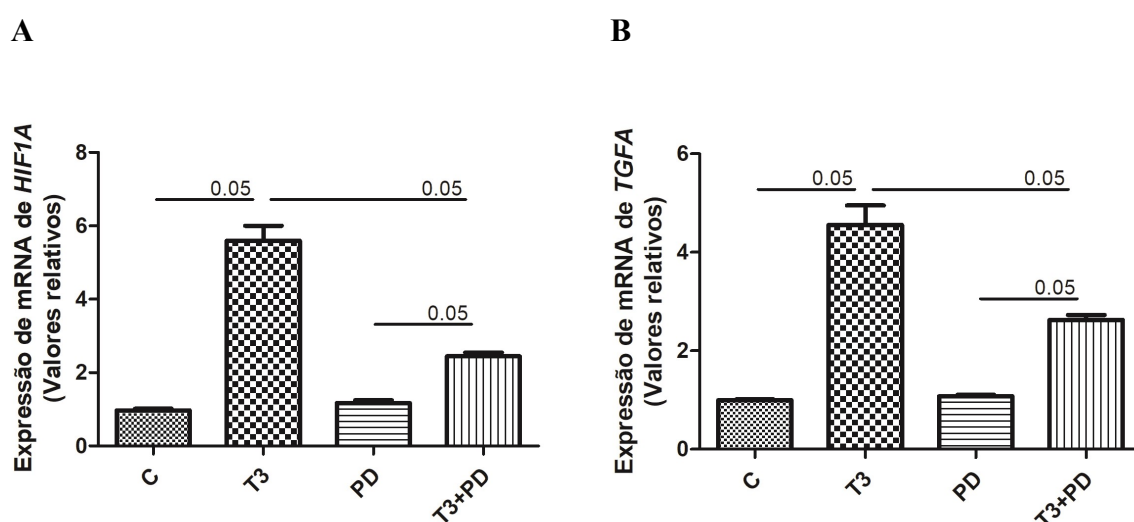


Figura 2. Efeito do T3 associado ao inibidor PD98059 sobre a expressão de mRNA de *HIF1A* e *TGFA* em células MCF7. C, Controle = ausência de tratamento; T3, triiodotironina; PD, PD98059; T3+PD, triiodotironina associada ao PD98059. Os tratamentos foram realizados no tempo de 1 hora. Dados expressos em média $\pm$ desvio-padrão, ANOVA complementada com o teste de Tukey; $n = 3$ em cada tratamento. * $p < 0.05$.

3.1.2. Ativação da via integrina $\alpha v \beta 3$ pelo T3 é necessária para a modulação dos genes *HIF1A* e *TGFA* em células MCF7.

Para determinar se o T3 depende da ativação da via integrina para a regulação da expressão dos genes *HIF1A* e *TGFA*, utilizamos o peptídeo RGD em células MCF7. Observamos a diminuição da ação do T3 na expressão desses genes (Fig 3A e 3B).

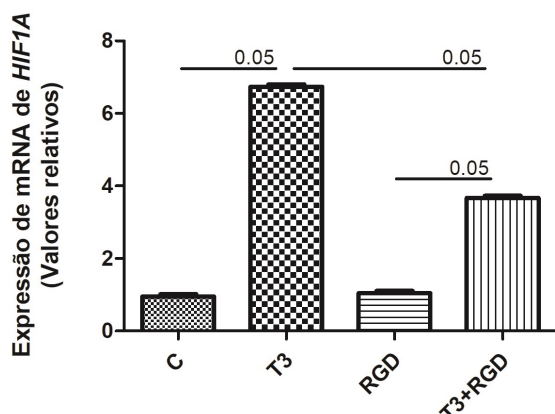
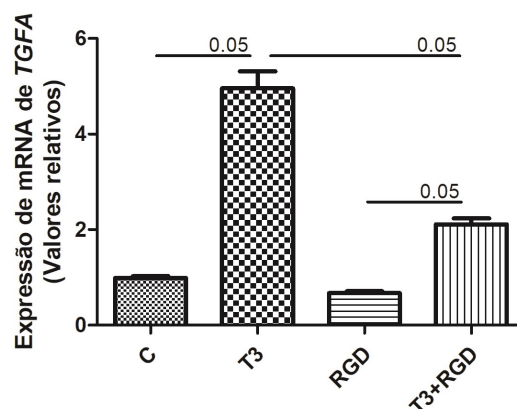
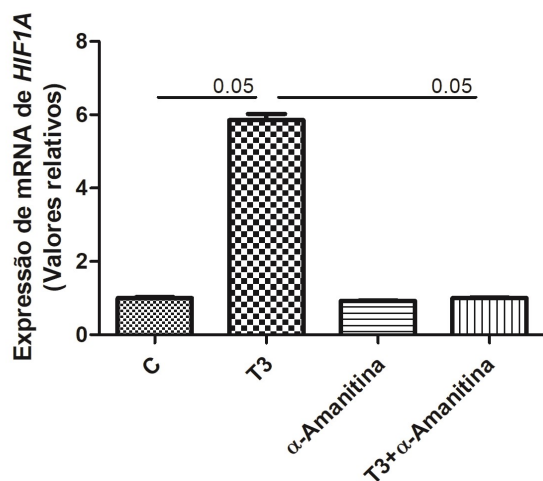
A**B**

Figura 3. Efeito do T3 associado ao Peptídeo RGD sobre a expressão de mRNA de *HIF1A* e *TGFA* em células MCF7. C, Controle = ausência de tratamento; T3, triiodotironina; RGD, Peptídeo RGD; T3+RGD, triiodotironina associada ao Peptídeo RGD. Os tratamentos foram realizados no tempo de 1 hora. Dados expressos em média $\pm$ desvio-padrão, ANOVA complementada com o teste de Tukey; n = 3 em cada tratamento. *p<0.05.

3.1.3. Inibição da transcrição gênica bloqueia o efeito do T3 em *HIF1A* e diminui sua ação em *TGFA* em células MCF7.

Para analisar o efeito do T3 na expressão de mRNA de *HIF1A* e *TGFA*, quando a via polimerase II está inibida, utilizamos o inibidor α -amanitina. O T3 não estimulou a expressão de *HIF1A* após a inibição da transcrição gênica, ocorrendo o bloqueio total desse gene e manteve a estabilidade do mRNA já existente para modular a expressão de *TGFA*, pois não há supressão total, mesmo sem a transcrição (Fig 4A e 4B).

A



B

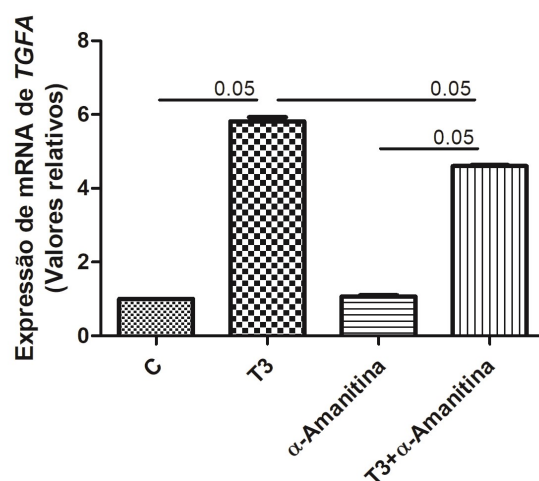


Figura 4. Efeito do T3 associado ao inibidor α -amanitina sobre a expressão de mRNA de *HIF1A* e *TGFA* em células MCF7. C, Controle = ausência de tratamento; T3, triiodotironina; α -amanitina, inibidor α -amanitina; T3+ α -amanitina, triiodotironina associada ao inibidor α -amanitina. Os tratamentos foram realizados no tempo de 1 hora. Dados expressos em média $\pm$ desvio-padrão, ANOVA complementada com o teste de Tukey; n = 3 em cada tratamento. *p<0.05.

3.2 Tratamento com T3 diminui a expressão do miRNA let-7a-5p em células MCF7.

A expressão do miRNA let-7a-5p diminui no tratamento com T3, demonstrando efeito supressor na expressão desse miRNA.

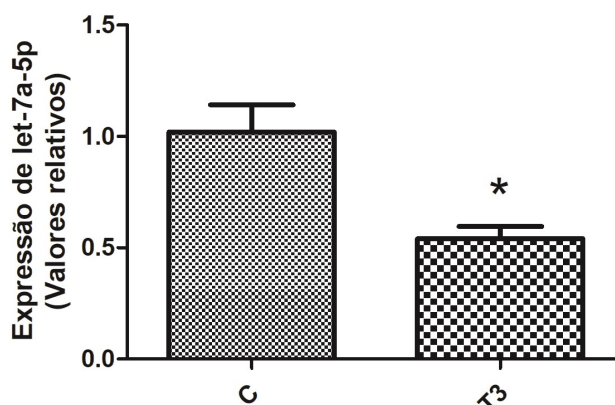


Figura 5. Influência do T3 na expressão do miRNA let-7a-5p em células MCF7. C, Controle = ausência de tratamento; T3, triiodotironina. Os tratamentos foram realizados no tempo de 1 hora. Dados expressos em média $\pm$ desvio-padrão, teste t de Student; n = 3 em cada tratamento. *p<0.05.

4. Discussão e conclusão

Para verificar a ação extranuclear do T3, inibimos as vias MAPK/ERK, integrina $\alpha\beta3$ e a transcrição gênica com o objetivo de analisar seu efeito na expressão de mRNA de *HIF1A* e *TGFA*, em células MCF7. Demonstramos que esse hormônio ativa as vias MAPK/ERK e integrina $\alpha\beta3$ para modular a expressão dos genes estudados, além de avaliar sua capacidade na manutenção da estabilidade do mRNA após a inibição da transcrição. Analisando a expressão de let-7a-5p, observamos que o T3 exerceu efeito supressor na expressão desse miRNA, podendo estar correlacionado com progressão tumoral nessa linhagem celular.

Estudos anteriores indicam que *HIF1A* é superexpresso em vários tipos de câncer principalmente o CM(28–30). Altos níveis de expressão de *HIF1A* no CM estão relacionados a modificações moleculares decorrentes do processo de vascularização tumoral(14).

A literatura relata que as citocinas interleucina-17A (IL-17A) e *TGFA* estão envolvidas na iniciação e progressão de doenças mamárias(13,31,32). Em estudo recente, os níveis séricos de *TGFA* em pacientes com carcinoma ductal foram significativamente maior em relação a indivíduos saudáveis, sugerindo que o *TGFA* pode promover o desenvolvimento de tumores e estar associado a um estágio clínico mais grave de carcinoma. Assim, essa citocina pode ser desenvolvida como biomarcadores diagnósticos e prognósticos do câncer(33).

De acordo com os resultados obtidos em estudo anterior, onde demonstramos que o T3 age via extranuclear(5), justifica-se analisar a ação rápida desse hormônio que incluem as vias MAPK/ERK, integrina $\alpha\beta3$ e a transcrição gênica, na expressão dos genes *HIF1A* e *TGFA* em linhagem celular MCF7.

A via de sinalização MAPK desempenha um papel fundamental na proliferação celular e sua atividade é regulada por diversos sinais extracelulares(113). A análise da expressão de MAPK revelou sua superexpressão em tumores primários de mama humanos e em células metastáticas dentro de linfonodos envolvidos em pacientes com câncer de mama(114). Após inibir a via MAPK/ERK observamos a diminuição da ação do T3 na expressão gênica de *HIF1A* e *TGFA*, comprovando o envolvimento desta via para a ação do T3.

Quando a via integrina foi inibida, o efeito do T3 foi reduzido em ambos os genes estudados, o que corrobora com as pesquisas feitas por grupos que demonstraram a importância dos HT na modulação de canais de Na^+/H^+ na ativação de proteínas cinases via integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ (34,35).

A regulação da estabilidade do mRNA é considerada como sendo um importante ponto de controle da expressão do gene(36). Notamos que a transcrição gênica é fundamental para a ação do T3 na ativação de *HIF1A* e *TGFA*, visto que, quando a via polimerase II está inibida o T3 em associação ao inibidor α -amanitina não foi capaz de estimular a expressão de *HIF1A* e diminuiu a expressão de *TGFA* em relação à ação isolada do HT. Estudo realizado pelo nosso grupo evidenciou uma importante diminuição na expressão gênica de *HIF1A* e *TGFA* após inibição da transcrição gênica com uso de Actinomicina D (ACTD) associado ao T3(5), corroborando com nosso atual estudo onde a inibição da transcrição gênica, por meio do uso de α -amanitina, demonstra que o T3 não mantém a estabilidade pós-transcricional de *HIF1A* evidenciando que a inibição da transcrição gênica é capaz de bloquear a ação do T3 para esse gene e manteve a estabilidade do mRNA já existente para modular a expressão de *TGFA*, pois não há supressão total, mesmo sem a transcrição.

Estudos envolvendo o perfil genômico completo de seres humanos e banco de dados do genoma humano, têm reportado desregulações (aumento ou diminuição) em microRNAs (miRNAs) envolvidos na piora prognóstica do CM(17,37,38), visto que, tais alterações podem afetar o ciclo celular e programação da diferenciação celular(39) podendo ser regulados por oncogenes ou supressores tumorais(40).

No CM, a desregulação na expressão de miRNAs demonstram perfis característicos da doença e têm sido detectadas em casos metastáticos e de pior prognóstico, sugerindo funções importantes na oncogênese mamária e na progressão do câncer(17,41,42).

Analisando a expressão dos miRNAs miR-200a e miR-335, podemos concluir que o tratamento com T3 não interfere na expressão desses miRNAs na linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF7 (resultados em anexo).

Avaliamos que a célula MCF7 expressa níveis elevados de let -7a-5p. Estudos verificaram que a família miR-let-7 pode favorecer a ocorrência de apoptose na linhagem MCF7 pela inibição da expressão do receptor ER α (43). Nosso resultado demonstra que o T3 exerceu efeito supressor na expressão de let-7a-5p, podendo estar correlacionado com pior progressão tumoral, visto que altas expressões de let-7 podem prevenir a progressão, como relatado por autores que propuseram possível efeito positivo em relação à superexpressão de let-7a em tipos de tumores humanos, incluindo mama(17,43) sugerindo o envolvimento do miRNA let-7 como um gene supressor tumoral.

Portanto, visto a importância de trabalhos que demonstrem o mecanismo pelo qual os HT podem alterar a expressão de genes ligados à proliferação do CM ou de outros tipos de câncer, nosso estudo confirma que o T3 age via extranuclear para a expressão de *HIF1A* e *TGFA* possuindo papel relevante sobre células de adenocarcinoma de mama MCF7, contribuindo com possibilidades terapêuticas que facilitem o tratamento dessa doença.

Referências

1. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA). Tipos de câncer: Câncer de Mama. [Internet]. [cited 2018 Oct 11]. Available from: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>
2. Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: Role of hypoxia and anemia. *Med Oncol*. 2001;18(4):243–59.
3. Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, et al. The hypoxia-inducible factor-1 α is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene*. 2003;22(21):3213–20.
4. Pavelic K, Hrascan R, Kapitanovic S, Karapandza N, Vranes Z, Belicza M, et al. Multiple genetic alterations in malignant metastatic insulinomas. *J Pathol*. 1995;177:395–400.
5. Moretto FCF, De Sibio MT, Luvizon AC, Olimpio RMC, De Oliveira M, Alves CAB, et al. Triiodothyronine (T3) induces HIF1A and TGFA expression in MCF7 cells by activating PI3K. *Life Sci*. 2016;154:52–7.
6. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*. 1999;59(22):5830–5.
7. Kaur B. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol*. 2005;7(2):134–53.
8. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*. 2004;36(1):1–12.
9. Duffy JP, Eibl G, Reber HA, Hines OJ. Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2003;2:1–10.
10. Post DE, Devi NS, Li Z, Brat DJ, Kaur B, Nicholson A, et al. Cancer therapy with a replicating oncolytic adenovirus targeting the hypoxic microenvironment of tumors. *Clin Cancer Res*. 2004;10(24):8603–12.
11. Mead JE, Fausto N. Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(5):1558–62.
12. Plath A, Einspanier R, Peters F, Sinowatz F, Schams D. Expression of transforming growth factors alpha and beta-1 messenger RNA in the bovine

- mammary gland during different stages of development and lactation. *J Endocrinol.* 1997;155(3):501–11.
13. Booth BW, Smith GH. Roles of transforming growth factor- α in mammary development and disease. *Growth Factors.* 2007;25(4):227–35.
 14. Verheul HMW, Voest EE, Schlingemann RO. Are tumours angiogenesis-dependent? *J Pathol.* 2004;202(1):5–13.
 15. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435(7043):834–8.
 16. Zhao JJ, Lin J, Yang H, Kong W, He L, Ma X, et al. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor α and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *J Biol Chem.* 2008;283(45):31079–86.
 17. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65(16):7065–70.
 18. Sun X, Qin S, Fan C, Xu C, Du N, Ren H. Let-7: A regulator of the ER α signaling pathway in human breast tumors and breast cancer stem cells. *Oncol Rep.* 2013;29(5):2079–87.
 19. Moeller LC, Broecker-Preuss M. Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. *Thyroid Res.* 2011;4(SUPPL. 1):S6.
 20. Moeller LC, Cao X, Dumitrescu AM, Seo H, Refetoff S. Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor β through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Nucl Recept Signal.* 2006;4:3–6.
 21. Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, et al. Integrin α V β 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology.* 2005;146(7):2864–71.
 22. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51(5):1409–16.
 23. Nogueira CR, Brentani MM. Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1996;59(3–4):271–9.
 24. Brandes LJ, Hermonat MW. Receptor status and subsequent sensitivity of subclones of MCF-7 Human breast cancer cells surviving exposure to

- diethylstilbestrol. *Cancer Res.* 1983;43(6):2831–5.
25. Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL, Levin ER. Plasma Membrane Estrogen Receptors Exist and Functions as Dimers. *Mol Endocrinol.* 2004;18(12):2854–65.
 26. McGuire WL, Chamness GC, Costlow ME, Shepherd RE. Hormone dependence in breast cancer. *Metabolism.* 1974;23:75–100.
 27. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-(Delta Delta CT) Method. *Methods.* 2001;25:402–8.
 28. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(10):721–32.
 29. Lundgren K, Holm C, Landberg G. Hypoxia and breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(24):3233–47.
 30. Soitamo AJ, Rabergh CM, Gassmann M, Sistonen L, Nikinmaa M. Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha) from rainbow trout. Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension. *J Biol Chem.* 2001;276(23):19699–705.
 31. DeNardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: Crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 2007;9(4):1–10.
 32. Cochaud S, Giustiniani J, Thomas C, Laprevotte E, Garbar C, Savoye AM, et al. IL-17A is produced by breast cancer TILs and promotes chemoresistance and proliferation through ERK1/2. *Sci Rep.* 2013;3:1–10.
 33. Lv Z, Liu M, Shen J, Xiang D, Ma Y, Ji Y. Association of serum interleukin-10, interleukin-17A and transforming growth factor- α levels with human benign and malignant breast diseases. *Exp Ther Med.* 2018;15(6):5475–80.
 34. Incerpi S, Luly P, De Vito P, Farias RN. Short-term effects of thyroid hormones on the Na/H antiport in L-6 myoblasts: High molecular specificity for 3,3',5-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology.* 1999;140(2):683–9.
 35. Slepikov E, Fliegel L. Regulation of expression of the Na⁺/H⁺ exchanger by thyroid hormone. *Vitam Horm.* 2004;69:249–69.
 36. Guhaniyogi J, Brewer G. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene.* 2001;265(1–2):11–23.
 37. Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD et al.

- Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*. 2008;10:147–52.
38. Jiang Q, Wang Y, Hao Y, Juan L, Teng M, Zhang X, et al. miR2Disease: A manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(SUPPL. 1):98–104.
 39. Yu F, Deng H, Yao H, Liu Q, Su F SE. Mir-30 reduction maintains self-renewal and inhibits apoptosis in breast tumor-initiating cells. *Oncogene*. 2010;29:4194–204.
 40. Di Leva G, Croce CM. Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends Mol Med*. 2010;16(6):257–67.
 41. Silveri L, Tilly G, Vilotte JL, Le Provost F. MicroRNA involvement in mammary gland development and breast cancer. *Reprod Nutr Dev*. 2006;46(5):549–56.
 42. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 2007;26(19):2799–803.
 43. Zhao Y, Deng C, Wang J, Xiao J, Gatalica Z, Recker RR, et al. Let-7 family miRNAs regulate estrogen receptor alpha signaling in estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;127(1):69–80.

Capítulo 3
Anexos

Anexo 1. Protocolo Comitê de Ética

 Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina de Botucatu	 Registro no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1808 / 3880-1809 e-mail secretaria: capellus@fmb.unesp.br kleber@fmb.unesp.br e-mail coordenadoria: amoliva@fmb.unesp.br	
Botucatu, 07 de maio de 2015	
OF. 49/2015-CEP	
Ilustríssima Senhora Profª Drª Célia Regina Nogueira Departamento de Clínica Médica Faculdade de Medicina de Botucatu	
Prezada Dra Célia,	
Informo que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 3367-2009) "Efeito não genômico de tratamento com T3 e E2 na expressão gênica de Amphiregulin em células tumorais de mama", cujo título foi alterado para: "Ação do hormônio triiodotironina (T ₃) altera a expressão gênica do oncogene Amphiregulin (AREG) em células tumorais de adenocarcinoma de mama" conduzido por Maria Tereza de Sábio, orientada pela Profª Drª Célia Regina Nogueira e Co-orientada pelo Prof. Dr. Sandro José Conde, aprovado por este colegiado em 09/11/2009 conta com os "sub-projetos" abaixo à saber:	
Sub-Projeto I: (Protocolo CEP 3367-2009-A) "Efeito não genômico do tratamento com T3 e E2 na expressão gênica e protéica de Amphiregulin em células tumorais de mama" que foi objeto de Pós Doutorado do Prof. Dr. Sandro José Conde.	
Sub-Projeto II: (Protocolo CEP 3367-2009-B) "Ações extra-nucleares de Triiodotironina e Estradiol em linhagem celular de adenocarcinoma mamário", o qual teve seu título alterado para: "Ação extra-nuclear do hormônio (T ₃) na expressão gênica de HIF-1 α em linhagem celular de adenocarcinoma mamário" que foi objeto de Mestrado de Fernanda Cristina Fontes Moreto, orientada pela Profª Drª Célia Regina Nogueira e Co-orientada pelo Prof. Dr. Sandro José Conde.	

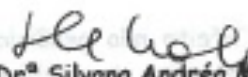


Sub-Projeto III: (Protocolo CEP 3367-2009-C) "Mecanismo de ação do estrógeno no gene amphiregulin em células MCF7 e MDA-MB-231 via PI3K", que será objeto de Doutorado de Aline Carbonera Luvizon, orientada pela Profª Drª Denise Féchio, Co-orientada pela Profª Drª Célia Regina Nogueira.

Em 07 de Maio de 2015 autorizamos a inclusão de:

Sub-Projeto VI: (Protocolo CEP 3367-2009-D) "Participação do T3 no controle pós-transcricional da expressão de HIF-1α e TGFα em linhagem celular de adenocarcinoma de mama e avaliação do envolvimento de potenciais miRNAs", a ser conduzido por Fernanda Cristina Fontes Moretto, orientada pela Profª Drª Célia Regina Nogueira, com objetivo de Tese de Doutorado. O projeto prevê realização RT-PCR em que ocorre o aproveitamento do cDNA e Western Blot, porém serão utilizadas as mesmas amostras não correndo alteração ou necessidade de amostras adicionais, apenas aproveitando o material armazenado.

Atenciosamente,


Profª Drª Silvana Andréa Molina Lima
Coordenadora do CEP.

Anexo 2. Tratamentos das células com hormônio e inibidores

Antes de iniciar o tratamento, o meio de cultura foi substituído por meio isento de fenol e 10% de Charcoal Stripped FBS, para eliminar todas as fontes hormonais existentes no meio.

Desenho experimental dos tratamentos em células MCF7.

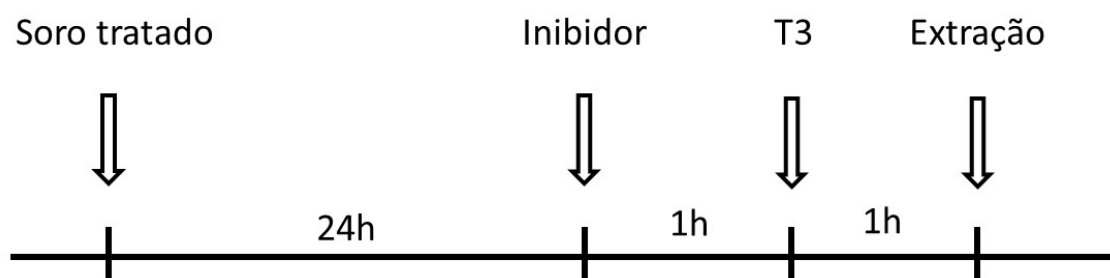


Figura 3. Tratamentos das células com hormônios e inibidores.

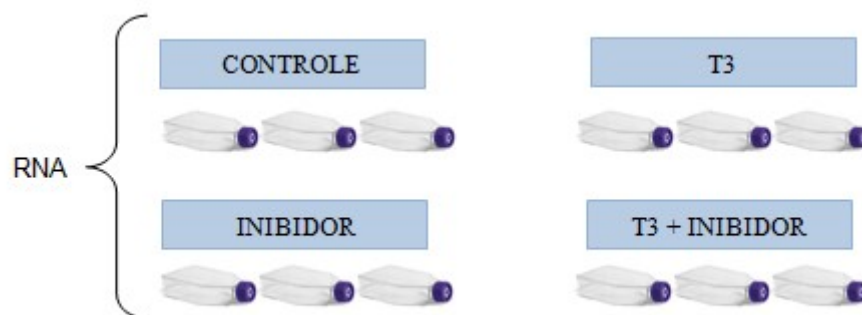


Figura 4. Diagrama correspondente ao número de garrafas necessárias de cada tratamento para a realização do experimento, ilustrando a divisão dos grupos de estudo.

Anexo 3. Cultivo das células MCF7.

O cultivo da linhagem MCF7 ocorreu de maneira satisfatória, mostrando a capacidade de aderência, expansão e viabilidade das células *in vitro*.

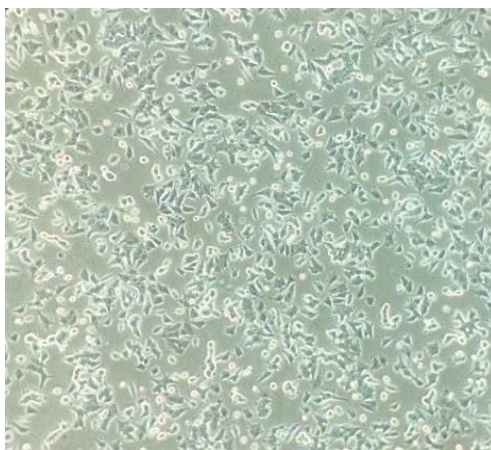


Figura 5. Cultura das células MCF7 observada em microscópio óptico.

Anexo 4. Quantificação de RNA

Tabela 1. Quantificação de RNA para cultura celular MCF7 (Tratamento PD)

Tratamento	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280	260/230	[] RNA
C1	9,89	4,648	2,13	1,94	395,6
C2	10,862	5,085	2,14	1,16	434,5
C3	8,817	4,142	2,13	1,91	352,7
T3 1	11,655	5,46	2,13	1,85	466,2
T3 2	10,361	4,855	2,13	2,09	414,5
T3 3	10,034	4,696	2,14	1,51	401,3
PD 1	9,905	4,649	2,13	0,95	396,2
PD 2	11,852	5,547	2,14	1,88	474,1
PD 3	10,618	4,966	2,14	2,02	424,7
T3+ PD 1	11,655	5,451	2,14	1,26	466,2
T3+ PD 2	9,859	4,593	2,15	2,04	394,4
T3+ PD 3	12,003	5,601	2,14	1,77	480,1

Tabela 2. Quantificação de RNA para cultura celular MCF7 (Tratamento RGD)

Tratamento	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280	260/230	[] RNA
C1	5,475	2,591	2,11	0,97	219
C2	3,488	1,645	2,12	1,74	139,5
C3	6,074	2,847	2,13	1,83	243
T3 1	2,925	1,405	2,08	1,07	117
T3 2	3,274	1,554	2,11	1,1	131
T3 3	4,167	1,962	2,12	1,58	166,7
RGD 1	4,373	2,086	2,1	1,23	174,9
RGD 2	4,287	2,035	2,11	1,07	171,5
RGD 3	3,6	1,709	2,11	1,8	144
T3+RGD 1	3,709	1,758	2,11	1,29	148,3
T3+RGD 2	4,112	1,957	2,1	1,48	164,5
T3+RGD 3	3,203	1,558	2,06	0,44	128,1

Tabela 3. Quantificação de RNA para cultura celular MCF7 (Tratamento α -amanitina)

Tratamento	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280	260/230	[] RNA
C1	17,87	8,413	2,12	0,99	715
C2	14,74	6,968	2,12	1,28	589,7
C3	17,23	8,039	2,14	1,02	689,4
T3 1	15,66	7,249	2,16	1,22	626,5
T3 2	17,09	8,002	2,14	0,95	683,8
T3 3	15,91	7,507	2,12	1,28	636,5
α – Amanitina 1	15,13	7,127	2,12	1,82	605,5
α – Amanitina 2	14,31	6,757	2,12	1,63	572,8
α – Amanitina 3	16,36	7,716	2,12	1,91	654,6
T3+ α 1	16,84	7,875	2,14	1,49	673,8
T3+ α 2	15,66	7,386	2,12	2,03	626,5
T3+ α 3	14,48	6,739	2,15	1,58	579,4

Anexo 5. Influência do T3 na expressão de miR-200a-3p e miR-335-5p em células MCF7.

Analisando a expressão dos miRNAs, podemos concluir que o tratamento com T3 não interfere na expressão dos miR-200a (A) e miR-335 (B) na linhagem celular de adenocarcinoma de mama (MCF7).

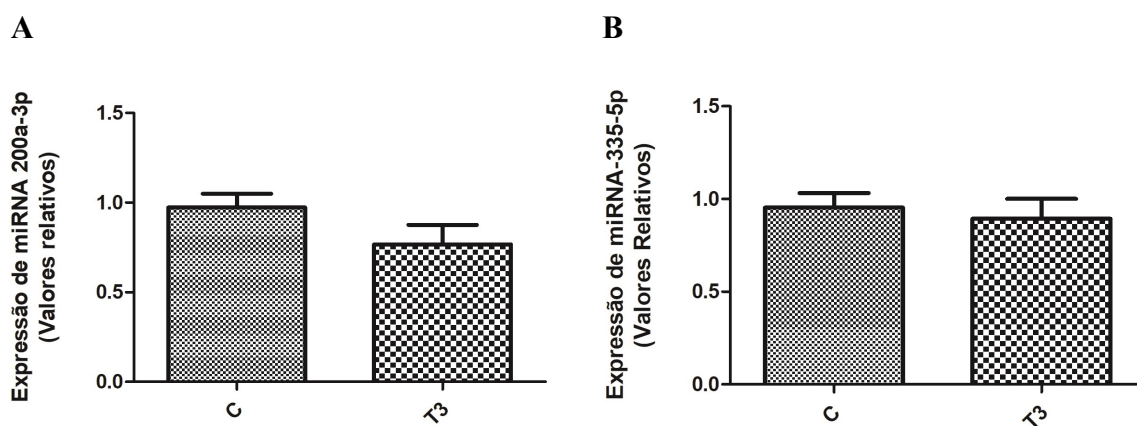


Figura 6. Influência do T3 na expressão dos miRNAs 200a-3p e 335-5p em células MCF7. C, Controle = ausência de tratamento; T3, triiodotironina. Os tratamentos foram realizados no tempo de 1 hora. Dados expressos em média $\pm$ desvio-padrão, teste t de Student; n = 3 em cada tratamento. *p<0.05.