



UNESP- Universidade Estadual Paulista

Faculdade de Medicina de Botucatu

Departamento de Clínica Médica – Laboratório Biologia Molecular

**AÇÃO DO HORMÔNIO TRIIODOTIRONINA (T_3)
ALTERA A EXPRESSÃO GÊNICA DO ONCOGENE
AMPHIREGULIN (AREG) EM CÉLULAS TUMORAIS
DE ADENOCARCINOMA DE MAMA**

Maria Teresa De Sibio

BOTUCATU

2014

Maria Teresa De Sibio

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

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
“Fisiopatologia em Clínica Médica – Área de Concentração:
Ciências da Saúde” da Faculdade de Medicina da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para a obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Profa. Adjunta Dra. Célia Regina Nogueira

Coorientadora: Profa. Assistente Dra Paula de Oliveira Montandon Hokama

BOTUCATU

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Sibio, Maria Teresa De.

Ação do Hormônio Triiodotironina (T3) altera a expressão gênica do oncogene Amphiregulin (AREG) em células tumorais de adenocarcinoma de mama / Maria Teresa De Sibio. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Célia Regina Nogueira

Coorientador: Paula de Oliveira Montandon Hokama

Capes: 40101002

1. Mamas - Câncer. 2. Hormônios tireoidianos. 3. Triiodotironina. 4. Expressão gênica. 5. Adenocarcinoma.

Palavras-chave: Hormônio Tireoidiano, Triiodotironina, Câncer de mama e Oncogene.

A DEUS, que em toda sua infinita grandeza e generosidade me deu meios e tornou-me apta a conduzir e concluir este trabalho, permitindo assim passar por mais essa etapa da minha vida.

Aos meus pais, Antonio Roberto e Maria Inês, minha irmã Paula e meu cunhado Wilker, que são referência para mim ao longo de toda minha vida, incentivadores e orgulhosos. Obrigada pelo imenso e incondicional amor, constante estímulo, enorme dedicação, paciência, compreensão e pelas orações. Meu reconhecimento e eterna gratidão. Sem vocês eu nada seria.

Aos meus avós Abílio e Maria e ao meu tio Claudio que estiveram sempre presentes e torcendo por mim, obrigada por estarem sempre ao meu lado.

Ao Anderson meu noivo e companheiro, por compartilhar diariamente com paciência e compreensão a cada momento deste trabalho e situações difíceis das nossas vidas sempre com muito amor.

Agradecimentos

À Dr^a. Célia Regina Nogueira, minha orientadora e mais que isso uma grande pessoa, meu muito obrigado pela amizade, carinho, paciência e orientação ao longo de todos esses anos, sempre me indicando as melhores direções.

Ao “Grupo da Bio Mol” meus companheiros diários: Fernanda, Miriane, Regiane e Sandro, que tive o prazer de conhecer nessa minha caminhada e que além de serem amigos de verdade, ajudaram diretamente nessa conquista.

Aos colegas de Laboratório Experimental da Clínica Médica: Adriana, Andréia, Arthur, Bonomo, Camilinha, Carlos, Damiana, Dany Tomaz, Danielle Vileigas, Fabi, Maria Eugênia, Neide, Paulinha Paccielle, Paulinha-ES, Priscila, Loreta, Luana, Tamara. A amizade e ajuda de vocês foram essenciais.

Aos meus sempre amigos de Pós-Graduação, Aline (Moranguinho), Dijon, Marcelo, e Ricardo, juntos novamente no termino de mais uma etapa, desejo a vocês muito sucesso! E agradeço muito por ter trilhado esse caminho com vocês, que se tornaram grandes amigos!!

À Sueli Clara, muito obrigada por todos esses anos de amizade e trabalho, por me receber no laboratório experimental e partilhar seu conhecimento. Sou muito agradecida pela paciência e carinho.

Aos funcionários do Departamento e do Laboratório Experimental da Clínica Médica Alexandre Loureiro, Ana Mengue, Ângelo, Bruno Fajiolli, Bruno Silva, Camila Corrêa Camacho, Corina Corrêa, Elenize Jamas, Elizangela Silva, Igor Depra, José Aparecido de Souza (Boca), José Carlos Georgete (Zé), Mário Bruno, Renata Capela, Paulinha; Renato Pereira, Rogério Monteiro, Sandra Fábio, Sueli Garcia, e as tias da limpeza, todos sempre dispostos a ajudar no que fosse necessário.

À Renata Luvizotto, exemplo de pesquisadora, profissional e amiga. Sempre disposta a ajudar, independente da distância. Aprendi muitas coisas com você na parte científica e pessoal. Obrigada por toda ajuda e amizade!!

À Dr^a. Paula de Oliveira Montandon Hokama, muito obrigada pela ajuda como coorientadora e profissional, pelo carinho e dedicação com que cuidou do meu avô no momento difícil de nossas vidas.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Cicogna pelo conhecimento transmitido.

À Dr^a Denise Fecchio e seus orientados Aline Carbonera e Igor Minatel por ceder um espaço no laboratório de Patologia e pela fundamental ajuda.

A Banca de Qualificação: Dra. Vânia e Dr. Robson, pelas sugestões e correções para que este trabalho pudesse ser finalizado.

À banca de Defesa: Dra. Gláucia, Dra. Maria Tereza, Dra. Patrícia, Dra. Vânia, pela disponibilidade e por compartilhar comigo deste momento tão importante na minha carreira acadêmica. Agradeço de coração a vocês.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (processo nº 2009/15607- 2) viabilizando assim a realização deste estudo.

A realização desta tese marca o fim de uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a concretização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

"Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós."

(Antoine de Saint-Exupéry)

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina."

(Cora Coralina)

SUMÁRIO	Pág.
Resumo	09
Abstract.....	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. HIPÓTESE.....	15
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos específicos	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 Reagentes e Anticorpos.....	16
4.2 Cultura de Células.....	16
4.3 Tratamentos das linhagens celulares.....	17
4.4 Expressão Gênica.....	18
4.5 Análise Estatística.....	18
5 RESULTADOS	19
5.1 Linhagem celular MCF-7.....	19
5.1.1 T3 eleva os níveis de expressão de mRNA de <i>AREG</i>	19
5.1.2 Efeito do T3 associado ao inibidor Fulvestrant (ICI 182,780) sobre a expressão gênica de <i>AREG</i>	20
5.1.3 Efeito da inibição da síntese de RNA com Actinomicina D (ACTD) sobre os efeitos do T3 na expressão de <i>AREG</i>	21
5.1.4 Efeito da inibição da síntese proteica com Ciclohexamida (CHX) na ação do T3 sobre a expressão gênica de <i>AREG</i> em células tumorais mamárias.....	23
5.1.5 Efeito da inibição da via PI3K com LY294002 (LY) na ação do T3 sobre a expressão gênica de <i>AREG</i>	24

5.2 Linhagem celular MDA-MB 231.....	26
5.2.1 T3 eleva os níveis de expressão de mRNA de <i>AREG</i>	26
5.2.2 Efeito do T3 associado ao inibidor Fulvestrant (ICI 182,780) sobre a expressão gênica de <i>AREG</i>	27
5.2.3 Efeito da inibição da síntese de RNA com Actinomicina D (ACTD) sobre os efeitos do T3 na expressão de <i>AREG</i>	28
5.2.4 Efeito da inibição da síntese proteica com Ciclohexamida (CHX) na ação do T3 sobre a expressão gênica de <i>AREG</i> em células.....	30
5.2.5 Efeito da inibição da via PI3K com LY294002 (LY) na ação do T3 sobre a expressão gênica de <i>AREG</i>	31
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÕES	40
8. REFERÊNCIAS.....	41
9. ANEXOS.....	46

Resumo

A incidência de câncer de mama (CM) tem aumentado de maneira alarmante nos últimos anos. Diversas pesquisas conduziram à descoberta de amphiregulin (*AREG*) como um oncogene, tendo sua expressão relacionada com diversos tipos de cânceres. Nosso grupo evidenciou a ação do T_3 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 T_3 regula a expressão desses genes e o envolvimento de 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 extra-nuclear do T_3 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 $10^{-8}M$ de T_3 nos tempos de 10', 30', 1h e 4h, na presença ou ausência de Fulvestrant (ICI 182,780), inibidor de ER, Actinomicina D (ACTD) - inibidor da expressão gênica, Ciclohexamida (CHX), inibidor da síntese protéica, 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 adotado significância mínima de 5%. O T_3 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 T_3 , em ambas as linhagens e em todos os tempos estudados. Os dados desse estudo indicam que T_3 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 T_3 sobre a expressão gênica de *AREG* ocorre de forma indireta. O T_3 mantém a expressão de *AREG* mesmo após a inibição da transcrição. E, que a ativação da via PI3K pelo T_3 é necessária para a modulação do gene *AREG* em ambas as linhagens estudadas.

Palavras-chave: Hormônio Tireoidiano, Triiodotironina, Câncer de mama, Oncogene e PI3K.

Abstract

The incidence of breast cancer (BC) has increased alarmingly in recent years. Several studies have been lead to the discovery of amphiregulin (AREG) as an oncogene, with its expression related to various cancer types. Our group showed the action of T_3 on different genes in BC cells using microarray, but the mechanism which T_3 regulates the expression of these genes and the involvement of ER have not been evaluated yet. The relationship between the expression of AREG and the presence of TH remains unknown, therefore, the aim of this study was to verify the nuclear and extra-nuclear action of T_3 on AREG gene expression in breast adenocarcinoma cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231. The cell lines were subjected to treatment with $10^{-8}M$ T_3 at the times 10', 30', 1h and 4h in the presence or the absence of Fulvestrant (ICI 182,780) - ER inhibitor, Actinomycin D (ACTD) - inhibitor of gene expression, cycloheximide (CHX) - inhibitor of protein synthesis, and LY294002 - inhibitor of PI3K pathway. The AREG mRNA levels were analyzed by RT-PCR. For data analysis we used ANOVA followed by the *post hoc* Tukey's test with a significance level of 5%. T_3 increased AREG gene expression levels, compared to the control group in both cell lines, regardless of the incubation times. Our study confirms that AREG gene expression is increased in the presence of T_3 in both cell lines and at all the times studied. The data from this study indicate that T_3 might act through ER, decreasing AREG expression after 30' treatment in MCF-7 cells and did not alter the expression of this gene in MDA-MB-231 cells, which lack ER. Furthermore, we suggest that T_3 action on AREG gene expression occurs indirectly. The T_3 maintains AREG expression even after the inhibition of transcription. And, the PI3K pathway activation by T_3 is required for the modulation of AREG in both cell lines studied.

Keywords: Thyroid hormone, Triiodothyronine, Breast cancer, Oncogene and PI3K.

1. INTRODUÇÃO

A incidência de câncer de mama (CM) mostrou um aumento alarmante nos últimos anos [1], onde cerca de 1,38 milhões de mulheres são diagnosticadas com câncer de mama e 458,503 mil morrem da doença a cada ano [2]. De acordo com o INCA, a estimativa do número de casos novos de câncer de mama em mulheres no Brasil será de 57.120, 20,8%, em 2014 [3]. O crescimento e o desenvolvimento de muitos cânceres humanos, incluindo o CM, são conhecidos por serem influenciados por hormônios esteroides [4,5]. A responsividade anormal das células, especialmente ao hormônio estrogênio (E2), tem sido uma das principais causas de desenvolvimento e progressão do carcinoma mamário [6,7].

Inúmeros fatores de risco ambientais, condições patológicas e agentes fisiológicos, bem como os hormônios tireoidianos (HT) têm sido propostos por influenciar o desenvolvimento de CM [8].

O gene amphiregulin (*AREG*) faz parte da família do fator de crescimento epidermal (EGF), e sua superexpressão foi demonstrada numa ampla variedade de tecidos de câncer humano. No entanto, as alterações genéticas ou epigenéticas responsáveis por esta superexpressão permanecem desconhecidas, apesar dos numerosos estímulos identificados. Estudos *in vitro*, realizados em linhagens celulares de tumores tratados com *AREG* ou com pequenos RNAs de interferência específicos (siRNAs) para silenciar a expressão do gene, mostraram que o *AREG* desempenha um papel importante na proliferação e sobrevivência de células transformadas [9]. A participação do *AREG* na manutenção das propriedades oncogênicas e metastáticas destas células também foi constatada, bem como a sua associação à resistência quimioterápica [10]. O papel de *AREG* no desenvolvimento e progressão do câncer é

também suportado pelos dados clínicos que mostram que ele pode servir como um fator prognóstico [11] e/ou um biomarcador preditivo [12]. Estudo feito pelo nosso grupo demonstrou a expressão do gene *AREG* por *microarray* em célula de câncer de mama MCF-7 [13]. A linhagem celular MCF-7, célula eternizada de CM, foi obtida inicialmente de uma cultura primária desse câncer, originada de uma efusão pleural de uma paciente feminina com metástase dessa doença [14]. Essa célula possui tanto ER α e β quanto TR α e β [15,16,17] e difere da linhagem MDA-MB-231, linhagem também eternizada de CM que não possui ER, mas expressa TR α e β [16].

Sabe-se que o E2 e o *status* hormonal da paciente são importantes para a proliferação e o tratamento do CM [18]. Em experiências *in vitro* utilizando linhagem celular de câncer de mama MCF-7 foi demonstrado que o tratamento com E2 pode contribuir para uma maior expressão de *AREG* em níveis de mRNA e proteína [19]. Quanto ao T₃, apesar dos estudos epidemiológicos serem ainda contraditórios em relação a sua influência no CM [20,21,22,23,24,25], estudos do nosso grupo demonstraram a sua capacidade em aumentar a proliferação de células cancerosas na presença de ER positivo, induzindo a expressão de genes normalmente estimulados por E2, como progesterona (PR), TGF- α e TGF- β 1, sugerindo que o T₃ mimetiza os efeitos do E2 em linhagens de células de CM [16].

A via de sinalização dos HT é complexa e altamente regulada devido à expressão de transportadores específicos dos hormônios tireoidianos, presença de múltiplas isoformas de receptores de HT (TRs) em células e tecidos e também devido às interações que ocorrem entre esses mediadores [26,27]. Além disso, em muitos casos, as vias de sinalização da tireoide estão envolvidas em *cross-talk* com uma variedade de outras vias de sinalização [28,29].

Sabe-se que os HT podem agir por outros mecanismos além da ação clássica TR/ elementos responsivos aos HT (TRE) [30], mecanismos estes que podem ser chamados de ação não clássica ou não-genômica. Neste tipo de mecanismo, seus locais de iniciação podem estar na membrana plasmática, como na ativação da integrina $\alpha v\beta 3$, 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, tais como a proliferação celular, ou no citoplasma. Os HT podem ativar a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) ou fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K). Consequências da ativação de PI3K por T_3 incluem transcrição de genes específicos e inserção de Na, K-ATPase da membrana plasmática e da modulação da atividade da ATPase. Estudos utilizando linhagens celulares evidenciaram uma mudança na expressão de genes após tratamento com T_3 , dependente da via PI3K [30,31,32].

Dentre os genes estimulados pelo tratamento com T_3 podemos destacar alguns genes relacionados com o metabolismo energético como HIF1A, GLUT1, PFKP e MCT4 [33]. Todos possuem expressão alterada pela via não clássica (extra-nuclear) de ação do HT pela PI3K, pois qualquer expressão foi interrompida com o tratamento concomitante de LY294002 (inibidor da via PI3K). No entanto, somente o HIF1A teve sua expressão estimulada diretamente pelo T_3 na via PI3K, pois a associação de um inibidor da síntese protéica como a ciclohexamida (CHX) não interrompeu a ação do hormônio. Dessa forma, a CHX mostra-se como um importante componente para distinguir ação direta ou indireta do hormônio tireoidiano. A relação entre os HT, ativação de vias alternativas por esses hormônios e a expressão do gene AREG é desconhecida até o momento.

Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar a ação nuclear e extra-nuclear do T_3 na expressão gênica de AREG, além de analisar o envolvimento da via PI3K em

linhagens celulares de adenocarcinoma de mama MCF- 7 e MDA, nos tempos de 10', 30', 1h e 4h de tratamentos.

2. HIPÓTESE

O T₃ altera os níveis do oncogene *AREG* utilizando vias de ação extra-nuclear direta ou indireta em linhagens celulares de câncer de mama.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a ação nuclear e extra-nuclear do T₃ na expressão gênica do oncogene *AREG* em linhagens celulares de adenocarcinoma de mama.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a ação do T₃ na expressão gênica de *AREG* em células MCF-7 e MDA-MB-231.
- Verificar se a ação do T₃ nos níveis de *AREG* depende de ER em células MCF-7 e MDA-MB-231, por meio da administração do inibidor do receptor de ER Flulvestrant (ICI).
- Avaliar a ação do T₃ na expressão gênica de *AREG* após a inibição da transcrição em células MCF-7 e MDA-MB-231, por meio da administração do inibidor da transcrição gênica, Actinomicina D (ACT D).
- Examinar se ação do T₃ sobre o *AREG* é direta ou indireta em células MCF-7 e MDA-MB-231, por meio da administração do inibidor da tradução proteica, cicloheximida (CHX).
- Averiguar se ação do T₃ sobre os níveis de expressão gênica de *AREG* depende da via PI3K, por meio da administração do inibidor da tradução proteica, LY294002 (LY).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e Anticorpos

RPMI, soro fetal bovino (FBS) e solução de antibiótico-100X foram adquiridos da Gibco BRL (Grand Island, NY, EUA). Actinomicina D (ACT D); cicloheximida (CHX), flulvestrant (ICI), triiodotironina (T_3), LY294002 (LY), dimetilsulfóxido (DMSO), hidróxido de sódio (NaOH) e Charcoal Stripped FBS (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA).

4.2 Cultura de Células

As linhagens celulares de carcinoma mamário humano MCF-7 e MDA-MB 231 (as quais foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani, do Laboratório de Oncologia da FMUSP) foram expandidas, cultivadas e mantidas no banco de células do Laboratório Experimental de Clínica Médica – UNESP, Botucatu. Os experimentos foram realizados em triplicata. Células MCF- 7 e MDA -MB- 231 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 1,2 g / L de $NaHCO_3$, Hepes 10 nM, pH 7,4 e 10% de FBS. Ambas as células foram mantidas a 37 °C em 5% de CO_2 . A troca de meio foi realizada a cada dois dias. Antes de iniciar o tratamento hormonal e com os inibidores, o meio foi substituído por meio isento de vermelho de fenol, para eliminar todas as fontes hormonais existentes no meio, e as células foram incubadas com 10% de Charcoal Stripped FBS. Após a incubação, as células foram tratadas com T_3 na dose 10^{-8} M durante 10', 30', 1h e 4h. Os tratamentos com T_3 foram realizados, também, após a incubação com os inibidores, ICI (1uM; grupo T_3 +ICI); ACTD (5,0 pg / ml; grupo T_3 +ACTD); CHX (50 uM; grupo T_3 +CHX); LY294002 (50uM; grupo T_3 +LY). O grupo não tratado recebeu apenas 0,1 % de NaOH (diluente de T_3) e foi utilizado como controle

(C). Os inibidores de LY294002 e CHX foram adicionados ao meio 1 h antes do tratamento com T₃.

4.3 Tratamentos das linhagens celulares

As linhagens celulares foram plaqueadas e tratadas durante os intervalos de tempo de 10 minutos, 30 minutos, 1 hora e 4 horas com T₃ (10^{-8} M), ICI (1μM), T₃ (10^{-8} M) + ICI (1μM), ACT D (5.0 pg/ml); T₃ (10^{-8} M) + ACT D (5.0 pg/ml); CHX (50μM), T₃ (10^{-8} M) + CHX (50μM), LY (50μM) e T₃ (10^{-8} M) + LY (50μM). Optamos pelo fulvestrant (ICI 182.780), um antagonista do receptor de estrogênio de alta afinidade, o primeiro antiestrogênico "puro", sem qualquer atividade agonista in vitro e in vivo [34]. Outro inibidor utilizado nas linhagens foi Actinomicina D (ACT D), o primeiro antibiótico que demonstrou ter atividade anticâncer [35], com a capacidade de inibir a transcrição, fazendo isso através de ligação ao DNA no complexo de iniciação da transcrição e impedimento do alongamento da cadeia de RNA por RNA-polimerase [36]. As células também foram submetidas ao tratamento com ciclohexamida (CHX), um inibidor da biossíntese de proteínas em organismos eucarióticos que exerce o seu efeito através da interferência com o passo de tradução na síntese de proteínas (movimento de duas moléculas de RNAt e RNAm em relação ao ribossomo), bloqueando assim a tradução da proteína. E, por último as células foram submetidas ao tratamento com LY294002 (LY), composto químico contendo morfolina, um potente inibidor de phosphoinositide 3-quinase (PI3K) [37].

4.4 Expressão Gênica

O RNA total foi extraído a partir de células MCF-7 e de células MDA-MB-231 pelo método do Trizol (Invitrogen, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. O kit High Capacity cDNA de transcrição reversa para RT-PCR® (Invitrogen, São Paulo, Brasil) foi utilizado para a síntese de 20µl de DNA complementar (cDNA) a partir de 1000ng de RNA total. Os níveis de *AREG* (Hs00950669_m1, Applied Biosystems) foram determinados por RT-qPCR. As medições quantitativas foram realizadas no sistema de detecção "Applied Biosystems StepOne Plus" utilizando o kit comercial TaqMan para qPCR (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. As condições de amplificação foram como se segue: ativação da enzima a 50 °C durante 2 min, desnaturação a 95 °C durante 10 minutos, os produtos de cDNA foram amplificadas durante 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 15s e a extensão a 60 °C durante 1 min. Todas as análises foram realizadas em duplicata. A expressão gênica foi quantificada em relação aos valores do grupo Controle, após normalização por um controle interno, o GAPDH (Hs02758991_g1), pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, como descrito anteriormente [38].

4.5 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado ANOVA complementado com teste de Tukey e adotado significância mínima de 5%. Os dados foram expressos em média e desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1 Linhagem celular MCF-7

5.1.1 T_3 eleva os níveis de expressão de *AREG*

A figura 1 mostra a expressão gênica de *AREG* em células MCF-7 que foram tratadas com T_3 nos tempos de 10', 30', 1h e 4h. Os resultados demonstram que o tratamento com T_3 promove um aumento significativo da expressão gênica de *AREG* em todos os tempos de tratamento em células tumorais mamárias.

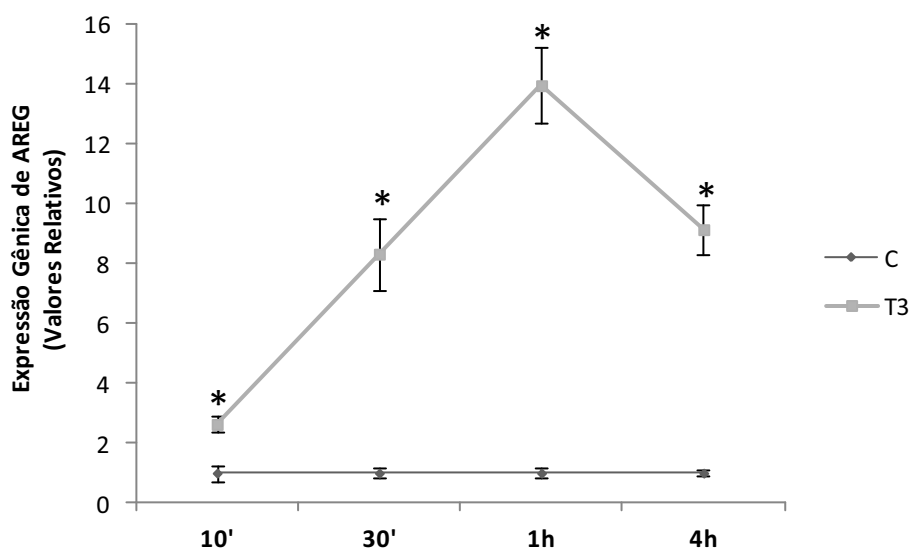
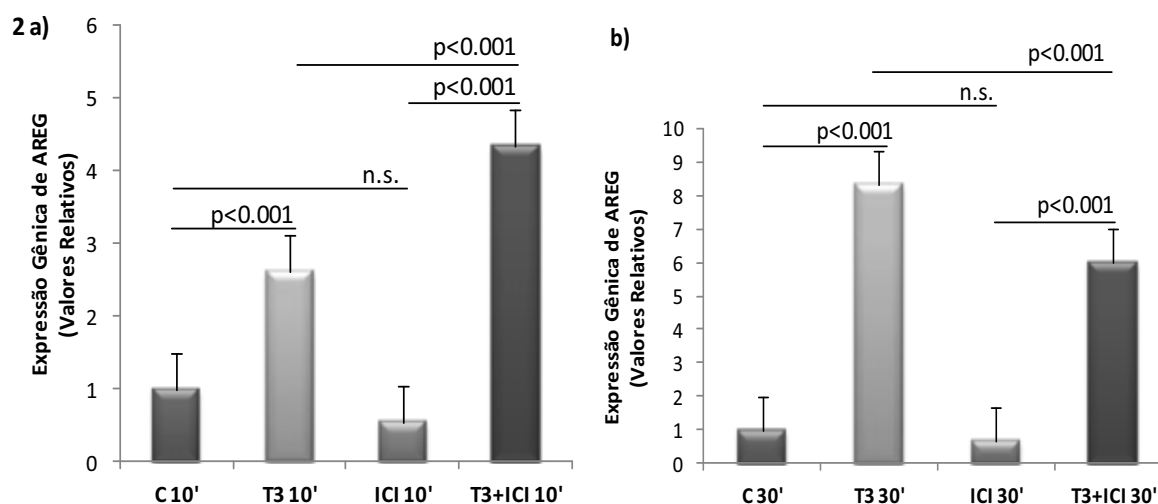


Figura 1. Efeitos do T_3 sobre a expressão gênica de amphiregulin em células MCF-7. C, Controle.

T_3 , triiodotironina; Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos, 30 minutos, 1 hora e 4 horas. Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada ANOVA complementada com teste de Tukey. * $p < 0,001$.

5.1.2 Efeito do T_3 associado ao inibidor Fulvestrant (ICI 182,780) sobre a expressão gênica de *AREG*.

Para verificar se a ação do T_3 sobre a expressão de *AREG* é dependente de ER usamos o ICI 182,780, um inibidor de ER, em todos os tempos de tratamento das linhagens de células tumorais mamárias. Quando comparamos o grupo C em relação ao grupo ICI não foi observada diferença estatística na expressão do gene *AREG* em todos os tempos estudados. Podemos observar na figura 2a que em 10' o bloqueio do ER no grupo T_3 +ICI acentua a ação do T_3 , aumentando os níveis de *AREG*. Porém, o contrário é observado a partir de 30', como mostrado na figura 2b, 2c e 2d, onde o bloqueio de ER diminui os níveis de *AREG* no grupo T_3 +ICI.



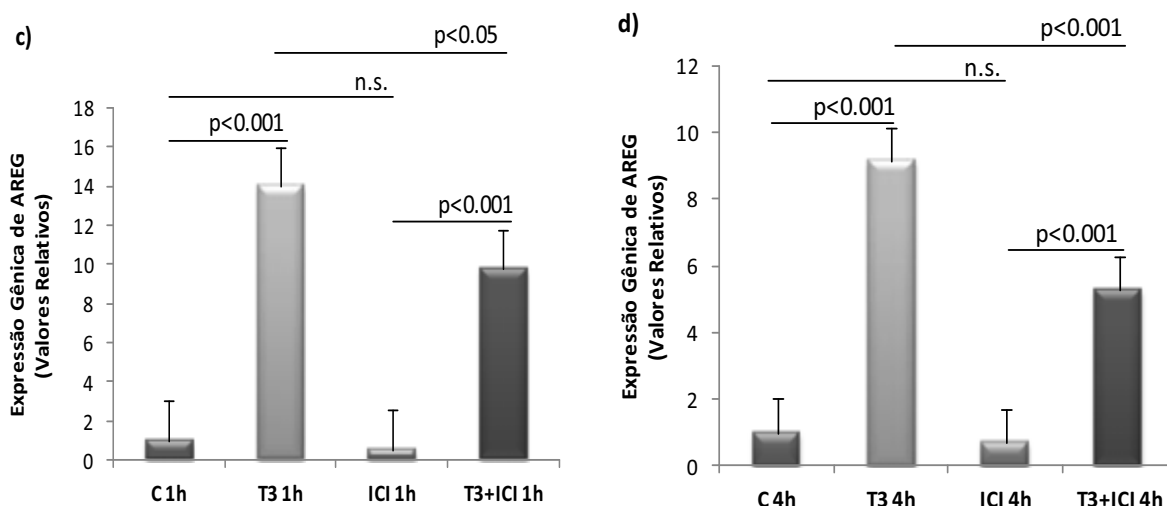


Figura 2. Efeito do T₃ associado ao Fulvestrant (ICI) sobre a expressão gênica de amphiregulin em células MCF-7. C, Controle. T₃, triiodotironina; ICI, Fulvestrant; T₃+ICI, triiodotironina associada ao Fulvestrant. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) e 4 horas (d). Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada ANOVA complementada com teste de Tukey. Comparação com C X T₃; ICI e T₃ X T₃+ICI; T₃+ICI X ICI.

5.1.3 Efeito da inibição da síntese de RNA com Actinomicina D (ACTD) sobre os efeitos do T₃ na expressão de *AREG*.

Para determinar se a ação do T₃ sobre a expressão de *AREG* é dependente da síntese gênica usamos o ACTD, um inibidor da síntese de mRNA, em todos os tempos de tratamento das linhagens de células tumorais mamárias. Quando comparamos o grupo C em relação ao grupo ACTD não foi observada diferença estatística na expressão do gene *AREG* em todos os tempos estudados. Foi observado que os níveis de *AREG* estão aumentados no grupo T₃+ACTD, quando comparado ao grupo ACTD, em todos os tempos, como mostra a figura 3. A taxa de aumento de mRNA de *AREG* no grupo T₃+ACTD em relação ao grupo ACTD sugere que o T₃ diminui consideravelmente a degradação do mRNA de *AREG*. Podemos observar na figura 3a e

3b que em 10 min ocorreu um aumento da expressão de *AREG* no grupo T₃+ACTD. Porém, o contrário é observado a partir de 1h, como mostra na figura 3c e 3d, onde ocorreu uma diminuição os níveis de *AREG* no grupo T₃+ACTD.

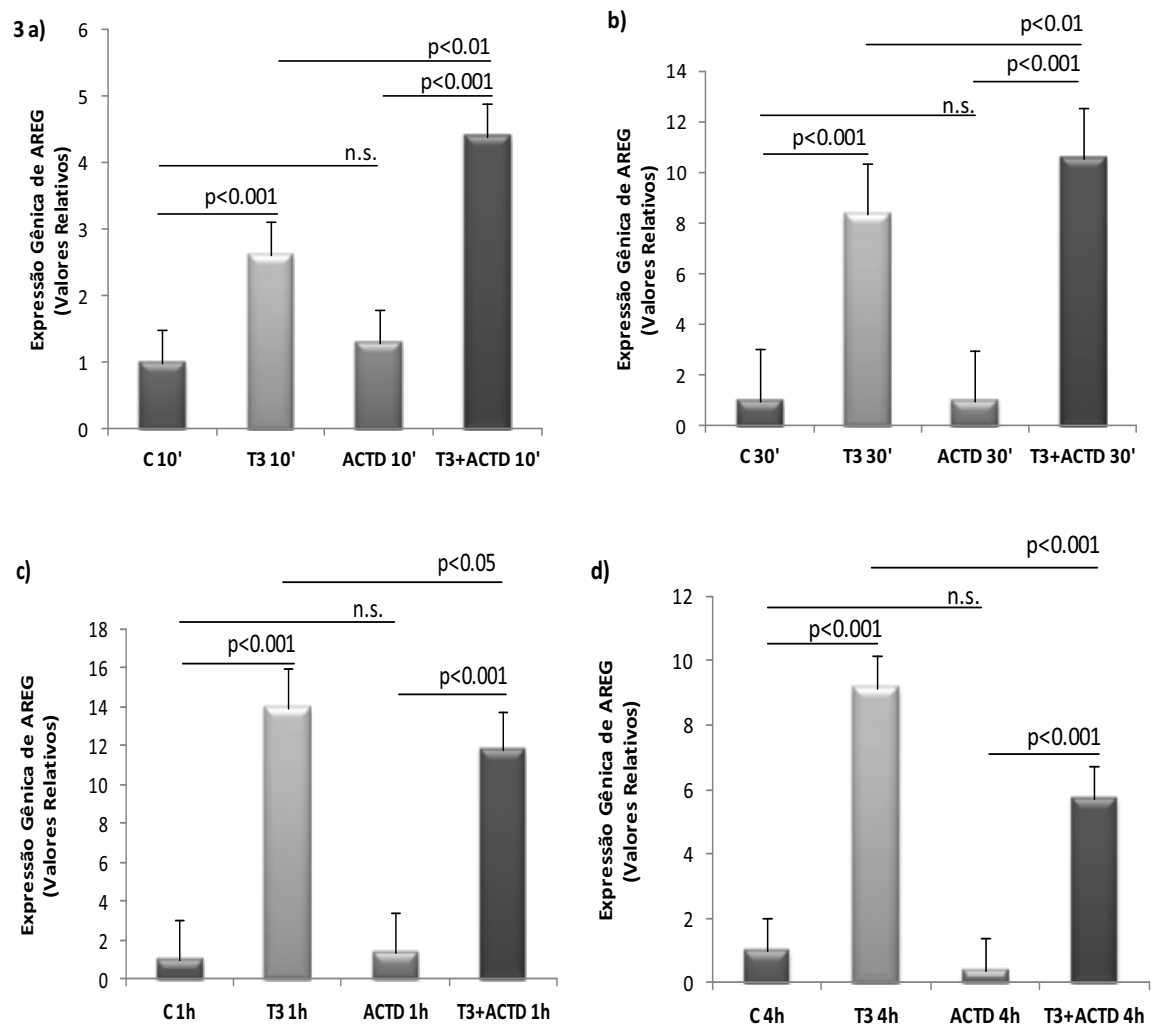
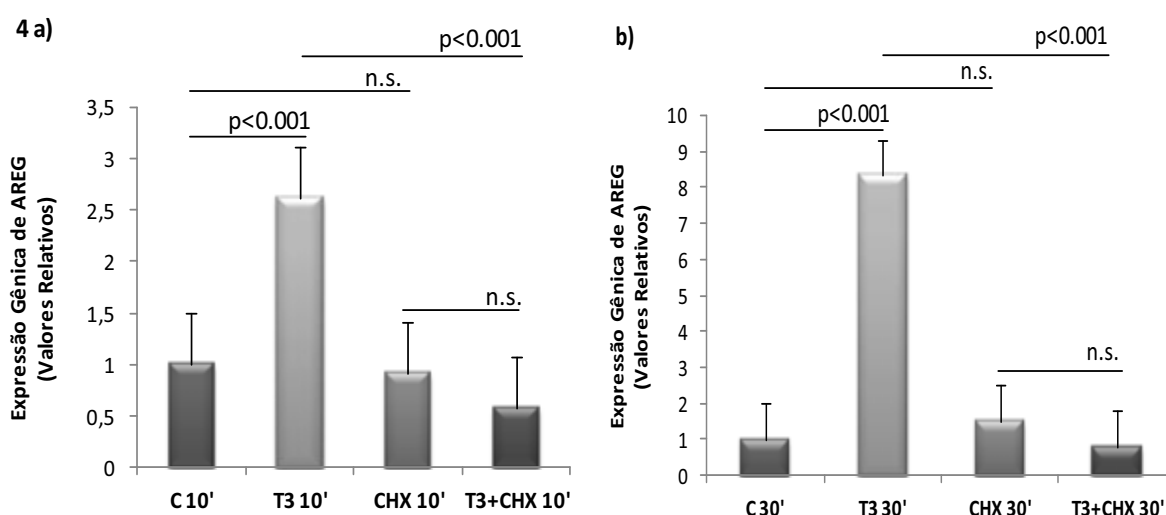


Figura 3. Efeito do T₃ associado a Actinomicina D (ACTD) sobre a expressão gênica de amphiregulin em células MCF-7. C, Controle; T3, triiodotironina; ACTD, Actinomicina D; T₃+ACTD, triiodotironina associada à Actinomicina D. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) e 4 horas (d). Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada ANOVA complementada com teste de Tukey. Comparação com C X T₃; ACTD e T₃ X T₃+ ACTD; T₃+ACTD X ACTD.

5.1.4 Efeito da inibição da síntese proteica com Ciclohexamida (CHX) na ação do T_3 sobre a expressão gênica de *AREG* em células tumorais mamárias.

Para determinar a necessidade da síntese de proteínas para a regulação pelo T_3 dos níveis de mRNA de *AREG* as linhagens de células tumorais mamárias foram incubadas na presença ou ausência de T_3 , com ou sem CHX nos tempos 10', 30', 1h e 4h. Quando comparamos o grupo C em relação ao grupo CHX não foi observada diferença estatística na expressão do gene *AREG* em todos os tempos estudados, o mesmo ocorreu com a comparação entre o grupo CHX em relação a T_3 +CHX, não apresentando diferença nos níveis de expressão gênica de *AREG*. A figura 4 mostra o efeito da associação da CHX ao T_3 (grupo T_3 +CHX) quando comparado ao grupo T_3 . Observou-se que a CHX diminui a ação do T_3 , acarretando a diminuição dos níveis de *AREG* em T_3 +CHX, quando comparado com o aumento acarretado pela incubação apenas com T_3 .



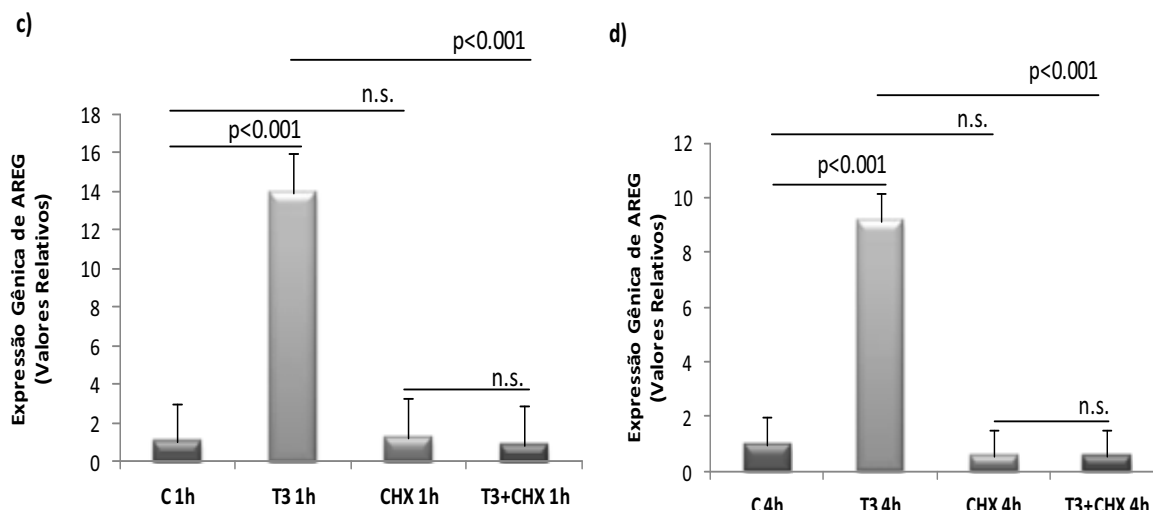


Figura 4. Efeito do T_3 associado a Ciclohexamida (CHX) sobre a expressão gênica de amphiregulin em células MCF-7. C, Controle; T_3 , Triiodotironina; CHX, Ciclohexamida; T_3 +CHXTD, Triiodotironina associada à Ciclohexamida. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) e 4 horas (d). Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada ANOVA complementada com teste de Tukey. Comparação com C X T_3 ; CHX e T_3 X T_3 +CHX; T_3 +CHX X CHX.

5.1.5 Efeito da inibição da via PI3K com LY294002 (LY) na ação do T_3 sobre a expressão gênica de *AREG*.

Para determinar a necessidade da ativação da via PI3K para a regulação pelo T_3 dos níveis de expressão gênica de *AREG*, as células tumorais mamárias, MCF-7, foram incubadas na presença ou ausência de T_3 e com ou sem LY nos tempos 10', 30', 1h e 4h. Quando comparamos o grupo C em relação ao grupo LY não foi observada diferença estatística na expressão do gene *AREG* em todos os tempos estudados. Foi observado que os níveis de *AREG* estão aumentados no grupo T_3 +LY, quando comparado ao grupo LY, em todos os tempos. Como mostra a figura 5, ocorreu uma diminuição na expressão gênica de *AREG* grupo T_3 +LY, quando comparado ao T_3 .

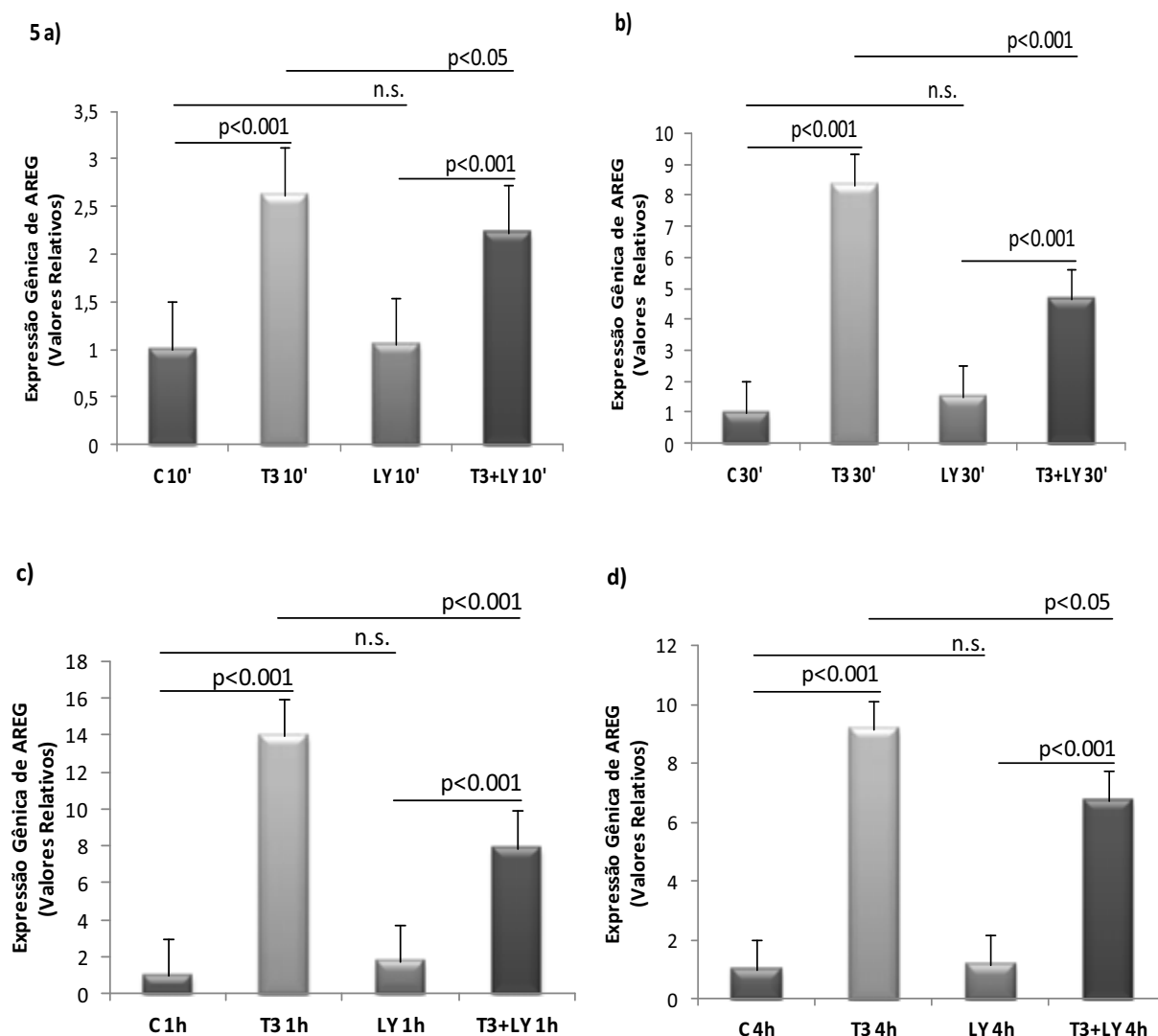


Figura 5. Efeito do T_3 associado à LY294002 (LY) sobre a expressão gênica de amphiregulin em células MCF-7. C, Controle; T_3 , Triiodotironina; LY, inibidor da via PI3K; T_3 +LY, triiodotironina associada à LY294002. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) e 4 horas (d). Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada ANOVA complementada com teste de Tukey. Comparação com C X T_3 ; LY e T_3 X T_3 +LY; T_3 +LY X LY.

5.2 Linhagem celular MDA-MB 231

5.2.1 T₃ eleva os níveis de expressão de *AREG*

A figura 6 mostra a expressão gênica de *AREG* em células MDA-MB-231 tratadas com T₃ nos tempos de 10', 30', 1h e 4h. Os resultados demonstram que o tratamento com T₃ de células tumorais mamárias, MDA-MB-231, promove aumento significativo da expressão gênica de *AREG* em todos os tempos de tratamento, sendo esse aumento tempo-dependente durante a primeira hora de tratamento.

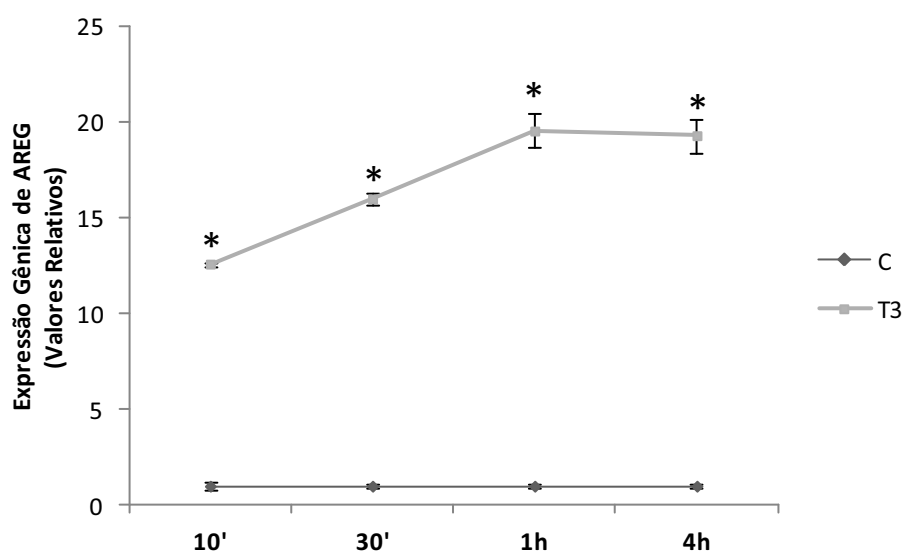
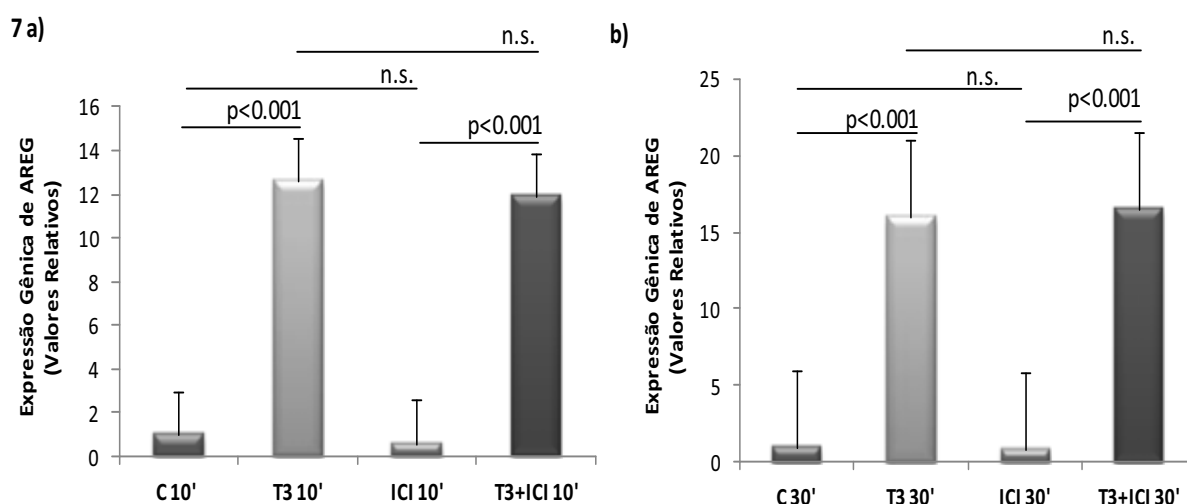


Figura 6. Efeitos do T₃ sobre a expressão gênica de amphiregulin em células MDA-MB-231. C, Controle. T₃, triiodotironina; tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos, 30 minutos, 1 hora e 4 horas. Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada ANOVA complementada com teste de Tukey. *p<0,001.

5.2.2 Efeito do T₃ associado ao inibidor Fulvestrant (ICI 182,780) sobre a expressão gênica de *AREG*.

A figura 7 mostra que a inibição de ER com ICI 182,780 não teve efeito sobre ação do T₃ em nenhum dos tempos de tratamento. Quando comparamos o grupo C em relação ao grupo ICI, não foi observada diferença estatística na expressão do gene *AREG* em todos os tempos estudados. Observamos o mesmo resultado quando comparamos o T₃ com T₃+ICI em todos os tempos. Quando associamos o T₃ ao inibidor de ER (T₃+ICI), ocorreu um aumento da expressão de *AREG* em relação ao grupo ICI em todos os tempos.



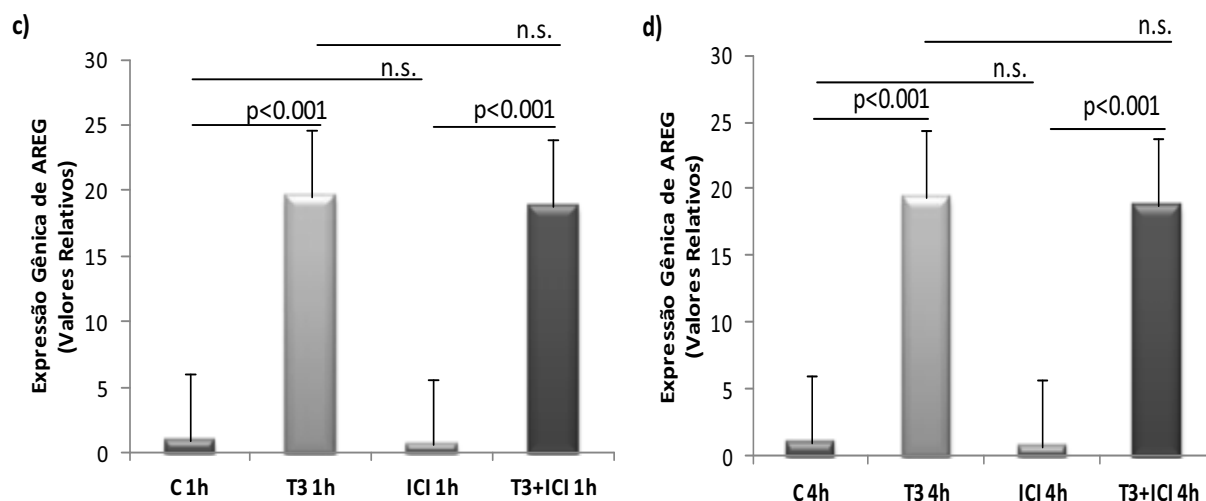


Figura 7. Efeito do T_3 associado ao Fulvestrant (ICI) sobre a expressão gênica de amphiregulin em células MDA-MB-231. C, Controle. T_3 , triiodotironina; ICI, Fulvestrant; T_3 +ICI, triiodotironina associada ao Fulvestrant. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) e 4 horas (d). Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada ANOVA complementada com teste de Tukey. Comparação com C X T_3 ; ICI e T_3 X T_3 +ICI; T_3 +ICI X ICI.

5.2.3 Efeito da inibição da síntese de RNA com Actinomicina D (ACTD) sobre os efeitos do T_3 na expressão de *AREG*.

Para determinar se a ação do T_3 sobre a expressão de *AREG* é dependente da síntese gênica usamos o ACTD, um inibidor da síntese de mRNA, as células tumorais mamárias foram incubadas com ou sem T_3 nos tempos 10', 30', 1h e 4h. Quando comparamos o grupo C em relação ao grupo ACTD não foi observada diferença estatística na expressão do gene *AREG* em todos os tempos estudados, o mesmo foi observado quando com a comparação do grupo T_3 em relação T_3 +ACTD. Foi observado que os níveis de *AREG* estão aumentados no grupo T_3 +ACTD, quando comparado ao grupo ACTD, em todos os tempos (Figura 8).

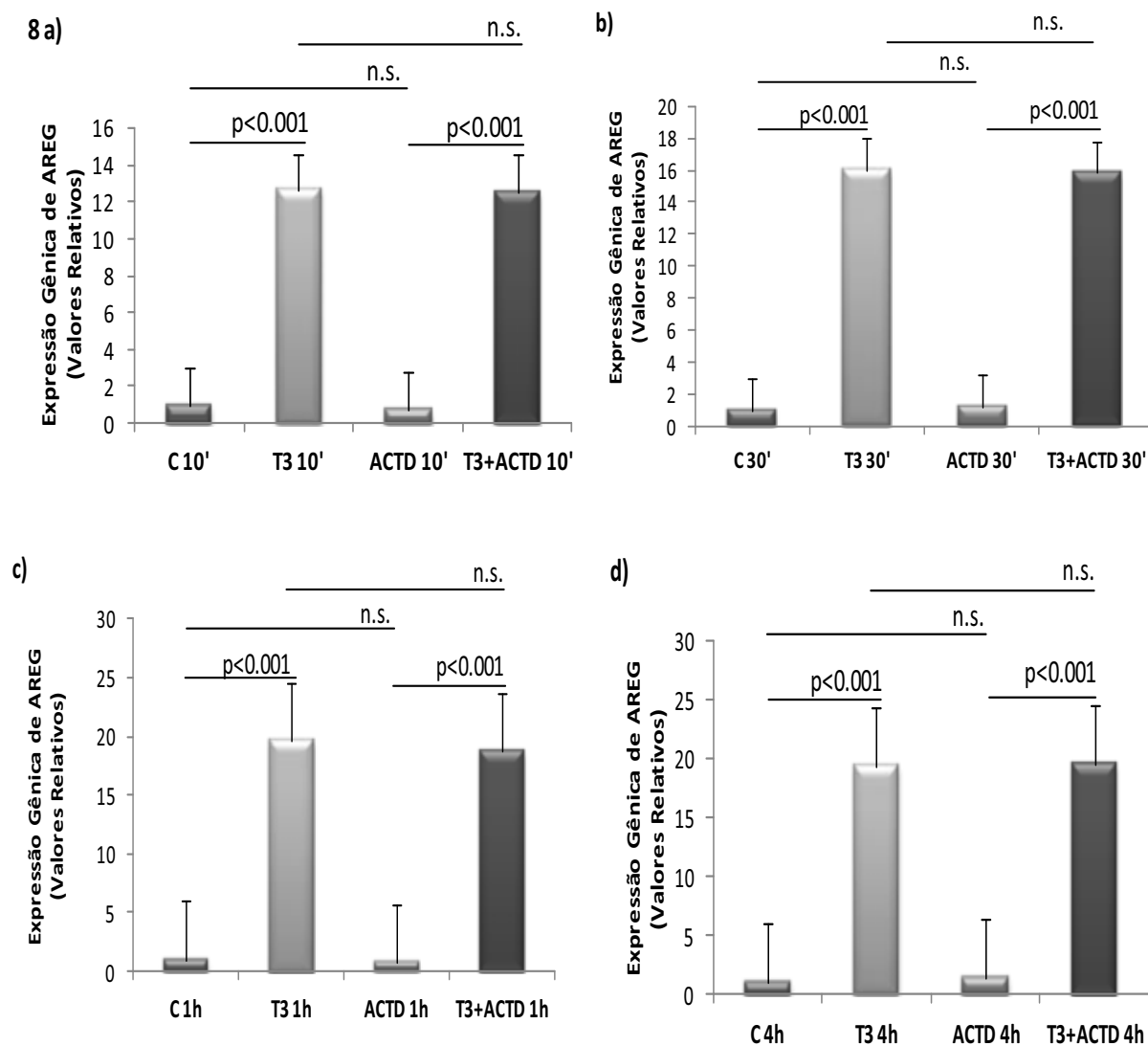
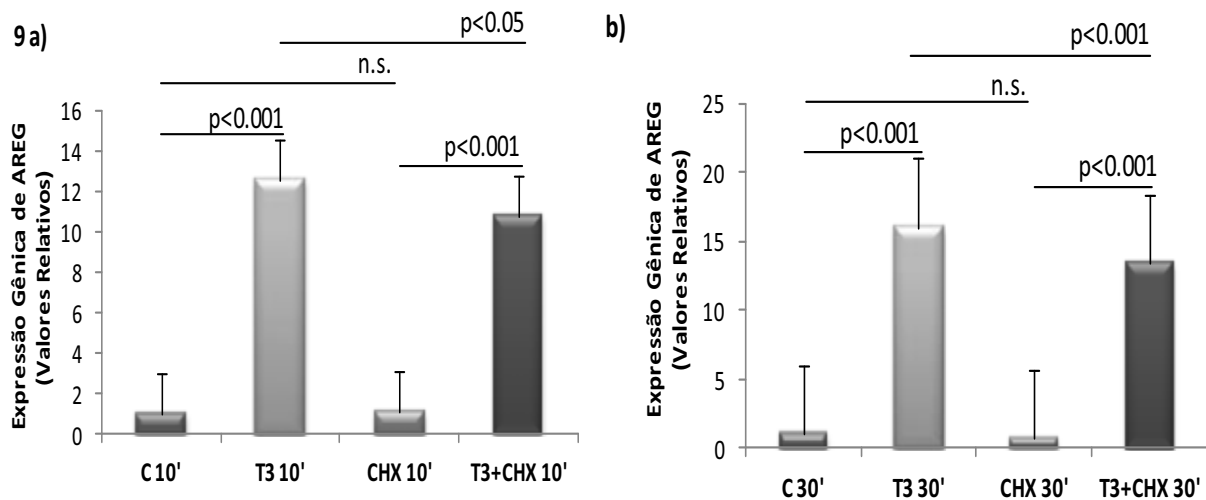


Figura 8. Efeito do T_3 associado a Actinomicina D (ACTD) sobre a expressão gênica de amphiregulin em células MDA-MB-231. C, Controle; T_3 , triiodotironina; ACTD, Actinomicina D; T_3 +ACTD, triiodotironina associada à Actinomicina D. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) e 4 horas (d). Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada ANOVA complementada com teste de Tukey. Comparação com C X T_3 ; ACTD e T_3 X T_3 +ACTD; T_3 +ACTD X ACTD.

5.2.4 Efeito da inibição da síntese proteica com Ciclohexamida (CHX) na ação do T_3 sobre a expressão gênica de *AREG* em células.

Para determinar a necessidade da síntese de proteínas para a regulação pelo T_3 dos níveis de expressão gênica de *AREG*, as células tumorais mamárias, MDA-MB-231, foram incubadas na presença ou ausência de T_3 e com ou sem CHX nos tempos 10', 30', 1h e 4h. Quando comparamos o grupo C em relação ao grupo CHX não foi observada diferença estatística na expressão do gene *AREG* em todos os tempos estudados. A figura 9 mostra o efeito da associação do T_3 ao inibidor de síntese gênica (grupo T_3 +CHX). Ocorreu um aumento da expressão de *AREG* em todos os tempos, quando comparados ao grupo CHX. Observa-se um a diminuição dos níveis de *AREG* no grupo T_3 +CHX quando comparado ao grupo T_3 .



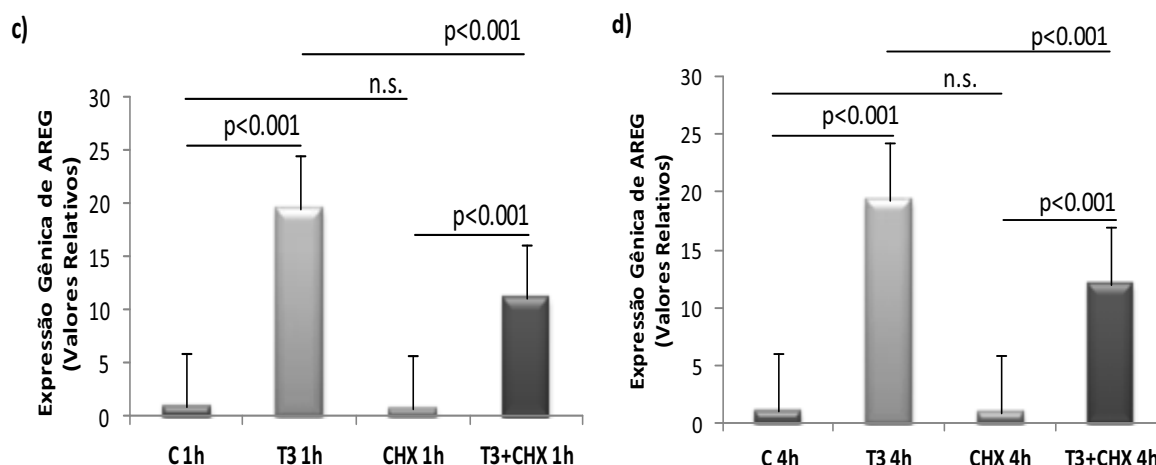


Figura 9. Efeito do T₃ associado à Ciclohexamida (CHX) sobre a expressão gênica de amphiregulin em células MDA-MB-231. C, Controle; T₃, Triiodotironina; CHX, Ciclohexamida; T3+CHXTD, Triiodotironina associada à Ciclohexamida. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) e 4 horas (d). Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada ANOVA complementada com teste de Tukey. Comparação com C X T₃; CHX e T₃ X T₃+CHX; T₃+CHX X CHX.

5.2.5 Efeito da inibição da via PI3K com LY294002 (LY) na ação do T₃ sobre a expressão gênica de AREG.

Para determinar a necessidade da ativação da via PI3K para a regulação pelo T₃ dos níveis de expressão gênica de AREG, as células MDA-MB-231 foram incubadas na presença ou ausência de T₃ e com ou sem LY nos tempos 10', 30', 1h e 4h. (figura 10). Quando comparamos o grupo C em relação ao grupo LY não foi observada diferença estatística na expressão do gene AREG em todos os tempos estudados. A figura 10 mostra o aumento da expressão AREG em todos os tempos do grupo T₃+LY, quando comparados ao grupo LY. Observa-se uma diminuição dos níveis de AREG no grupo T₃+LY quando comparado ao grupo T₃.

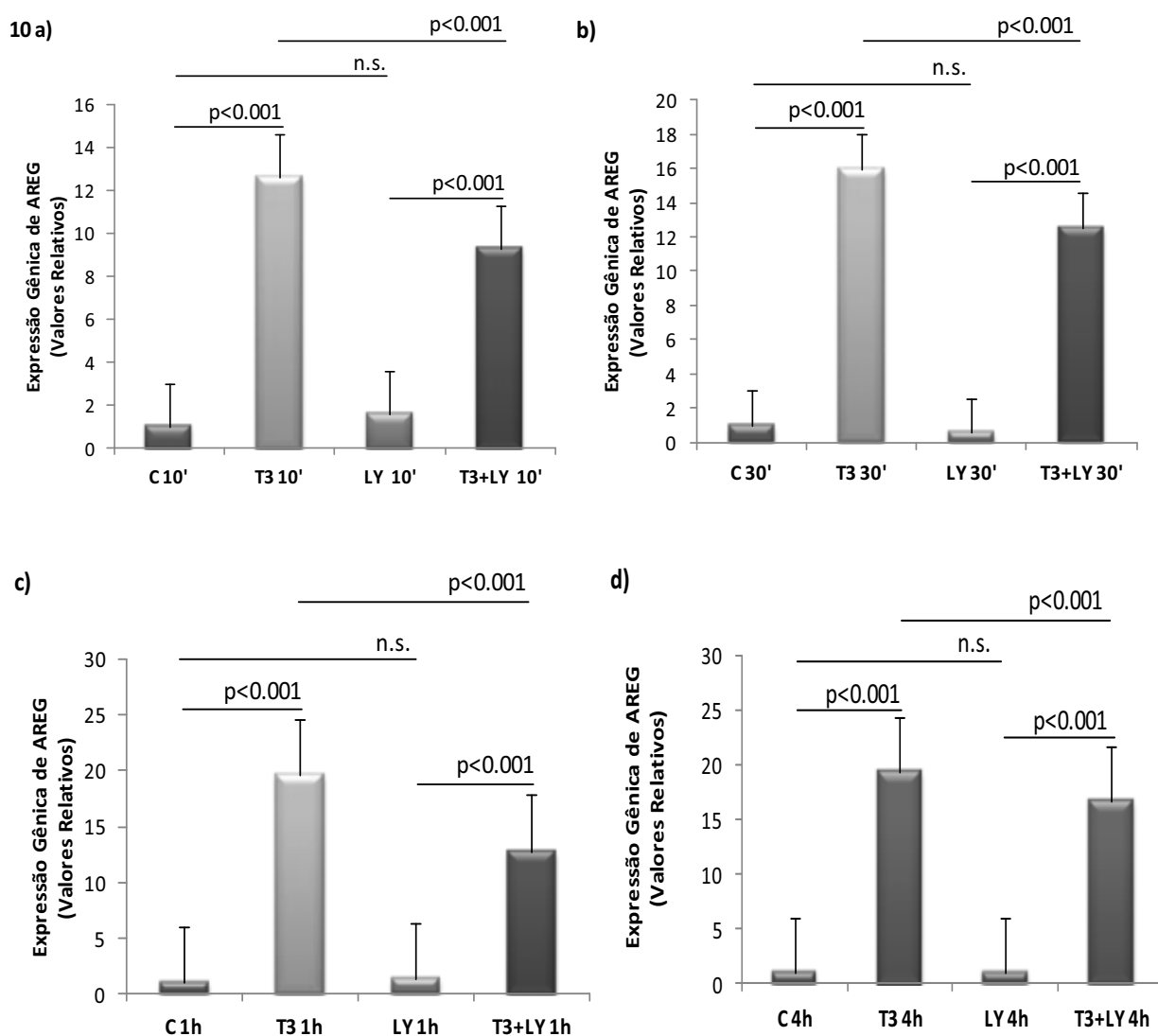


Figura 10. Efeito do T_3 associado à LY294002 (LY) sobre a expressão gênica de amphiregulin em células MDA-MB-231. C, Controle; T3, Triiodotironina; LY, inibidor da via PI3K; T3+LY, triiodotironina associada à LY294002. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) e 4 horas (d). Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada ANOVA complementada com teste de Tukey. Comparação com C X T₃; LY e T₃ X T₃+ LY; T₃+ LY X LY.

6. DISCUSSÃO

O gene *AREG* se mostra importante na regulação da ramificação e crescimento ductal da glândula mamária, assim como em outros tecidos, também demonstrando um papel fundamental desse gene na invasão e motilidade celular [39,40,41]. Esclarecer os mecanismos envolvidos na invasão e migração celular induzida pelo *AREG* é crítico, já que a sinalização desregulada desse gene pode desempenhar um papel essencial na progressão do câncer. [42]. O papel do *AREG* no crescimento pré-neoplásico foi ainda apoiado por um estudo utilizando camundongos transgênicos com superexpressão oncogênica que resultou em taxas variáveis de progressão tumoral.

O T₃, em estudos laboratoriais, tem demonstrado capacidade em aumentar a proliferação de células cancerosas na presença de ER positivo, induzindo a expressão de genes normalmente estimulados por E2. Contudo, estudos epidemiológicos ainda são contraditórios em relação a sua influência no CM [20,21,22,23,24,25]. Estudos que demonstrem a regulação do gene *AREG* pelo T₃ são escassos na literatura. O envolvimento dos HT no desenvolvimento e diferenciação do tecido mamário normal é bem estabelecido [43,44,45], enquanto estudos epidemiológicos e experimentais, que têm associado patologias da tireoide com um risco aumentado de CM, são controversos nessa condição [22,23,24,46,47,48,49,50,51]. O T₃ estimula a proliferação de uma variedade de células não malignas [51,52,53], incluindo células de mama [54] e da tireoide [55].

O presente estudo confirma a ação do T₃ sobre células de câncer de mama, demonstrando um aumento da expressão gênica de *AREG* pelo T₃, tanto em células MCF-7 quanto em células MDA-MB-231 (Fig. 1 e Fig. 6), em diferentes tempos de tratamento (10', 30', 1h e 4h). Esses resultados concordam com estudos anteriores de nosso grupo, realizado em células MCF-7 tratadas com T₃ no tempo de 24 horas, onde

ocorreu um aumento de mRNA de *AREG* [13] Assim, constatamos que o T_3 age sobre a transcrição de *AREG* em curtos e em longos períodos de tempo. O *AREG* é um fator de crescimento regulador multifuncional. Dependendo de sua concentração, células alvo e presença de outros fatores de crescimento, *AREG* é capaz de inibir ou estimular a proliferação celular [56]. Por exemplo, in vitro, *AREG* pode inibir o crescimento de algumas células, mas pode estimular o crescimento de fibroblastos, queratinócitos, células epiteliais mamárias e outras células tumorais [57,58,59].

Estudos descrevem a dependência do efeito proliferativo que o hormônio da tireoide exerce [54] em células de câncer de mama com o ER positivo, demonstrando a capacidade do T_3 em aumentar a proliferação de células de CM com ER positivo, induzindo a expressão de genes normalmente estimulados por E2 tais como PGR, TGFA e TGFB-1 [60,61]. Nosso grupo evidenciou a ação do T_3 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 T_3 regula a expressão desses genes e o envolvimento de ER [13].

O T_3 mimetiza os efeitos do E2 na linhagem de câncer de mama de células MCF-7 que possuem o ER positivo [16]. Com intuito de avaliar se o T_3 modula a expressão de *AREG* por meio de ER, bloqueamos o ER com o uso de antagonista do receptor de estrogênio, Fulvestrant (ICI 182,780). Diferentemente de outros fármacos que possuem como alvo o ER, como, por exemplo, o mais amplamente utilizado Tamoxifen, o ICI 182,780 é um fármaco que pertence à classe dos “*Selective estrogen receptor down-regulators*” (SERD). É um análogo do estradiol com uma cadeia *7 α -alkylamide* da porção esteróide da molécula que apresenta um efeito antagonista a este hormônio, com recentes estudos na literatura classificando-o como novo mecanismo de ação antagonista ao ER [62].

O bloqueio do ER com ICI 182,780 alterou a ação do T_3 sobre o gene *AREG*. Foi observado nas células MCF-7 o aumento na expressão gênica de *AREG* no tempo inicial de tratamento 10', o bloqueio de ER acentuou a ação do T_3 , porém a partir de 30' a inibição de ER associada com a adição de T_3 diminui a expressão de *AREG*, caracterizando a necessidade desse receptor para ação do T_3 . No entanto, nas células MDA-MB-231 o bloqueio de ER com ICI e adição de T_3 não alterou a expressão de *AREG* elevada pelo T_3 na ausência de ICI, em nenhum dos tempos estudados, esse resultado, em relação ao bloqueio de ER em células MDA-MB-231, era esperado, pois essas células não possuem ER. Dessa forma, considerando que o T_3 eleva os níveis de *AREG* em células MDA-MB-231, acredita-se que o mesmo utiliza vias alternativas ou os próprios TRs para modular esse gene.

Poucos trabalhos na literatura tratam do mecanismo de ação dos hormônios tireoidianos em células carcinoma mamário, mas alguns grupos já demonstraram que os hormônios tireoidianos são capazes de levar à fosforilação de ER-alpha com consequente indução da via MAPK, e que o Fulvestrant é capaz de inibir essa ação [54]. Não pudemos identificar trabalhos na literatura que descrevessem a existência de duas ou mais vias para a expressão gênica influenciada pelos hormônios tireoidianos em células de carcinoma mamário. Dentre os trabalhos podemos destacar a expressão de PCNA pelos hormônios tireoidianos por meio do receptor de membrana integrina em células de carcinoma pulmonar [63] ou o efeito inibitório do Fulvestrant sobre a captação de timidina estimulada pelo hormônio tireoidiano em células de câncer de mama MCF-7 [54]. Essa hipótese de duas vias é reforçada ainda por trabalhos que demonstraram a capacidade do androgênio diidrotestosterona em estimular a proliferação de células de câncer de mama por mecanismos dependentes do ER, mas de também exercerem efeitos proliferativos em tumores que não apresentam esse receptor

[64]. Em nosso trabalho os tratamentos empregados nas células MDA também reforçam essa teoria.

Nosso próximo passo foi verificar a ação do T_3 na manutenção do mRNA de *AREG* utilizando o Actinomicina D (ACTD). ACTD é um inibidor de transcrição geral com atividade anticancerígena, e está aprovado para o tratamento de sarcomas e Wilms, células germinativas e tumor trofoblástico [65,66]. Os dados apresentados na figura 3 e na figura 8 indicam que a expressão gênica de *AREG* foi aumentada pela adição de T_3 . Nas células MCF-7 no grupo T_3 +ACTD 10' e 30' observamos o aumento dos níveis de expressão gênica de *AREG* em relação ao tratamento apenas com T_3 , nos tempos posteriores o grupo T_3 +ACTD apresenta uma diminuição dos níveis de *AREG*, porém mantém uma porcentagem de mRNA estável mesmo após uma inibição de transcrição prolongada de 4 horas. No entanto, nas células de câncer de mama MDA-MB-231 quando comparamos o grupo T_3 +ACTD ao T_3 sem a associação não ocorre diferença, demonstrando que T_3 mantém a estabilidade do mRNA já existente.

A regulação da estabilidade do mRNA é considerado como sendo importante ponto de controle da expressão do gene [67]. Além disso, é bem estabelecido que o T_3 regula a expressão de genes pelo “splicing” de pré-mRNA, bem como em processos de tradução e pós-tradução [68,69]. Alterações nos níveis de transcrição iniciais podem estar associados com modificações pós-transcricional dos mRNAs, o que leva a alterações na estabilidade dos transcritos. A poliadenilação do mRNA é um processo pós-transcricional que ocorre no interior do núcleo e continua no citoplasma [70,71], e que confere estabilidade aos transcritos.

Os mecanismos denominados extra-nucleares podem influenciar potencialmente a expressão gênica. O início da via de ação é extra-nuclear, por dependerem de vias alternativas, mas as consequências incluem aumento da transcrição [30]. Isto demonstra

que pode haver uma inter-relação entre os eventos nucleares e extra-nucleares dos HT. Ainda sob uma ótica de iniciação extra-nuclear, podemos distinguir duas classes de genes alvos da ação do T_3 pela via PI3K: 1) uma classe de genes induzidos diretamente pela ação dessa via e que não necessitam de síntese protéica “*a priori*” para sofrerem a ação do tratamento com o hormônio, denominado em alguns trabalhos como extra-nuclear direta do T_3 , e 2) uma classe de genes cuja expressão altera-se na presença do hormônio, porém dependente da síntese de uma proteína específica previamente, denominada como ação extra-nuclear indireta do T_3 [33].

Os HT podem ativar a transcrição gênica de um gene alvo de forma direta ou indireta por meio da ação nuclear ou extra-nuclear. Estudos realizados por Moeller *et al.* [33], com fibroblastos humanos demonstraram o aumento da expressão dos genes HIF-1 α , GLUT1, fosfofrutoquinase (PFKP) e transportador de mocarboxilato (MCT4) pelo T_3 . Nesse estudo, foi associado ao T_3 a ciclohexamida (CHX), inibidor de síntese protéica, usado para definir se o HT age direta ou indiretamente na transcrição. Os autores verificaram que a ação do T_3 sobre HIF-1 α era direta, pois na presença de CHX a expressão se manteve, não precisando de um gene precursor que traduzisse uma proteína que estimularia a expressão do HIF-1 α ; porém os genes GLUT1, PFKP e MCT4 tiveram sua expressão diminuída na presença de CHX [33]. A inibição do aumento da expressão de mRNA pelo T_3 com a CHX indicam que os genes são indiretamente induzidos pelos HT, requerendo assim a síntese protéica anterior a expressão do gene alvo.

Com intuito de verificar se a ação de T_3 foi direta ou indireta sobre a modulação do gene *AREG*, foi utilizado um inibidor da síntese de proteínas, CHX. A adição de CHX induziu a diminuição dos níveis de mRNA de *AREG*, elevados pelo T_3 , em todos os tempos de tratamento nas células MCF-7 e MDA (Fig. 4 e Fig. 9 respectivamente),

indicando que os efeitos de T_3 sobre este gene necessita da síntese de proteína prévia e que o T_3 age por ação indireta nas linhagens celulares de câncer de mama estudadas. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo utilizando CHX para determinar a ação direta ou indireta de T_3 sobre os níveis de *AREG* em células de câncer de mama.

A via PI3K participa de uma grande variedade de processos celulares, incluindo a via intracelular, organização do citoesqueleto, crescimento celular e transformação, e na prevenção da apoptose [72,73], além de ter um papel na diferenciação de várias linhagens de celulares [74,75]. O conceito sobre a ação do HT foi diversificado, incluindo ações extra-nucleares de T_3 e T_4 . O T_3 apresenta-se como um ativador da via PI3K, que conduz a um aumento de certos genes, tal como o HIF-1 α e ZAKI α -4 [30,33]. Trabalhos recentes, utilizando linhagens celulares, destacam uma alteração de expressão gênica após o tratamento com T_3 , dependente da via PI3K [30,31,32,33,76]. Dentre os genes estimulados pelo tratamento com T_3 , por meio da via PI3K, podemos destacar alguns genes relacionados com o metabolismo energético como HIF-1 α , GLUT1, PFKP e MCT4 e recentemente estudos de nosso grupo mostraram que a leptina é modulada pelo T_3 por meio da via PI3K em adipócitos, 3T3-L1 [76]. Todos os resultados possuem expressão alterada pela via extra-nuclear de ação do hormônio tireoidiano pela PI3K, pois qualquer expressão foi interrompida com o tratamento concomitante de LY294002.

No presente estudo usamos o inibidor específico da via PI3K, LY294002, e observamos que os níveis de expressão gênica de *AREG*, que foram aumentados pelo T_3 , foram suprimidos pela presença de LY294002 (Fig. 5 e Fig. 10) em ambas as linhagens celulares e em todos os tempos de incubação. O uso de inibidores da PI3K como LY comprovam que este efeito do HT é dependente da cascata iniciada por PI3K, sugerindo fortemente que o aumento da regulação da transcrição do gene *AREG* é

mediado pela via PI3K, ativada pelo T_3 . Cao et al. [77] descreveram que o T_3 interage com a subunidade $p85\alpha$ da PI3K por meio de sua ligação ao $TR\beta$ no citosol. Essa ligação leva a ativação da PI3K e consequente ativação de uma cascata de sinalização compreendendo fosforilação sequencial de Akt, mTOR e seu substrato P70. Essa sinalização ocorre muito rapidamente, com a fosforilação de mTOR ocorrendo em até 10 minutos após o tratamento com T_3 [78], o que vem ao encontro do nosso trabalho, pois a partir de 10 minutos é possível notar a necessidade da via para a ação do T_3 . De acordo com trabalhos encontrados na literatura algumas ações dos HT são iniciadas e finalizadas no meio extra-nuclear e ocorrem por meio da ativação da PI3K, com a fosforilação de proteínas já prontas e presentes no citoplasma [79,80,81].

Assim como no estudo de Moeller *et al.* [33], onde foi possível verificar a necessidade da ativação da via PI3K para modulação do gene HIF-1 α pelo T_3 , em nosso estudo foi possível verificar essa necessidade para modulação do gene *AREG* para as duas linhagens celulares estudadas.

7. CONCLUSÃO

Nosso trabalho confirma que a expressão gênica de *AREG* está aumentada na presença T_3 , em ambas as linhagens e em todos os momentos estudados. Os dados desse estudo indicam que T_3 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 T_3 sobre a expressão gênica de *AREG* ocorre de forma indireta. O T_3 mantém a expressão de *AREG* mesmo após a inibição da transcrição. E, que a ativação da via PI3K pelo T_3 é necessária para a modulação do gene *AREG* em ambas as linhagens estudadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Porter P (2008) "Westernizing" women's risks? Breast cancer in lower-income countries. *N Engl J Med* 358: 213-216.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127: 2893-2917.
3. INCA. Brasil. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2013. Rio de Janeiro: INCA; 2013.
4. Kim JJ, Chapman-Davis E Role of progesterone in endometrial cancer. *Semin Reprod Med* 28: 81-90.
5. Lewis-Wambi JS, Jordan VC (2009) Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit? *Breast Cancer Res* 11: 206.
6. Mazumdar A, Wang RA, Mishra SK, Adam L, Bagheri-Yarmand R, et al. (2001) Transcriptional repression of oestrogen receptor by metastasis-associated protein 1 corepressor. *Nat Cell Biol* 3: 30-37.
7. Mishra SK, Yang Z, Mazumdar A, Talukder AH, Larose L, et al. (2004) Metastatic tumor antigen 1 short form (MTA1s) associates with casein kinase I-gamma2, an estrogen-responsive kinase. *Oncogene* 23: 4422-4429.
8. Silva JM, Dominguez G, Gonzalez-Sancho JM, Garcia JM, Silva J, et al. (2002) Expression of thyroid hormone receptor/erbA genes is altered in human breast cancer. *Oncogene* 21: 4307-4316.
9. McBryan J, Howlin J, Napoletano S, Martin F (2008) Amphiregulin: role in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13: 159-169.
10. Eckstein N, Servan K, Girard L, Cai D, von Jonquieres G, et al. (2008) Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells. *J Biol Chem* 283: 739-750.
11. Addison CL, Ding K, Zhao H, Le Maitre A, Goss GD, et al. Plasma transforming growth factor alpha and amphiregulin protein levels in NCIC Clinical Trials Group BR.21. *J Clin Oncol* 28: 5247-5256.
12. Ishikawa N, Daigo Y, Takano A, Taniwaki M, Kato T, et al. (2005) Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 65: 9176-9184.
13. Figueiredo, N.B. Estrogen-responsive genes overlap with triiodothyronine-responsive genes in a breast 1 carcinoma cell line, 2013.
14. Brooks SC, Locke ER, Soule HD (1973) Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem* 248: 6251-6253.
15. Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL, Levin ER (2004) Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol* 18: 2854-2865.
16. Nogueira CR, Brentani MM (1996) Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 59: 271-279.
17. McGuire WL, Chamness GC, Costlow ME, Shepherd RE (1974) Hormone dependence in breast cancer. *Metabolism* 23: 75-100.
18. Martinez-Lacaci I, Saceda M, Plowman GD, Johnson GR, Normanno N, et al. (1995) Estrogen and phorbol esters regulate amphiregulin expression by two separate mechanisms in human breast cancer cell lines. *Endocrinology* 136: 3983-3992.
19. Jensen EV, Cheng G, Palmieri C, Saji S, Makela S, et al. (2001) Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15197-15202.
20. Vorherr H (1987) Thyroid function in benign and malignant breast disease. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23: 255-257.

21. Thomas BS, Bulbrook RD, Russell MJ, Hayward JL, Millis R (1983) Thyroid function in early breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19: 1213-1219.
22. Rose DP, Davis TE (1978) Plasma thyroid-stimulating hormone and thyroxine concentrations in breast cancer. *Cancer* 41: 666-669.
23. Takatani O, Okumoto T, Kosano H, Nishida M, Hiraide H, et al. (1989) Relationship between the levels of serum thyroid hormones or estrogen status and the risk of breast cancer genesis in Japanese women. *Cancer Res* 49: 3109-3112.
24. Cristofanilli M, Yamamura Y, Kau SW, Bevers T, Strom S, et al. (2005) Thyroid hormone and breast carcinoma. Primary hypothyroidism is associated with a reduced incidence of primary breast carcinoma. *Cancer* 103: 1122-1128.
25. Saraiva PP, Figueiredo NB, Padovani CR, Brentani MM, Nogueira CR (2005) Profile of thyroid hormones in breast cancer patients. *Braz J Med Biol Res* 38: 761-765.
26. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* 31: 139-170.
27. Williams GR (2008) Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. *J Neuroendocrinol* 20: 784-794.
28. Bernal J (2007) Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3: 249-259.
29. Liu YY, Brent GA Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation. *Trends Endocrinol Metab* 21: 166-173.
30. Moeller LC, Broecker-Preuss M Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. *Thyroid Res* 4 Suppl 1: S6.
31. Cheng SY (2005) Thyroid hormone receptor mutations and disease: beyond thyroid hormone resistance. *Trends Endocrinol Metab* 16: 176-182.
32. Davis PJ, Leonard JL, Davis FB (2008) Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol* 29: 211-218.
33. Moeller LC, Dumitrescu AM, Refetoff S (2005) Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1 α and glycolytic genes. *Mol Endocrinol* 19: 2955-2963.
34. Kansra S, Yamagata S, Sneade L, Foster L, Ben-Jonathan N (2005) Differential effects of estrogen receptor antagonists on pituitary lactotroph proliferation and prolactin release. *Mol Cell Endocrinol* 239: 27-36.
35. Hollstein U, Breitmaier E, Jung G (1974) 13-C nuclear magnetic resonance study of actinomycin D. *J Am Chem Soc* 96: 8036-8040.
36. Sobell HM (1985) Actinomycin and DNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 5328-5331.
37. Maira SM, Stauffer F, Schnell C, Garcia-Echeverria C (2009) PI3K inhibitors for cancer treatment: where do we stand? *Biochem Soc Trans* 37: 265-272.
38. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25: 402-408.
39. Lee SB, Huang K, Palmer R, Truong VB, Herzlinger D, et al. (1999) The Wilms tumor suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulin. *Cell* 98: 663-673.
40. Schuger L, Johnson GR, Gilbride K, Plowman GD, Mandel R (1996) Amphiregulin in lung branching morphogenesis: interaction with heparan sulfate proteoglycan modulates cell proliferation. *Development* 122: 1759-1767.
41. Adam RM, Borer JG, Williams J, Eastham JA, Loughlin KR, et al. (1999) Amphiregulin is coordinately expressed with heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the interstitial smooth muscle of the human prostate. *Endocrinology* 140: 5866-5875.

42. Willmarth NE, Ethier SP (2008) Amphiregulin as a novel target for breast cancer therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13: 171-179.
43. Vonderhaar BK, Greco AE (1979) Lobulo-alveolar development of mouse mammary glands is regulated by thyroid hormones. *Endocrinology* 104: 409-418.
44. Lopez-Barahona M, Fialka I, Gonzalez-Sancho JM, Asuncion M, Gonzalez M, et al. (1995) Thyroid hormone regulates stromelysin expression, protease secretion and the morphogenetic potential of normal polarized mammary epithelial cells. *EMBO J* 14: 1145-1155.
45. Gonzalez-Sancho JM, Figueroa A, Lopez-Barahona M, Lopez E, Beug H, et al. (2002) Inhibition of proliferation and expression of T1 and cyclin D1 genes by thyroid hormone in mammary epithelial cells. *Mol Carcinog* 34: 25-34.
46. Yokoe T, Iino Y, Takei H, Horiguchi J, Koibuchi Y, et al. (1996) Relationship between thyroid-pituitary function and response to therapy in patients with recurrent breast cancer. *Anticancer Res* 16: 2069-2072.
47. Yokoe T, Iino Y, Takei H, Horiguchi J, Koibuchi Y, et al. (1997) Changes of cytokines and thyroid function in patients with recurrent breast cancer. *Anticancer Res* 17: 695-699.
48. Goldman MB (1990) Thyroid diseases and breast cancer. *Epidemiol Rev* 12: 16-28.
49. Smyth PP, Smith DF, McDermott EW, Murray MJ, Geraghty JG, et al. (1996) A direct relationship between thyroid enlargement and breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 937-941.
50. Turken O, NarIn Y, Demlrbas S, Onde ME, Sayan O, et al. (2003) Breast cancer in association with thyroid disorders. *Breast Cancer Res* 5: R110-113.
51. Malik R, Mellor N, Selden C, Hodgson H (2003) Triiodothyronine enhances the regenerative capacity of the liver following partial hepatectomy. *Hepatology* 37: 79-86.
52. Francavilla A, Carr BI, Azzarone A, Polimeno L, Wang Z, et al. (1994) Hepatocyte proliferation and gene expression induced by triiodothyronine in vivo and in vitro. *Hepatology* 20: 1237-1241.
53. Di Fulvio M, Coleoni AH, Pellizas CG, Masini-Repiso AM (2000) Tri-iodothyronine induces proliferation in cultured bovine thyroid cells: evidence for the involvement of epidermal growth factor-associated tyrosine kinase activity. *J Endocrinol* 166: 173-182.
54. Tang HY, Lin HY, Zhang S, Davis FB, Davis PJ (2004) Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor. *Endocrinology* 145: 3265-3272.
55. Lin HY, Tang HY, Shih A, Keating T, Cao G, et al. (2007) Thyroid hormone is a MAPK-dependent growth factor for thyroid cancer cells and is anti-apoptotic. *Steroids* 72: 180-187.
56. Johnson GR, Saeki T, Auersperg N, Gordon AW, Shoyab M, et al. (1991) Response to and expression of amphiregulin by ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelial cells: nuclear localization of endogenous amphiregulin. *Biochem Biophys Res Commun* 180: 481-488.
57. Shoyab M, McDonald VL, Bradley JG, Todaro GJ (1988) Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 6528-6532.
58. Johnson GR, Saeki T, Gordon AW, Shoyab M, Salomon DS, et al. (1992) Autocrine action of amphiregulin in a colon carcinoma cell line and immunocytochemical localization of amphiregulin in human colon. *J Cell Biol* 118: 741-751.

59. Cook PW, Mattox PA, Keeble WW, Pittelkow MR, Plowman GD, et al. (1991) A heparin sulfate-regulated human keratinocyte autocrine factor is similar or identical to amphiregulin. *Mol Cell Biol* 11: 2547-2557.
60. Conde SJ, Luvizotto RA, Sibio MT, Katayama ML, Brentani MM, et al. (2008) Tamoxifen inhibits transforming growth factor- α gene expression in human breast carcinoma samples treated with triiodothyronine. *J Endocrinol Invest* 31: 1047-1051.
61. Cestari SH, Figueiredo NB, Conde SJ, Clara S, Katayama ML, et al. (2009) Influence of estradiol and triiodothyronine on breast cancer cell lines proliferation and expression of estrogen and thyroid hormone receptors. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 53: 859-864.
62. Johnston SJ, Cheung KL Fulvestrant - a novel endocrine therapy for breast cancer. *Curr Med Chem* 17: 902-914.
63. Meng R, Tang HY, Westfall J, London D, Cao JH, et al. Crosstalk between integrin α v β 3 and estrogen receptor- α is involved in thyroid hormone-induced proliferation in human lung carcinoma cells. *PLoS One* 6: e27547.
64. Shih A, Zhang S, Cao HJ, Boswell S, Wu YH, et al. (2004) Inhibitory effect of epidermal growth factor on resveratrol-induced apoptosis in prostate cancer cells is mediated by protein kinase C- α . *Mol Cancer Ther* 3: 1355-1364.
65. Tattersall MH, Sodergren JE, Dengupta SK, Trites DH, Modest EJ, et al. (1975) Pharmacokinetics of actinomycin D in patients with malignant melanoma. *Clin Pharmacol Ther* 17: 701-708.
66. Estlin EJ, Veal GJ (2003) Clinical and cellular pharmacology in relation to solid tumours of childhood. *Cancer Treat Rev* 29: 253-273.
67. Guhaniyogi J, Brewer G (2001) Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* 265: 11-23.
68. Liu D, Waxman DJ (2002) Post-transcriptional regulation of hepatic NADPH-cytochrome P450 reductase by thyroid hormone: independent effects on poly(A) tail length and mRNA stability. *Mol Pharmacol* 61: 1089-1096.
69. Baas D, Puymirat J, Sarlieve LL (1998) Posttranscriptional regulation of oligodendroglial thyroid hormone (T3) receptor beta 1 by T3. *Int J Dev Neurosci* 16: 461-467.
70. Edmonds M (2002) A history of poly A sequences: from formation to factors to function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 71: 285-389.
71. Meyer S, Temme C, Wahle E (2004) Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39: 197-216.
72. Toker A, Cantley LC (1997) Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387: 673-676.
73. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 22: 267-272.
74. Aubin D, Gagnon A, Sorisky A (2005) Phosphoinositide 3-kinase is required for human adipocyte differentiation in culture. *Int J Obes (Lond)* 29: 1006-1009.
75. Fang J, Ding M, Yang L, Liu LZ, Jiang BH (2007) PI3K/PTEN/AKT signaling regulates prostate tumor angiogenesis. *Cell Signal* 19: 2487-2497.
76. de Oliveira M, Luvizotto Rde A, Olimpio RM, De Sibio MT, Conde SJ, et al. Triiodothyronine Increases mRNA and Protein Leptin Levels in Short Time in 3T3-L1 Adipocytes by PI3K Pathway Activation. *PLoS One* 8: e74856.
77. Cao X, Kambe F, Moeller LC, Refetoff S, Seo H (2005) Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Mol Endocrinol* 19: 102-112.
78. Moeller LC, Cao X, Dumitrescu AM, Seo H, Refetoff S (2006) Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid

hormone receptor beta through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Nucl Recept Signal* 4: e020.

79. Davis PJ, Davis FB, Lin HY, Mousa SA, Zhou M, et al. (2009) Translational implications of nongenomic actions of thyroid hormone initiated at its integrin receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E1238-1246.
80. Lei J, Mariash CN, Ingbar DH (2004) 3,3',5-Triiodo-L-thyronine up-regulation of Na,K-ATPase activity and cell surface expression in alveolar epithelial cells is Src kinase- and phosphoinositide 3-kinase-dependent. *J Biol Chem* 279: 47589-47600.
81. Lin HY, Sun M, Tang HY, Lin C, Luidens MK, et al. (2009) L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* 296: C980-991.

9. ANEXOS

ANEXO 01



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde nº 37
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 09 de novembro de 2.009

OF. 417/2009-CEP

Ilustríssima Senhora
Profª. Drª. Célia Regina Nogueira
Departamento de Clínica Médica da
Faculdade de Medicina de Botucatu.

Prezada Drª Célia,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa, (Protocolo CEP 3367-2009) "Efeito não genômico do tratamento com T3 e E2 na expressão gênica de Anphiregulin em células tumorais de mama", que será conduzido por Maria Teresa De Sibio, orientada por Vossa Senhoria, Co-orientada pelo Prof. Dr. Sandro José Conde, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 09/11/2009.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.

ANEXO 02



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Fis.
Proc.

MUDANÇA DE TÍTULO EM PROJETO DE PESQUISA

Objetivo Acadêmico: Tese de Doutorado

Título constante no parecer inicial de aprovação:

EFEITO NÃO GENÔMICO DO TRATAMENTO COM T3 E E2 NA EXPRESSÃO GÊNICA DE AMPHIREGULIN EM CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA.

Título final:

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

Data da reunião do CEP que aprovou o parecer inicial: 09/11/2009.

Declaramos que o trabalho não sofreu alterações nos objetivos e/ou conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

Nome/assinatura do Orientador(a)

Nome/assinatura do Orientado(a)

16:09 15/01/2014 0000000 COMITE DE ETICA EM PESQUISA FMB - UNESP