



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

Fernanda Cristina Fontes Moretto

**AÇÃO EXTRA-NUCLEAR DO HORMÔNIO
TRIIODOTIRONINA (T₃) NA EXPRESSÃO GÊNICA DE
HIF-1 α E TGF α EM LINHAGEM CELULAR DE
ADENOCARCINOMA MAMÁRIO**

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

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

**Botucatu
2015**

Fernanda Cristina Fontes Moretto

AÇÃO EXTRA-NUCLEAR DO HORMÔNIO
TRIIODOTIRONINA (T_3) NA EXPRESSÃO
GÊNICA DE HIF-1 α E TGF α EM LINHAGEM
CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO

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

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

Botucatu
2015

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Moretto, Fernanda Cristina Fontes.

Ação extra-nuclear do hormônio triiodotironina (T3) na expressão gênica de HIF-1 α e TGF α ; em linhagem celular de adenocarcinoma mamário / Fernanda Cristina Fontes Moretto.
- Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Célia Regina Nogueira
Coorientador: Maria Teresa De Sibio
Capes: 40101002

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

Palavras-chave: Câncer de mama; HIF-1 α ; Hormônio tireoidiano; PI3K; TGF α .

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida!

A Deus, aos meus pais, Valério e Fátima, ao meu irmão Júnior, à minha família e ao meu namorado Felipe, pelo amor incondicional, carinho e atenção, assim como por todo apoio provido para a concretização de meus sonhos.

“Bote fé” e a vida terá um sabor novo, terá uma bússula que indica a direção;

“Bote esperança” e todos os seus dias serão iluminados e o seu horizonte já não será escuro, mas luminoso;

“Bote amor” e a sua existência será como uma casa construída sobre a rocha, o seu caminho será alegre, porque encontrará muitos amigos que caminham com você.

(Papa Francisco I)

Agradecimentos

A Deus, que me permitiu estar aqui, e que ao longo da minha vida caminha a meu lado iluminando meus passos, abençoando minhas escolhas, e que, nos momentos mais difíceis não me abandona.

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

Ao meu namorado Felipe, pelo amor, carinho e compreensão. Sempre me apoiando em minha caminhada.

A todos meus queridos amigos, que sempre torceram por mim, sem vocês tudo seria mais difícil... “Amigos são irmão que Deus nos permite escolher”!

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

À Dra. Maria Teresa De Sibio, que além de coorientadora, uma pessoa amiga e muito especial que tive o prazer de conhecer. Obrigada pela paciência, pela dedicação e por tudo que me ensinou, sempre muito prestativa e presente em todas as etapas deste trabalho.

À Aline Carbonera Luvizon, pela companhia, amizade e por todo o conhecimento técnico e científico, torço muito por você!

À Dani Tomaz e a Regiane, conhecer vocês fez toda diferença nessa caminhada. Obrigada pela amizade, carinho, e por todos os momentos que passamos juntas.

Às meninas da “Bio Mol”, sempre dispostas a ajudar no que é preciso. Obrigada pela amizade construída e muito sucesso a vocês!

À Renata, Paulinha e Corina, por compartilharem momentos de alegrias e dificuldades, sempre prontas para me auxiliar em diversos assuntos.

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

Aos amigos do Laboratório Experimental da Clínica Médica: Dri, Dani Vileigas, Loreta, Paulinha Grippa, Dijon, Carlos, Paulinha Paccielli, Pri, Andrea, Bruna, Renata, Damiana, Pri Moreira, Tamara, Sandro, Eliege, Camilla, Sarah, Camila Gimenes, Camilinha, Rodrigo, Paula, Aline, Camila Bonomo, Dani Guizoni, Luana, Mariana, Marcelo, Ricardo. Obrigada a todos pela amizade e pelos momentos que passamos juntos.

Aos funcionários do Departamento e do Laboratório Experimental da Clínica Médica: Igor, Renata, Paulinha, Corina, Camila, Vick, Regina, Cris, Victor, Paulinho, Sueli Garcia, Elenize, Zé, Mário, Ângelo, Rogerinho, Boca, De Lalla, Elizangela, Bruno Fajiolli, Bruno Silva, pela convivência, colaboração e auxílios prestados.

À Dra. Denise Fecchio, que disponibilizou seu laboratório para que nosso trabalho fosse concluído com êxito.

À banca de qualificação Dra. Vânia e Dr. Robson, por cada correção e sugestão durante o exame geral de qualificação que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À banca de defesa Dra. Patrícia e Dra. Maria Izabel pela disponibilidade.

À bibliotecária Meire pela correção das referências desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Este trabalho não é resultado apenas de um esforço individual. Ele nasce de significativas contribuições que recolhi durante minha trajetória pessoal e profissional ao lidar com pessoas que foram fundamentais a essa construção. Muito obrigada a todos!

“Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar.”

(Esopo)

Na literatura é demonstrado que altos níveis de expressão de *HIF-1 α* no CM humano estão relacionados à carcinogênese mamária e modificações moleculares decorrentes do processo de vascularização tumoral. Em trabalhos prévios do nosso grupo, demonstramos que a expressão de *TGF α* encontra-se aumentada nos tratamentos com T₃, no entanto essa expressão não ocorre em modelos celulares que não apresentem o receptor de estrógeno ou quando as células são concomitantemente tratadas com antiestrogênio Tamoxifen. O objetivo do presente estudo é determinar a ação do hormônio T₃ via extra-nuclear para a expressão dos genes *HIF-1 α* e *TGF α* em linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF-7. A linhagem celular foi submetida ao tratamento com 10⁻⁸M de T₃ nos tempos de 10', 30', 1h e 4h, na presença ou ausência dos inibidores Fulvestrant - inibidor de ER, Actinomicina D - inibidor da expressão gênica, Ciclohexamida - inibidor da síntese protéica, e LY294002 - inibidor da via PI3K. O mRNA de *HIF-1 α* e *TGF α* 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 presente trabalho confirma que a expressão gênica de *HIF-1 α* e *TGF α* estão aumentadas na presença T₃ nas células MCF-7 e em todos os tempos estudados. Ocorreu uma diminuição na expressão gênica de *HIF-1 α* quando T₃ está associado ao inibidor da transcrição gênica, no entanto para o gene *TGF α* a expressão gênica foi diminuída no tempo de 10', porém, o contrário foi observado a partir de 30' onde não houve diferença estatística com a inibição da transcrição gênica. Além disso, podemos sugerir que a ação de T₃ sobre a expressão desses genes ocorre de forma indireta. A ativação da via PI3K pelo T₃ é necessária para a modulação desses genes na linhagem estudada.

Palavras-chave: Hormônio Tireoidiano, Câncer de mama, *HIF-1 α* , *TGF α* e PI3K.

In the literature it has been demonstrated that high levels of expression of *HIF-1 α* in human BC are related to mammary carcinogenesis and molecular changes resulting from the tumor vascularization process. In previous work from our group, we showed that the *TGF α* expression is increased upon treatments with T₃, but this increase does not occur in cellular models devoid of the estrogen receptor or when the cells are concomitantly treated with the antiestrogen compound Tamoxifen. The objective of this study is to determine the extranuclear action of T₃ hormone on *HIF-1 α* and *TGF α* expression in MCF7 breast adenocarcinoma cell line. The cells were subjected to treatment with 10⁻⁸M T₃ for 10', 30', 1h and 4h in the presence or absence of inhibitors Fulvestrant- ER inhibitor-, Actinomycin D - gene expression inhibitor -, cyclohexamide - protein synthesis inhibitor-, and LY294002 - PI3K inhibitor. The *HIF-1 α* and *TGF α* mRNA expressions were analyzed by RT-PCR. For data analysis we used ANOVA complemented with Tukey test and adopted minimum 5% significance. The present study confirms that the gene expressions of *HIF-1 α* and *TGF α* are increased in the presence of T₃ in MCF-7 cells at all times studied. T₃ represses *HIF-1 α* at all time points assessed after inhibition of transcription, though for *TGF α* this effect was observed only at 10', after what no significant difference in its expression was detected, with inhibition of transcription. Furthermore, we suggest that the action of T₃ on the expression of these genes occurs indirectly and occurs through activation of PI3K pathway, in the cell line studied.

Keywords: Thyroid hormone, breast cancer, *HIF-1 α* , *TGF α* and PI3K.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática de ação celular clássica dos hormônios tireoidianos (HT).....	18
Figura 2: Representação esquemática de ações celulares não clássicas dos hormônios tireoidianos (HT).....	19
Figura 3: Indução dos genes fator indutor de hipóxia (<i>HIF-1α</i>); transportador de glicose 1 (<i>GLUT1</i>); fosfofrutoquinase (<i>PFKP</i>) e transportador de monocarboxilato (<i>MCT4</i>) pelo hormônio triiodotironina (T_3).....	21
Figura 4: Efeitos do T_3 sobre a expressão gênica de <i>HIF-1α</i> em células MCF-7.....	27
Figura 5: Efeito do T_3 associado ao Fulvestrant (ICI) sobre a expressão gênica de <i>HIF-1α</i> em células MCF-7.....	28
Figura 6: Efeito do T_3 associado a Actinomicina D (ACTD) sobre a expressão gênica de <i>HIF-1α</i> em células MCF-7.....	29
Figura 7: Efeito do T_3 associado a Ciclohexamida (CHX) sobre a expressão gênica de <i>HIF-1α</i> em células MCF-7.....	30
Figura 8: Efeito do T_3 associado a LY294002 (LY) sobre a expressão gênica de <i>HIF-1α</i> em células MCF-7.....	32
Figura 9: Efeitos do T_3 sobre a expressão gênica de <i>TGFα</i> em células MCF-7.....	33
Figura 10: Efeito do T_3 associado ao Fulvestrant (ICI) sobre a expressão gênica de <i>TGFα</i> em células MCF-7.....	34
Figura 11: Efeito do T_3 associado a Actinomicina D (ACTD) sobre a expressão gênica de <i>TGFα</i> em células MCF-7.....	35
Figura 12: Efeito do T_3 associado a Ciclohexamida (CHX) sobre a expressão gênica de <i>TGFα</i> em células MCF-7.....	37
Figura 13: Efeito do T_3 associado a LY294002 (LY) sobre a expressão gênica de <i>TGFα</i> em células MCF-7.....	38

Lista de Abreviaturas

ACTD – Actinomicina D

Akt – Proteína quinase b

ANOVA – Análise de variância

AREG – Amphiregulin

bHLH – Fator de transcrição hélice-alça-hélice

C – Controle

cDNA – Ácido Desoxirribonucleico Complementar

CHX – Ciclohexamida

CM – Câncer de mama

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

E₂ – Hormônio estrogênio

EGF – Fator de crescimento epidérmico

ER – Receptor de estrogênio

ERK1/2 – Quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2

ER α – Receptor de estrógeno alfa

ER β – Receptor de estrógeno beta

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GLUT1 – Transportador de glicose 1

GLUT4 – Transportador de glucose 2

HIF – Fator indutor de hipóxia

HIF-1 α – Fator indutor de hipóxia 1 subunidade alfa

HRE – Elemento responsivo a hipóxia

HT – Hormônio tireoidiano

ICI – Fulvestrant

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LY – LY294002

MAPK – Proteínas quinases ativadas por mitógenos

MCT4 – Transportador de monocarboxilato

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

mTOR – Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

NaOH – Hidróxido de sódio

n.s. – Não significativo

p70^{S6K} – Proteína ribossomal 70 quinase S6

PFKP – Fosfofrutoquinase

PgR – Receptor de progesterona

PHLDA1 – domínio homólogo a pleckstrina, família A, membro 1

PI3K – Fosfatidil inositol 3 quinase

RNA - Ácido Ribonucléico

RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SERD – Seletive estrogen receptor down-regulators

T₃ – Triiodotironina

T₄ – Tiroxina

TGF α – Fator de crescimento transformante subunidade alfa

TGF β – Fator de crescimento transformante subunidade beta

TRs – Receptores de hormônio tireoidiano

TR α – Receptor de hormônio tireoidiano alfa

TR β – Receptor de hormônio tireoidiano beta

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

ZAKI-4 α – Inibidor de calcineurina

SUMÁRIO

Pág.

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. HIPÓTESE.....	22
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo Geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Reagentes.....	23
4.2 Cultura de Células.....	24
4.3 Tratamentos da linhagem celular.....	24
4.4 Análise da expressão gênica por RT-PCR.....	25
4.5 Análise Estatística.....	26
5. RESULTADOS.....	26
5.1 Expressão gênica <i>HIF-1α</i>	26
5.1.1 T ₃ eleva os níveis de expressão de mRNA de <i>HIF-1α</i>	26
5.1.2 Efeito do T ₃ associado ao inibidor Fulvestrant (ICI 182,780) sobre a expressão gênica de <i>HIF-1α</i>	27
5.1.3 Efeito da inibição da expressão de RNA com Actinomicina D (ACTD) sobre os efeitos do T ₃ na expressão de <i>HIF-1α</i>	28
5.1.4 Efeito da inibição da síntese proteica com Ciclohexamida (CHX) na ação do T ₃ sobre a expressão gênica de <i>HIF-1α</i> em células tumorais mamárias.....	30
5.1.5 Efeito da inibição da via PI3K com LY294002 (LY) na ação do T ₃ sobre a expressão gênica de <i>HIF-1α</i>	31
5.2 Expressão gênica <i>TGFα</i>	32
5.2.1 T ₃ eleva os níveis de expressão de mRNA de <i>TGFα</i>	32

5.2.2 Efeito do T ₃ associado ao inibidor Fulvestrant (ICI 182,780) sobre a expressão gênica de <i>TGFα</i>	33
5.2.3 Efeito da inibição da expressão de RNA com Actinomicina D (ACTD) sobre os efeitos do T ₃ na expressão de <i>TGFα</i>	35
5.2.4 Efeito da inibição da síntese proteica com Ciclohexamida (CHX) na ação do T ₃ sobre a expressão gênica de <i>TGFα</i> em células tumorais mamárias.....	36
5.2.5 Efeito da inibição da via PI3K com LY294002 (LY) na ação do T ₃ sobre a expressão gênica de <i>TGFα</i>	37
6. DISCUSSÃO.....	39
7. CONCLUSÃO.....	44
8. REFERÊNCIAS.....	45
9. ANEXOS.....	54

1. INTRODUÇÃO

Apesar do expressivo avanço no diagnóstico e tratamento, o câncer de mama (CM) ainda representa um desafio importante e permanente para os responsáveis em saúde pública. As estatísticas de CM indicam 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⁾. No Brasil, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para os anos de 2014 e 2015, é de aproximadamente 57.120, casos novos de câncer de mama em mulheres⁽³⁾. O crescimento e o desenvolvimento de muitos cânceres humanos, incluindo o CM, são conhecidos por serem influenciados por hormônios esteróides^(4,5). A responsividade anormal das células, especialmente ao hormônio estrogênio (E_2) tem sido uma das principais causas de desenvolvimento e progressão do carcinoma mamário^(6,7).

Os hormônios tireoidianos (HT) têm sido propostos por influenciar o desenvolvimento de CM⁽⁸⁾. A Triiodotironina (T_3), 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 E_2 . Contudo, estudos epidemiológicos ainda são contraditórios em relação a sua influência no CM⁽⁹⁻¹⁴⁾. O envolvimento dos HT no desenvolvimento e diferenciação do tecido mamário normal é bem estabelecido⁽¹⁵⁻¹⁷⁾, enquanto estudos epidemiológicos e experimentais, que têm associado patologias da tireoide com um risco aumentado de CM, são controversos nessa condição^(11-13,18-23). O T_3 estimula a proliferação de uma variedade de células não malignas⁽²³⁻²⁵⁾, incluindo células de mama⁽²⁶⁾ e da tireóide⁽²⁷⁾.

Considerando-se os dados de influência do HT em carcinomas mamário, somando-se trabalhos do nosso grupo observamos uma maior frequência de hipertireoidismo em pacientes menopausadas portadoras de câncer de mama^(14,28,29).

Muitos tumores induzem a transcrição de uma série de genes relacionados à angiogênese, entre eles o fator indutor de hipóxia (*HIF-1*) e o fator de crescimento transformante subunidade alfa (*TGF α*). O *HIF-1* induz a tradução de genes relacionados à angiogênese, favorecendo esta via de carcinogênese⁽³⁰⁾. Sabe-se ainda que a produção de *TGF α* é em parte controlada por *HIF*⁽³¹⁾, encontrando-se constitucionalmente ativa em células de carcinoma de células renais, conforme demonstrado por Gunaratnam et al.⁽³²⁾. Nesse estudo, utilizando a linhagem celular 786-0, demonstrou-se que a ativação de *HIF* está estreitamente relacionada ao aumento dos níveis de mRNA para *TGF α* e ao crescimento celular soro-independente⁽³²⁾.

Estudos anteriores demonstraram que a superexpressão de *HIF-1* e *TGF α* está positivamente relacionada com a agressividade do tumor e com a progressão maligna em neoplasias humanas⁽³³⁻³⁵⁾.

O *HIF-1* é um fator heterodímero (fator de transcrição nuclear) que regula a transcrição dos elementos responsivos a hipóxia (HRE). Quando falta oxigênio nos tecidos, o *HIF-1* medeia a sobrevivência celular através da ativação transcricional de genes que auxiliam manutenção da homeostase celular⁽³⁶⁻³⁹⁾. 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 (1 α , 2 α e 3 α)⁽⁴⁰⁾. Já a β , é constitutiva, mantida em níveis constantes de expressão, independente da concentração de oxigênio^(41,42).

O fator indutor de hipóxia 1 subunidade alfa (*HIF-1 α*) está localizado no cromossomo 14q21-q24 contendo quinze éxons,⁽⁴³⁾ possui 2.478 pares de base e a proteína consiste de 826 aminoácidos, com uma massa molecular que varia de 104 kDa a 116 kDa⁽⁴⁴⁾.

A proteína *HIF-1 α* em normóxia é rapidamente degradada⁽⁴⁵⁾, quando em hipóxia, esta se torna estável e se desloca do citoplasma para o núcleo da célula, onde

dimeriza com a subunidade β , formando o complexo ativado *HIF-1*, que induz a expressão de genes-alvo^(46,47). Por esse motivo, a unidade α do *HIF-1* funciona como regulador de níveis de oxigênio⁽⁴⁸⁾. Uma das funções do fator *HIF-1* é a indução da transcrição da proteína, fator de crescimento do endotélio vascular (*VEGF*)^(49,50). O *VEGF*, por sua vez, estimula o recrutamento de células endoteliais para a formação de novos capilares que aumentam a capacidade de transporte do oxigênio para áreas em hipóxia, em um processo denominado angiogênese⁽³⁹⁾. Os genes-alvo da ação do fator *HIF-1 α* são particularmente relevantes na codificação de fatores angiogênicos, fatores de proliferação e de sobrevivência celular, além de transportadores de glicose e de enzimas glicolíticas, aumentando a disponibilidade de oxigênio^(51,39).

Um estudo realizado por Zong et al.⁽⁵²⁾, mostrou que a proteína *HIF-1 α* é superexpressa em vários tumores humanos (cólon, mama, estômago, pulmão, pele, ovário, próstata, renal e carcinomas pancreáticos) quando comparado com tecidos normais, sendo também mais pronunciada em lesões pré-malignas do que em lesões benignas⁽⁵²⁾. Esses resultados enfatizam que *HIF-1 α* desempenha um papel importante no crescimento do tumor e na progressão a metástase. Sua atuação como um potente ativador da angiogênese ocorre pela estimulação da produção de *VEGF* e de muitos outros fatores que iniciam a proliferação das células endoteliais, invasão e migração⁽⁵³⁾. Assim, *HIF-1 α* é uma subunidade induzível do fator de transcrição heterodimérico *HIF-1* que inicia um papel chave na adaptação patofisiológica das células do tumor⁽⁵⁴⁾. A superexpressão de *HIF-1 α* pode representar um evento precoce na carcinogênese, sugerindo seu potencial como biomarcador de lesões pré-cancerosas⁽⁵⁵⁾, o que o torna um alvo promissor para a terapia anticâncer^(56,57). A regulação de genes envolvidos na progressão do tumor, angiogênese e vasodilatação por *HIF-1 α* sugerem que a inibição da ligação destes ao DNA pode ter um potencial clínico⁽⁵⁸⁾.

O gene *TGF α* é um fator de crescimento característico dos mamíferos que podem ser afetados pela dieta e hormônios. Ele está localizado no cromossomo 2p13, compreende 80 quilobases de DNA genômico e possui seis éxons^(59,60). Esse peptídeo foi descrito pela primeira vez em 1978, em um meio de cultura de fibroblastos transformados por vírus sarcoma. A adição desse meio parcialmente purificado a fibroblastos normais causou o surgimento reversível do fenótipo maligno (transformado) e, por isso, foi denominado fator de crescimento transformante. Descobriu-se posteriormente que essa atividade transformadora era promovida por duas proteínas distintas, o *TGF α* e o fator de crescimento transformante beta (*TGF β*). Mais tarde, o *TGF α* foi identificado como uma molécula com atividade semelhante à do fator de crescimento epidérmico (*EGF*)⁽⁶⁰⁾.

O *TGF α* é produzido por uma variedade de células, primariamente de origem ectodérmica, e pode interagir com o receptor do *EGF* e induzir respostas durante o contato celular⁽⁶¹⁾. Sua expressão ocorre em diversos tecidos desde a embriogênese até a fase adulta⁽⁶²⁾. Esse fator de crescimento é sintetizado sob a forma de uma molécula precursora ligada a membrana plasmática, na qual estão presentes: um peptídeo sinal, uma sequência de 50 aminoácidos relativa à molécula madura, uma região transmembrana e uma região intracelular⁽⁶³⁾. Têm sido descrito como um fator produzido por células tumorais secretado por muitos tumores⁽⁶⁴⁾, podendo ocorrer sua superexpressão durante a progressão maligna⁽³⁵⁾.

Em trabalhos prévios nós demonstramos que a expressão de *TGF α* encontra-se aumentada nos tratamentos com T₃ e E₂, no entanto essa expressão não ocorre em modelos celulares que não apresentem o receptor de estrógeno ou quando as células são concomitantemente tratadas com antiestrogênio Tamoxifen⁽⁶⁵⁾. Em culturas primárias não observamos o efeito inibitório do Tamoxifen sobre *TGF α* ⁽⁶⁶⁾ e ainda não há relatos da expressão desse gene no tratamento com T₃ e ICI, ou sobre qual via ativa a expressão desse gene durante esses tratamentos.

Embora o T_3 exerça muitas ações pela regulação genômica clássica da transcrição gênica, um número de efeitos do T_3 ocorre rapidamente e não são afetados por inibidores da transcrição e da síntese protéica (Figura 1)⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾.

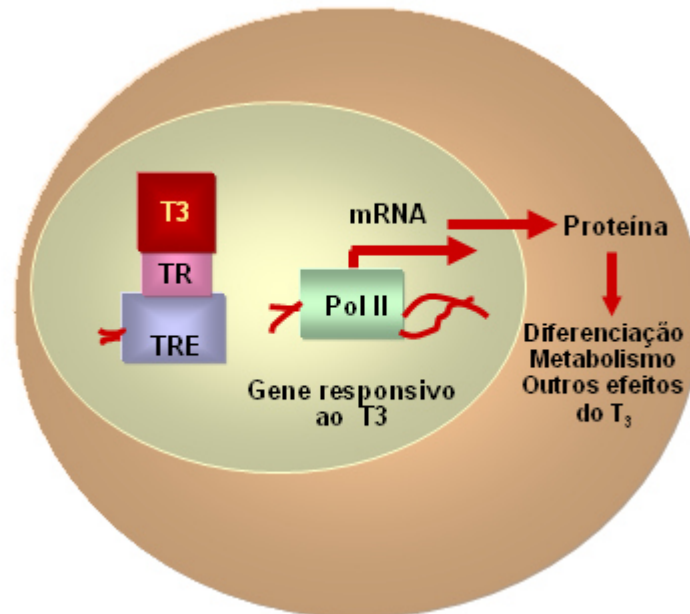


Figura 1. Representação esquemática de ação celular clássica dos hormônios tireoidianos.

A via de sinalização dos HT é complexa e altamente regulada devido à expressão de transportadores específicos dos HT, presença de múltiplas isoformas de receptores de HT (TRs) em células e tecidos e também devido às interações que ocorrem entre esses mediadores^(70,71). Além disso, em muitos casos, as vias de sinalização da tireoide estão envolvidas em *cross-talk* com uma variedade de outras vias de sinalização^(72,73).

Sabe-se que os HT podem agir por outros mecanismos além da ação clássica TR/elementos responsivos aos HT (TRE)⁽⁷⁴⁾, mecanismos estes que podem ser chamados de ação não clássica ou não-genômica (Figura 2).

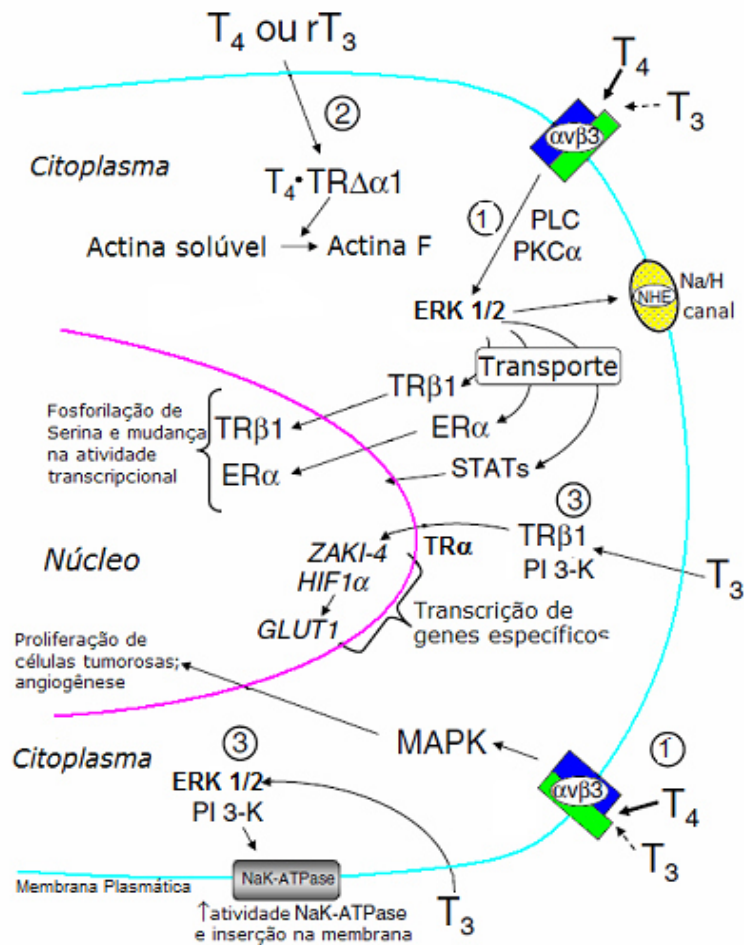


Figura 2. Representação esquemática de ações celulares não clássicas dos hormônios tireoidianos. 1) Ações de HT via integrina $\alpha\beta3$. 2) Ações de HT via $TR\Delta\alpha1$. 3) Ações de HT via PI3K. T_3 , triiodotironina; T_4 , tiroxina; $TR\alpha$, receptor alfa dos HT; $TR\Delta\alpha1$, forma truncada de $TR\alpha1$; PLC, fosfolipase C; $PKC\alpha$, proteína quinase C; $TR\beta1$, receptor beta dos HT; $ER\alpha$, receptor alfa do estrogênio; STATs, transdutor de sinal e ativador de transcrição; PI3K, fosfatidil inositol 3 quinase; MAPK, proteínas quinases ativadas por mitógenos; ERK1/2, quinases reguladas por sinal extracelular; *ZAKI-4*, gene inibidor de calcineurina; *HIF-1 α* , gene de fator indutor de hipoxia; *GLUT1*, transportador de glicose 1; NHE, trocador sódio-hidrogênio; Na, sódio; H, hidrogênio; K, potássio; ATPase, adenosina trifosfato. Retirado e modificado de Cheng et al., 2010⁽⁷⁰⁾.

Neste tipo de mecanismo, seus locais de iniciação podem estar na membrana plasmática, como na ativação da integrina $\alpha\beta3$, 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 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⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾.

Dentre os genes estimulados pelo tratamento com T_3 podemos destacar alguns genes relacionados com o metabolismo energético como *HIF-1 α* , transportador de glicose tipo 1 (*GLUT1*), fosfofrutoquinase (*PFKP*) e transportador de monocarboxilato (*MCT4*)⁽⁷⁷⁾. 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 *HIF-1 α* 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, o CHX mostra-se como um importante componente para distinguir ação direta ou indireta do hormônio tireoidiano⁽⁷⁸⁾ (Figura 3).

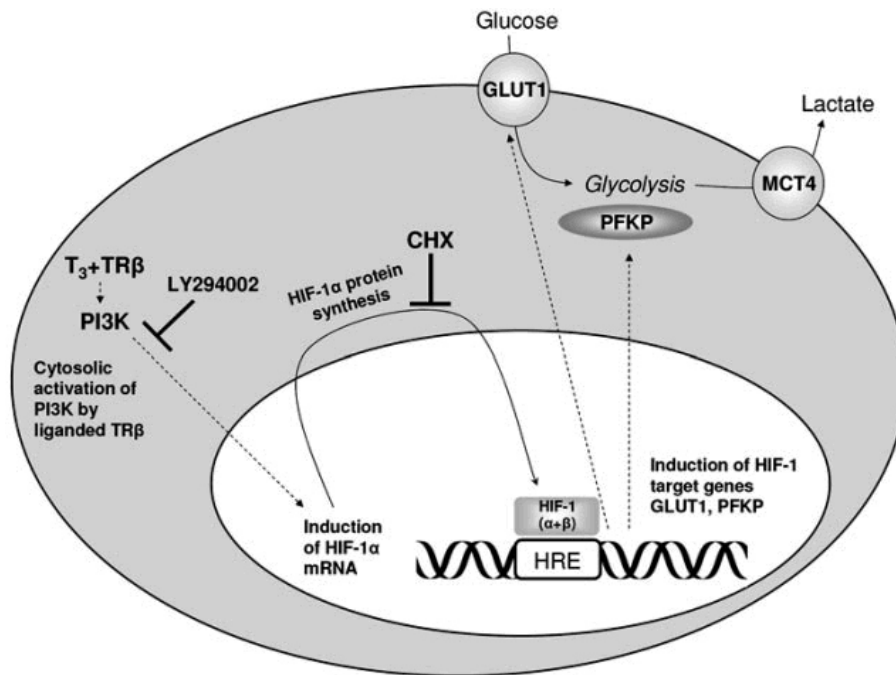


Figura 3: Indução de *HIF-1α*, *GLUT1* e *PFKP* pelo T₃: Ativação de PI3K no citosol, através da ligação do hormônio tireoidiano ao TRβ, aumenta diretamente a expressão de *HIF-1α*. Este aumento pode ser prevenido pela adição do inibidor da PI3K (LY294002). Depois de traduzido, *HIF-1α* liga-se a elementos de resposta a hipoxia (HRE) e induz a expressão de outros genes como *PFKP* ou *GLUT1*. Somente esses últimos possuem a influência do tratamento com T₃ bloqueada pela adição de ciclohexamida (CHX), demonstrando uma ação indireta do hormônio tireoidiano para sua expressão⁽⁷⁷⁾.

Para este estudo selecionamos a linhagem de células eternizadas de câncer de mama MCF-7. As MCF-7 foram isoladas em 1970 de uma mulher caucasiana de 69 anos de idade. Na primeira de duas mastectomias, o tecido removido possuía alterações de caráter benigno; porém cinco anos mais tarde, durante sua segunda cirurgia, um adenocarcinoma maligno foi encontrado⁽⁷⁹⁾. Durante a remoção dos nódulos da parede peitoral, uma efusão pleural foi descoberta, a partir da qual a linhagem MCF-7 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⁾. Esta linhagem tem morfologia fusiforme e são consideradas luminais⁽⁸⁰⁾.

Essa célula vem sendo utilizada, desde a década de 1980, como modelo de estudo para tumores de mama que expressam ER α (principal ER expresso nessa célula) e β e também TR α e β ^(65,81-83).

De acordo com a literatura os dados de influência do HT em carcinoma mamário e trabalho do nosso grupo que observaram em diferentes genes envolvidos em vias extra-nucleares, juntamente com o fato de análogos dos hormônios tireoidianos exercerem ativação da via PI3K^(14,66,84), o objetivo do presente estudo foi determinar a ação do hormônio T₃ na ativação da via PI3K para a expressão dos genes *HIF-1 α* e *TGF α* em linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF-7, nos tempos de 10', 30', 1h e 4h de tratamentos, verificando especificamente se suas ações mais imediatas (via extra-nuclear) estão relacionadas com níveis de expressão gênica.

2. HIPÓTESE

O hormônio T₃ altera a expressão dos genes *HIF-1 α* e *TGF α* , por meio da via extra-nuclear.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo teórico/científico desse projeto foi determinar a ação do hormônio T₃ na ativação da via extra-nuclear para a expressão dos genes *HIF-1 α* e *TGF α* em linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF-7, especificamente verificando se suas ações mais imediatas (via extra-nuclear) estão relacionadas com níveis de expressão gênica.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a ação do T₃ na expressão gênica de *HIF-1α* e *TGFα* em células MCF-7.
- Verificar se a ação do T₃ nos níveis de *HIF-1α* e *TGFα* dependem de ER em células MCF-7, por meio da administração do inibidor do receptor de ER Fulvestrant (ICI).
- Avaliar a ação do T₃ na expressão gênica de *HIF-1α* e *TGFα* após a inibição da transcrição em células MCF-7, por meio da administração do inibidor da transcrição gênica, Actinomicina D (ACTD).
- Verificar se ação do T₃ sobre o *HIF-1α* e *TGFα* é direta ou indireta em células MCF-7, por meio da administração do inibidor da tradução proteica, Ciclohexamida (CHX).
- Averiguar se ação do T₃ sobre os níveis de expressão gênica de *HIF-1α* e *TGFα* dependem da via PI3K, por meio da administração do inibidor da via PI3K, LY294002 (LY).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

RPMI, soro fetal bovino (FBS) e solução de antibiótico-100X foram adquiridos da Gibco BRL (Grand Island, NY, EUA). Actinomicina D (ACTD); ciclohexamida (CHX), fulvestrant (ICI), triiodotironina (T₃), LY294002 (LY), dimetilsulfóxido (DMSO), hidróxido de sódio (NaOH) e Charcoal Stripped FBS (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA).

4.2 Cultura de Células

A linhagem celular de carcinoma mamário humano MCF-7 foi adquirida no banco de células da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) – UNESP, Botucatu. Escolhemos essa linhagem celular por possuir o ER α e β e o TR α e β . Os experimentos foram realizados em triplicata. Células MCF-7 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 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 T₃ na dose 10⁻⁸M durante 10', 30', 1h e 4h. Os tratamentos com T₃ foram realizados, também, após a incubação com os inibidores, ICI (1uM; grupo T₃+ICI); ACTD (5,0pg/ml; grupo T₃+ACTD); CHX (50uM; grupo T₃+CHX); LY294002 (50uM; grupo T₃+LY). O grupo não tratado recebeu apenas 0,1 % de NaOH (diluyente de T₃) e foi utilizado como controle (C). Os inibidores de LY294002 e CHX foram adicionados ao meio 1h antes do tratamento com T₃.

4.3 Tratamentos da linhagem celular

A linhagem celular foi plaqueada e tratada durante os intervalos de tempo de 10', 30', 1 hora e 4 horas com T₃ (10⁻⁸M), ICI (1μM), T₃ (10⁻⁸M) + ICI (1μM), ACTD (5.0 pg/ml); T₃ (10⁻⁸M) + ACTD (5.0 pg/ml); CHX (50μM), T₃ (10⁻⁸M) + CHX (50μM), LY (50μM) e T₃ (10⁻⁸M) + LY (50μM). Optamos pelo fulvestrant (ICI 182.780), um antagonista do receptor de estrógeno de alta afinidade, o primeiro antiestrogênico "puro", sem qualquer atividade agonista in vitro e in vivo⁽⁸⁵⁾. Outro inibidor utilizado na linhagem foi actinomicina D

(ACTD), o primeiro antibiótico que demonstrou ter atividade anticâncer⁽⁸⁶⁾, 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⁽⁸⁷⁾. 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 da via fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K)⁽⁸⁸⁾.

4.4 Análise da expressão gênica por RT-PCR

O RNA total foi extraído a partir de células MCF-7 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 *HIF-1α* (Hs00153153_m1, Applied Biosystems) e *TGFα* (Hs00608187_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', desnaturação a 95°C durante 10', os produtos de cDNA foram amplificadas durante 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15'' e a extensão a 60°C durante 1'. 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 gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) (Hs02758991_g1), pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, como descrito anteriormente⁽⁸⁹⁾.

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 Expressão gênica *HIF-1 α*

5.1.1 T₃ eleva os níveis de expressão de *HIF-1 α*

A figura 4 mostra a expressão gênica de *HIF-1 α* em células MCF-7 tratadas com T₃ nos tempos de 10', 30', 1h e 4h. Os resultados demonstram que o tratamento com T₃ promove um aumento tempo dependente significativo da expressão gênica de *HIF-1 α* em todos os tempos de tratamento em células tumorais mamárias.

Figura 4.

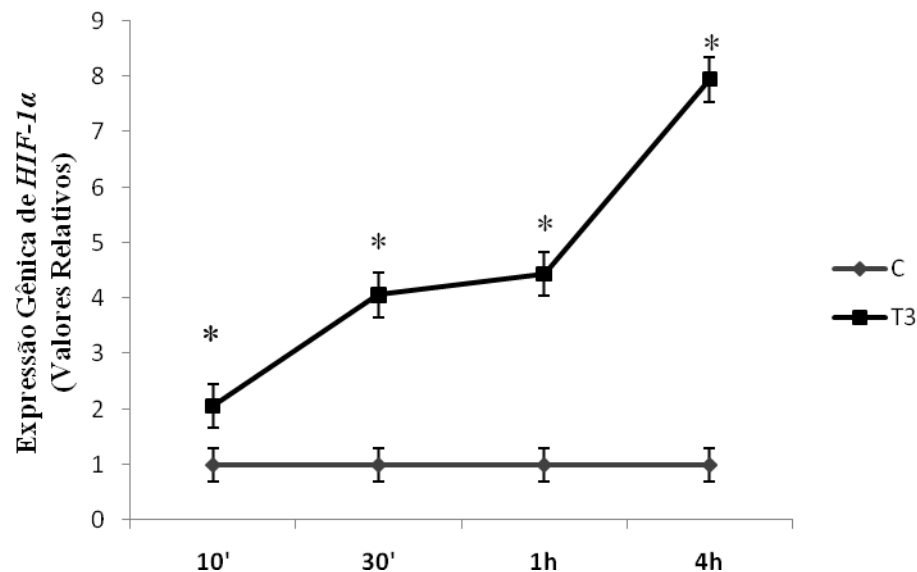


Figura 4. Efeitos do T_3 sobre a expressão gênica de *HIF-1α* em células MCF-7. C, Controle. T_3 , Triiodotironina. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos, 30 minutos, 1 hora e 4 horas. Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada ANOVA complementada com teste de Tukey. * $p < 0,001$.

5.1.2 Efeito do T_3 associado ao inibidor Fulvestrant (ICI 182,780) sobre a expressão gênica de *HIF-1α*

Para verificar se a ação do T_3 sobre a expressão de *HIF-1α* é dependente de ER usamos o ICI 182,780, um inibidor de ER, em todos os tempos de tratamento da linhagem de células tumorais mamárias. Podemos observar na figura 5 a) 10' b) 30' c) 1h e d) 4h, quando comparamos o grupo C em relação ao grupo ICI não foi observada diferença estatística na expressão do gene *HIF-1α* em todos os tempos estudados. Em relação ao bloqueio do ER no grupo T_3 +ICI ocorreu uma diminuição na expressão gênica de *HIF-1α* quando comparado a ação do T_3 .

Figura 5.

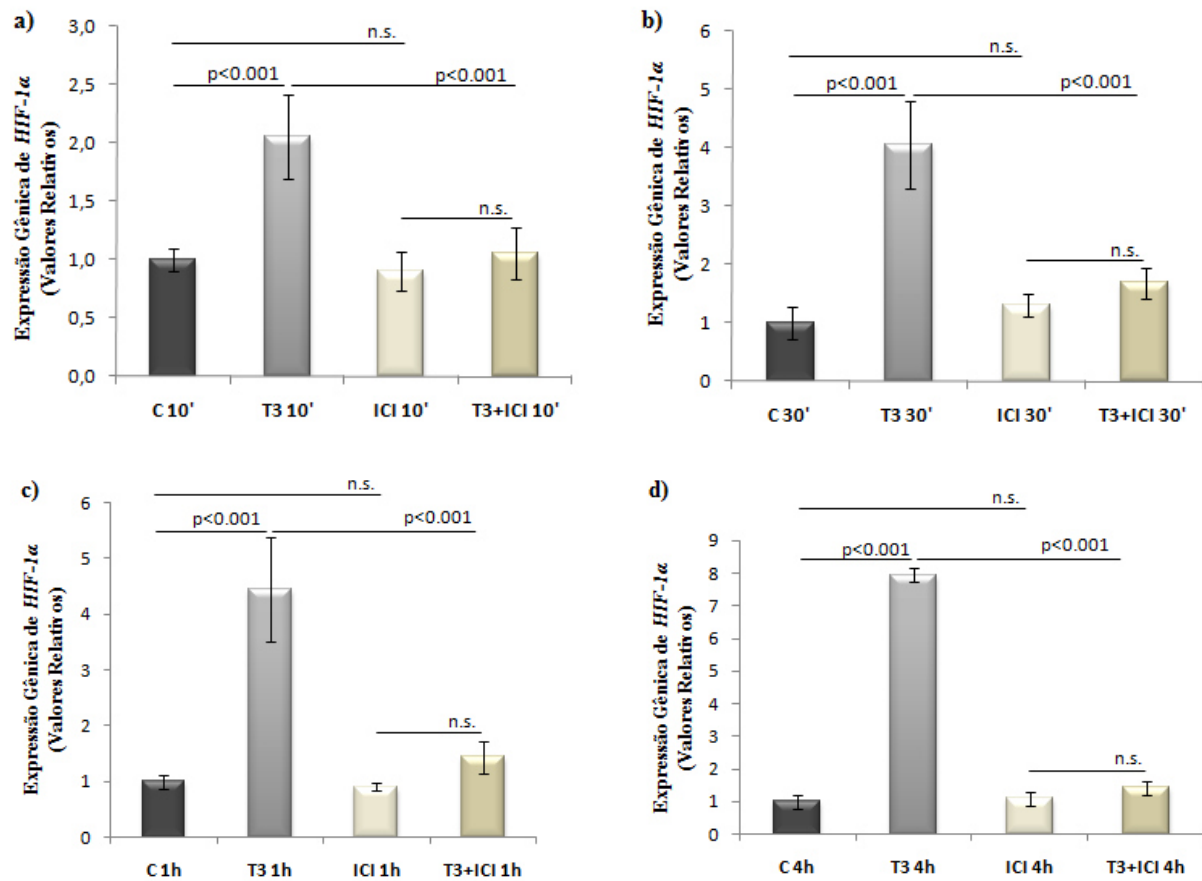


Figura 5. Efeito do T_3 associado ao Fulvestrant (ICI) sobre a expressão gênica de *HIF-1α* em células MCF-7. C, Controle. T_3 , Triiodotironina; ICI, Fulvestrant; T_3 +ICI, Triiodotironina associada ao Fulvestrant. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (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.

5.1.3 Efeito da inibição da síntese de RNA com Actinomicina D (ACTD) sobre os efeitos do T_3 na expressão de *HIF-1α*

Para determinar se a ação do T_3 sobre a expressão de *HIF-1α* é dependente da expressão gênica usamos o ACTD, um inibidor da síntese de mRNA, em todos os tempos de tratamento da linhagem de células tumorais mamárias. Quando comparamos o grupo C em

relação ao grupo ACTD não foi observada diferença estatística na expressão do gene *HIF-1α* em todos os tempos estudados. Foi observado que os níveis de *HIF-1α* estão aumentados no grupo T₃+ACTD, quando comparado ao grupo ACTD no tempo de 10', nos demais tempos não houve diferença estatística, como mostra a figura 6. Quando comparamos o grupo T₃ com o grupo T₃+ACTD observamos uma diminuição mRNA de *HIF-1α* que foi causada pelo bloqueio da transcrição por ACTD em associação ao hormônio em todos os tempos estudados, mostrando necessidade da transcrição gênica para que ocorra ação do T₃.

Figura 6.

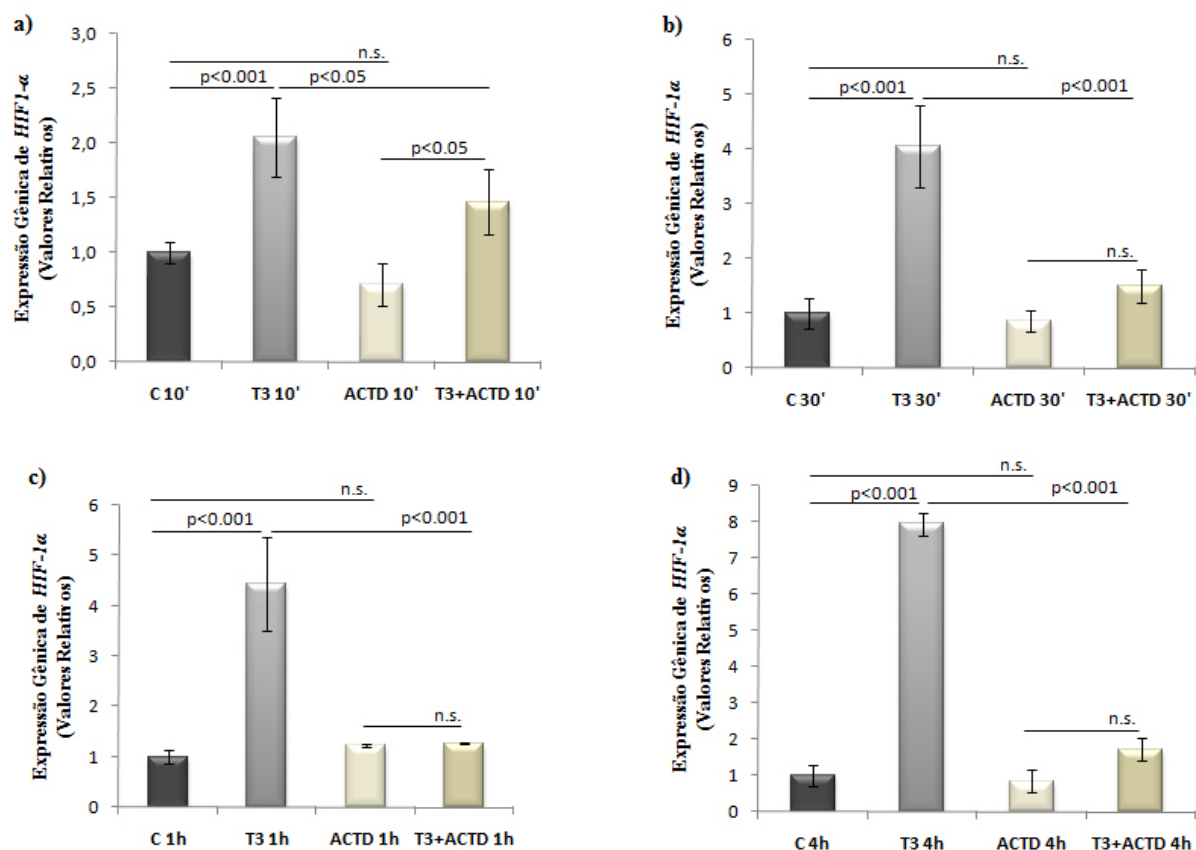
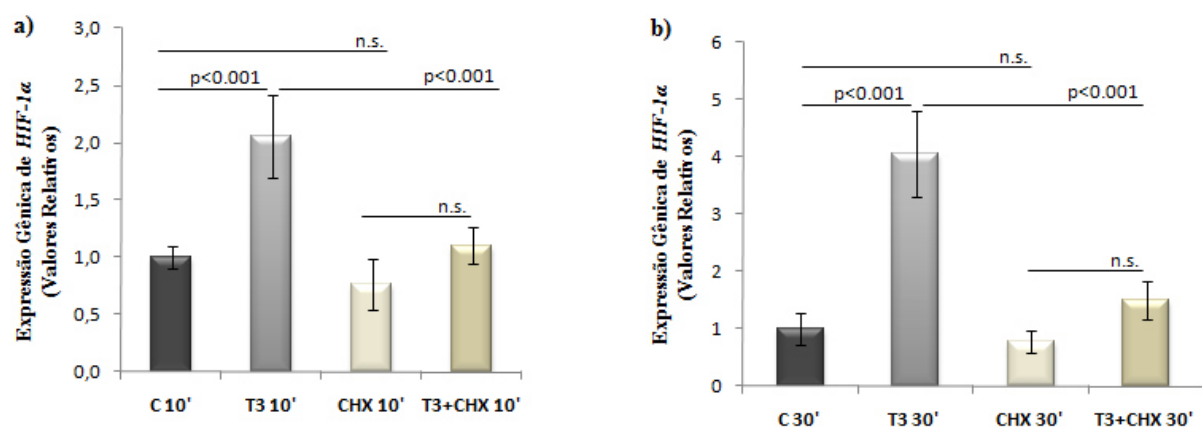


Figura 6. Efeito do T₃ associado a Actinomicina D (ACTD) sobre a expressão gênica de *HIF-1α* em células MCF-7. C, Controle; T₃, Triiodotironina; ACTD, Actinomicina D; T₃+ACTD, Triiodotironina associada à Actinomicina D. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 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 T₃ sobre a expressão gênica de *HIF-1α*

Para determinar a necessidade da síntese de proteínas para a regulação pelo T₃ dos níveis de mRNA de *HIF-1α* a linhagem de células tumorais mamárias foi incubada na presença ou ausência de T₃, com ou sem CHX nos tempos 10', 30', 1h e 4h. Quando comparados o grupo C em relação ao grupo CHX não foi observada diferença estatística na expressão do gene *HIF-1α* em todos os tempos estudados, o mesmo ocorreu com a comparação entre o grupo CHX em relação a T₃+CHX, não apresentando diferença nos níveis de expressão gênica de *HIF-1α*. A figura 7 mostra o efeito da associação da CHX ao T₃ (grupo T₃+CHX) quando comparado ao grupo T₃. Observou-se que a CHX diminui a ação do T₃, levando a diminuição dos níveis de *HIF-1α* no tratamento T₃+CHX, quando comparado com o aumento acarretado pela incubação apenas com T₃.

Figura 7.



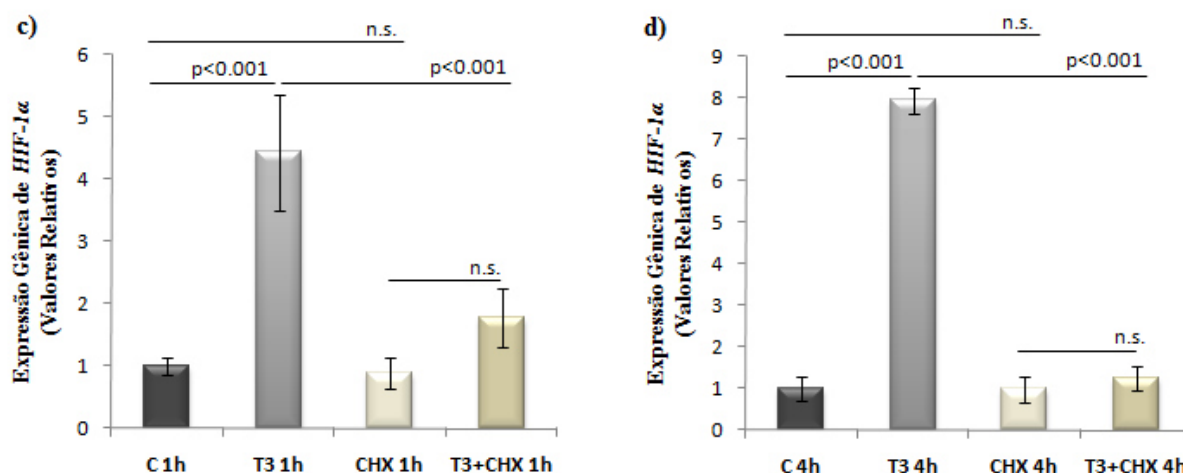


Figura 7. Efeito do T₃ associado a Ciclohexamida (CHX) sobre a expressão gênica de *HIF-1α* em células MCF-7. C, Controle; T₃, Triiodotironina; CHX, Ciclohexamida; T₃+CHX, Triiodotironina associada à Ciclohexamida. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) 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.

5.1.5 Efeito da inibição da via PI3K com LY294002 (LY) na ação do T₃ sobre a expressão gênica de *HIF-1α*

Para determinar a necessidade da ativação da via PI3K para a regulação pelo T₃ dos níveis de expressão gênica de *HIF-1α*, as células tumorais mamárias, MCF-7, foram incubadas na presença ou ausência de T₃ 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 *HIF-1α* em todos os tempos estudados, o mesmo ocorreu quando comparamos os níveis de *HIF-1α* do grupo T₃+LY, quando comparado ao LY, em todos os tempos. Como mostra a figura 8, ocorreu uma diminuição na expressão gênica de *HIF-1α* em todos os tempos estudados.

Figura 8.

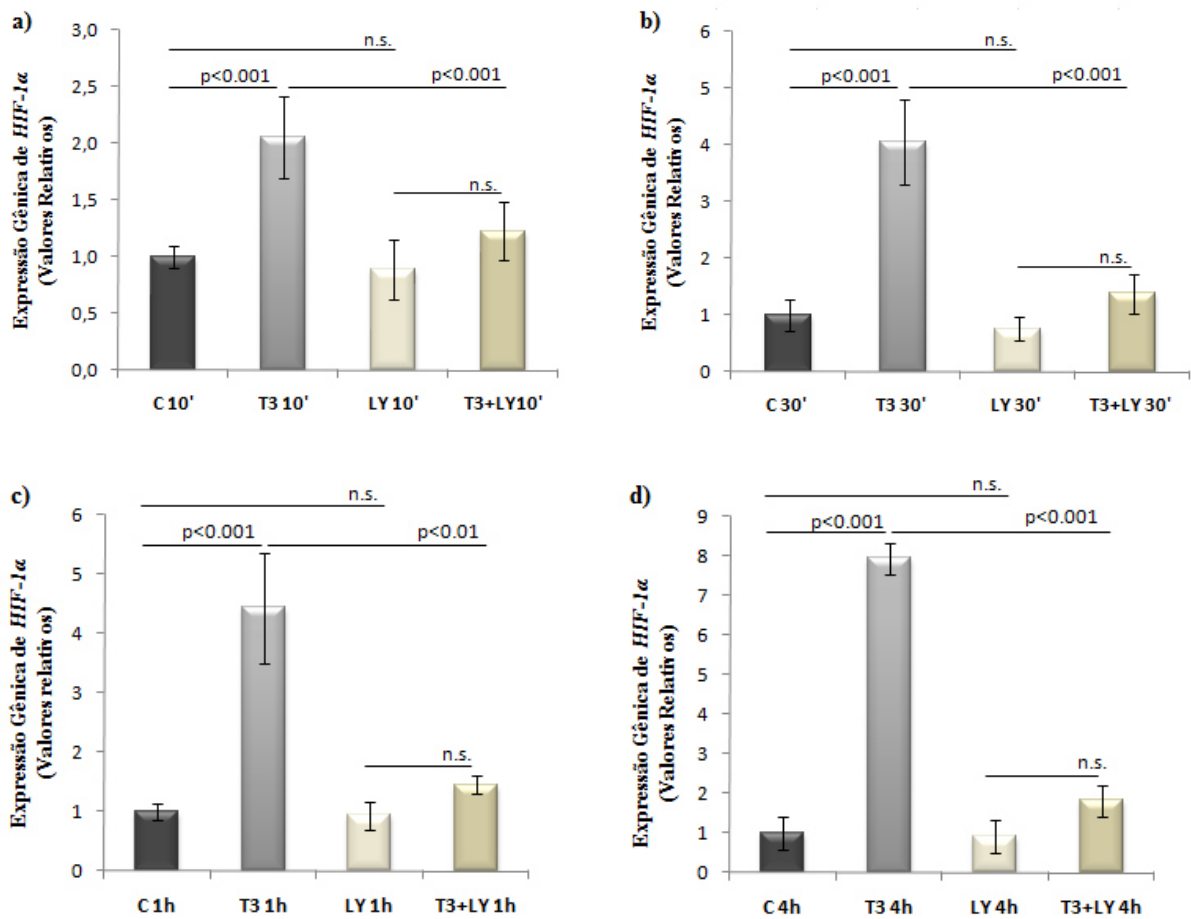


Figura 8. Efeito do T₃ associado à LY294002 (LY) sobre a expressão gênica de *HIF-1α* em células MCF-7. C, Controle; T₃, Triiodotironina; LY, inibidor da via PI3K; T₃+LY, Triiodotironina associada à LY294002. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) e 4 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.

5.2 Expressão gênica *TGFα*

5.2.1 T₃ eleva os níveis de expressão de *TGFα*

A figura 9 mostra a expressão gênica de *TGFα* em células MCF-7 que foram tratadas com T₃ 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 $TGF\alpha$ em todos os tempos de tratamento em células tumorais mamárias.

Figura 9.

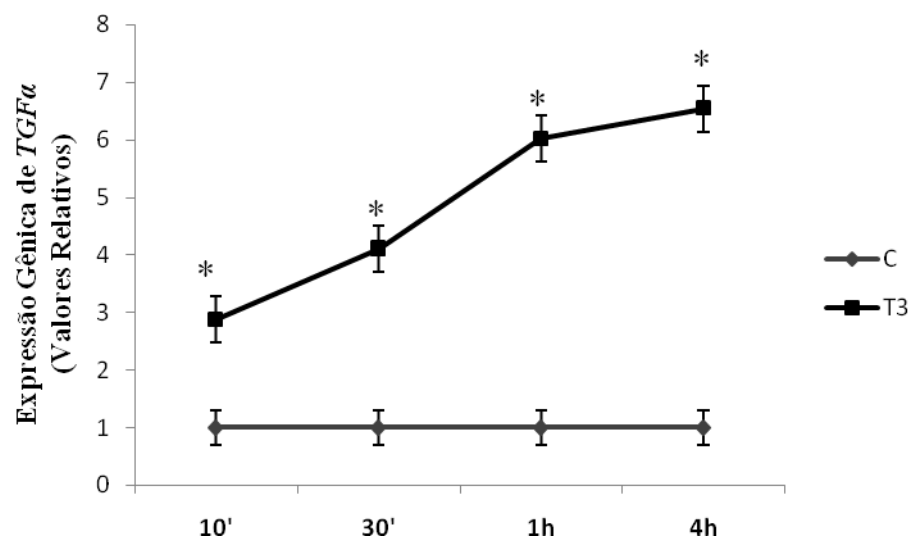


Figura 9. Efeitos do T_3 sobre a expressão gênica de $TGF\alpha$ em células MCF-7. C, Controle. T_3 , Triiodotironina. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos, 30 minutos, 1 hora e 4 horas. Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada ANOVA complementada com teste de Tukey. * $p < 0,001$.

5.2.2 Efeito do T_3 associado ao inibidor Fulvestrant (ICI 182,780) sobre a expressão gênica de $TGF\alpha$

Para verificar se a ação do T_3 sobre a expressão de $TGF\alpha$ é dependente de ER usamos o ICI 182,780, um inibidor de ER, em todos os tempos de tratamento na linhagem de células tumorais mamárias. Quando comparamos o grupo C em relação ao grupo ICI não foi observada diferença estatística na expressão do gene $TGF\alpha$ em todos os tempos estudados.

Foi observado que nos níveis de *TGFα* não houve diferença estatística no grupo T₃+ICI, quando comparado ao grupo ICI, no tempo de 10', no entanto nos demais tempos os níveis de *TGFα* estão aumentados como demonstrado pela diferença estatística, figura 10 a) 10'. Essa diminuição de mRNA de *TGFα* foi causada pelo bloqueio da transcrição por ICI, demonstrando que quando comparamos o grupo T₃+ICI em relação ao grupo T₃ mostra que o T₃ tem a necessidade da transcrição gênica para que ocorra aumento do mRNA de *TGFα*.

Figura 10.

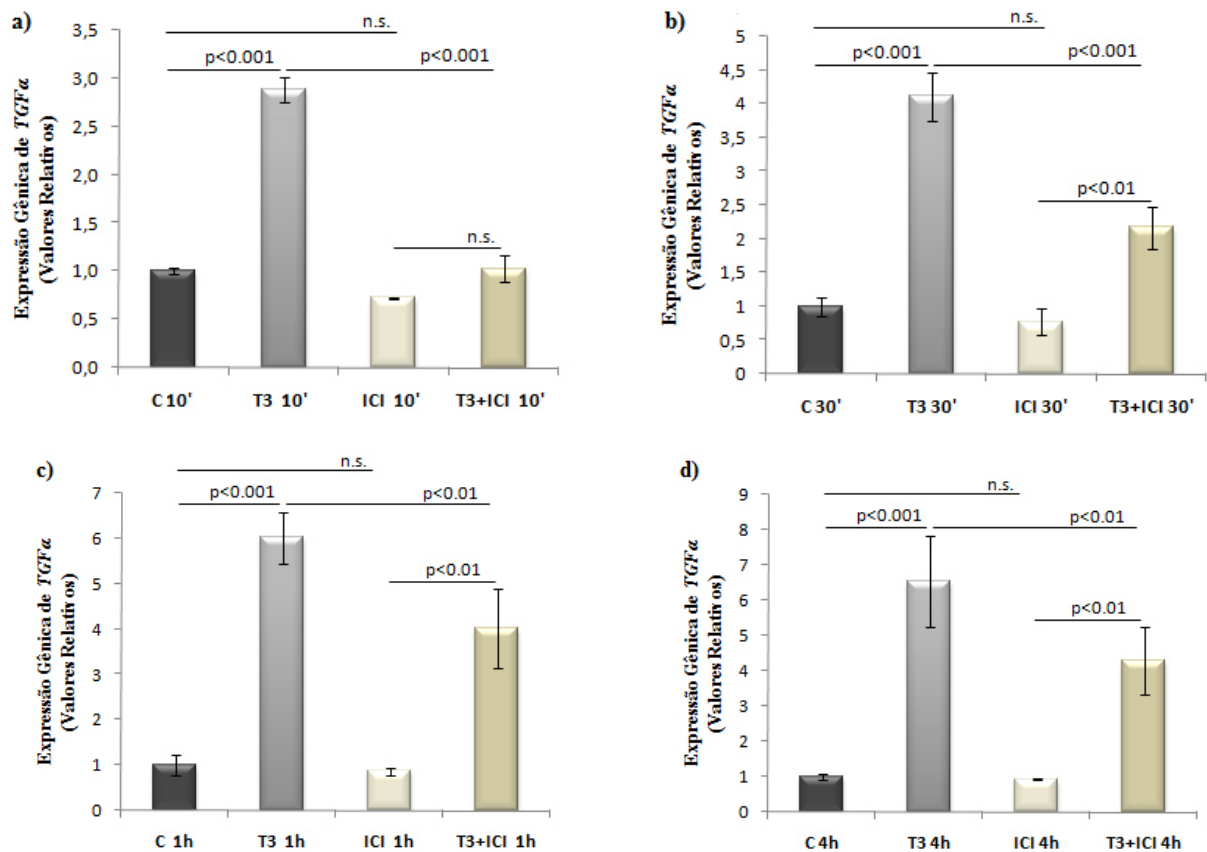
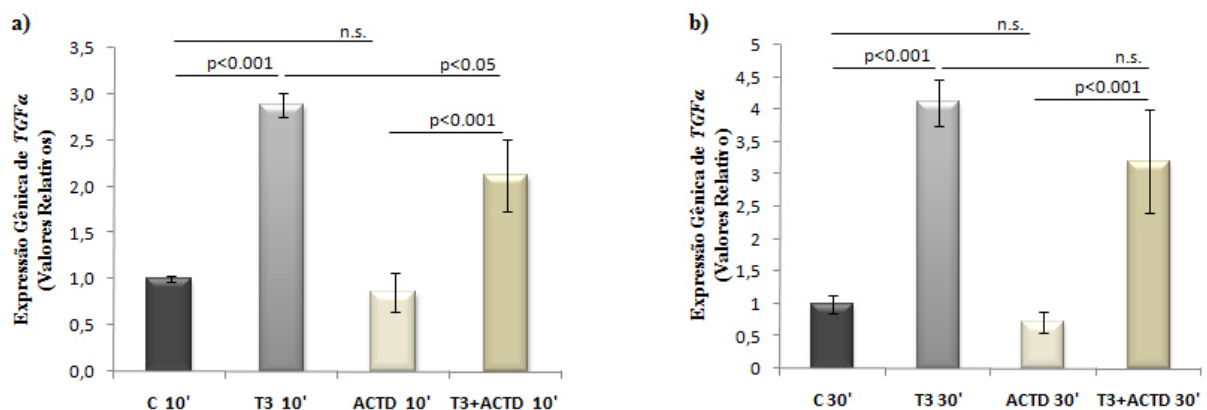


Figura 10. Efeito do T₃ associado ao Fulvestrant (ICI) sobre a expressão gênica de *TGFα* em células MCF-7. C, Controle. T₃, Triiodotironina; ICI, Fulvestrant; T₃+ICI, Triiodotironina associada ao Fulvestrant. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) e 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.

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

Para determinar se a ação do T₃ sobre a expressão de *TGFα* é dependente da expressão gênica usamos o ACTD, um inibidor da síntese de mRNA, em todos os tempos de tratamento da linhagem de células tumorais mamárias. Quando comparamos o grupo C em relação ao grupo ACTD não foi observada diferença estatística na expressão do gene *TGFα* em todos os tempos estudados. Foi observado que os níveis de *TGFα* estão aumentados no grupo T₃+ACTD, quando comparado ao grupo ACTD, em todos os tempos, como mostra a figura 11. Para comparação do grupo T₃ com o grupo T₃+ACTD, podemos observar na figura 11 a) 10', ocorreu uma diminuição da expressão de *TGFα* quando associamos o inibidor ao hormônio. Porém, o contrário é observado a partir de 30', como mostra na figura 11b, 11c e 11d, onde não houve diferença estatística nos níveis de *TGFα* para essa comparação.

Figura 11.



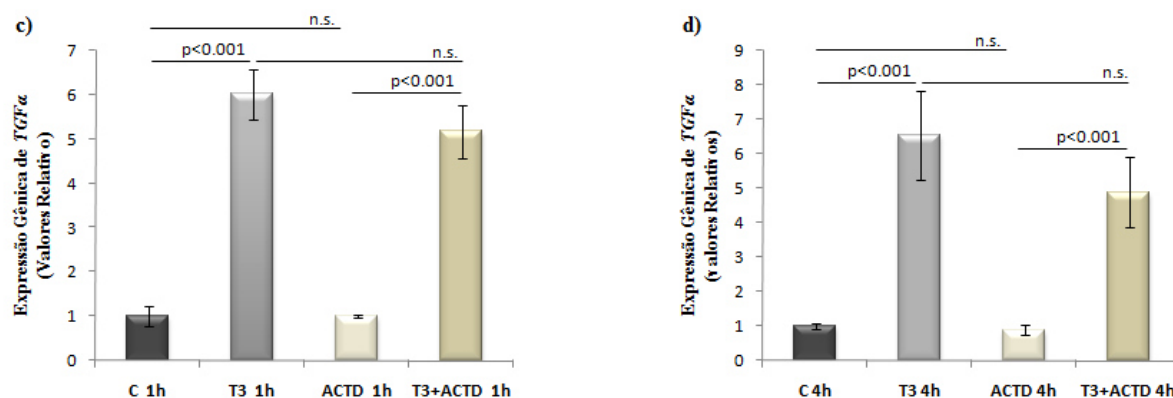


Figura 11. Efeito do T₃ associado a Actinomicina D (ACTD) sobre a expressão gênica de *TGFα* em células MCF-7. C, Controle; T₃, Triiodotironina; ACTD, Actinomicina D; T₃+ACTD, Triiodotironina associada à Actinomicina D. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (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.

5.2.4 Efeito da inibição da síntese proteica com Ciclohexamida (CHX) na ação do T₃ sobre a expressão gênica de *TGFα*

Para determinar a necessidade da síntese de proteínas para a regulação pelo T₃ dos níveis de mRNA de *TGFα* a linhagem de células tumorais mamárias foi incubada na presença ou ausência de T₃, 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 *TGFα* em todos os tempos estudados, o mesmo ocorreu com a comparação entre o grupo CHX em relação a T₃+CHX, não apresentando diferença nos níveis de expressão gênica de *TGFα* nos tempos de 10' e 30', pois nos tempos de 1h e 4h para essa comparação os níveis de expressão gênica de *TGFα* foram aumentados. A figura 12 mostra o grupo T₃+CHX quando comparado ao grupo T₃, observou-se que a CHX diminui a ação do T₃, acarretando a diminuição dos níveis de *TGFα* em T₃+CHX, quando comparado com o aumento acarretado pela incubação apenas com T₃.

Figura 12.

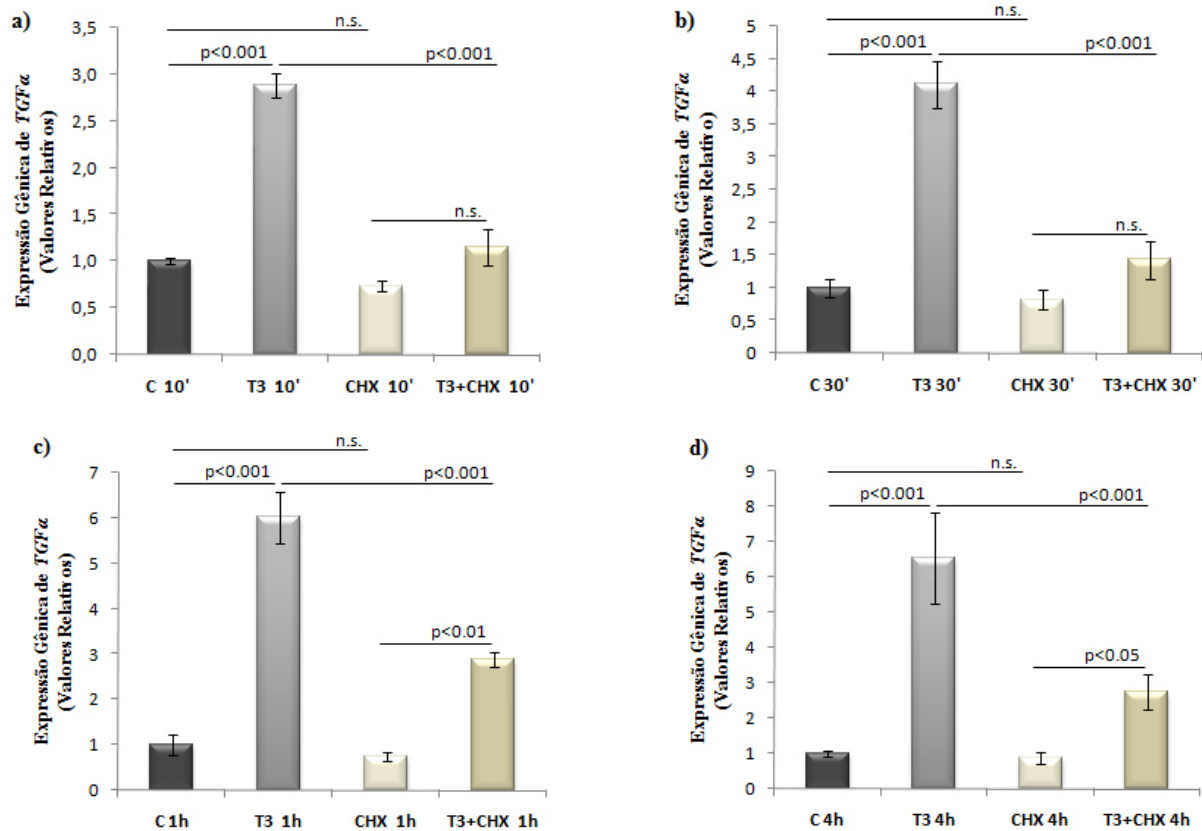


Figura 12. Efeito do T₃ associado a Ciclohexamida (CHX) sobre a expressão gênica de *TGFα* em células MCF-7. C, Controle; T₃, Triiodotironina; CHX, Ciclohexamida; T₃+CHX, Triiodotironina associada à Ciclohexamida. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) 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 *TGFα*.

Para determinar a necessidade da ativação da via PI3K para a regulação pelo T₃ dos níveis de expressão gênica de *TGFα*, as células tumorais mamárias, MCF-7, foram incubadas na presença ou ausência de T₃ 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 *TGF α* em todos os tempos estudados, o mesmo ocorreu quando observado o grupo T₃+LY, quando comparado ao grupo LY. Como mostra a figura 13, ocorreu uma diminuição na expressão gênica de *TGF α* no grupo T₃+LY, quando comparado ao T₃.

Figura 13.

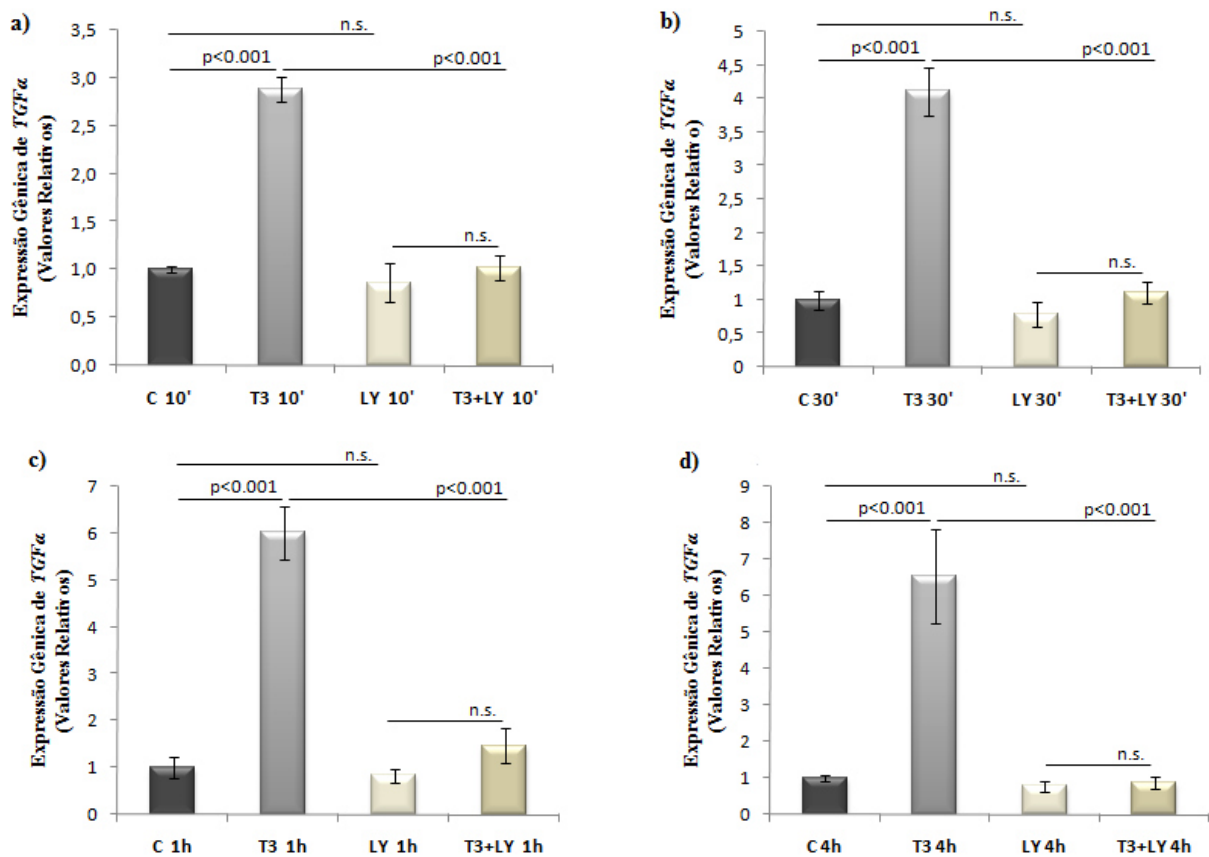


Figura 13. Efeito do T₃ associado à LY294002 (LY) sobre a expressão gênica de *TGF α* em células MCF-7. C, Controle; T₃, Triiodotironina; LY, inibidor da via PI3K; T₃+LY, Triiodotironina associada à LY294002. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) e 4 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

A hipóxia celular e estresse metabólico têm sido observados em muitos tipos de câncer. *HIF-1 α* é considerado um regulador central de homeostase de oxigênio. Estudos anteriores indicaram que *HIF-1 α* é superexpresso em muitos tipos de câncer principalmente o CM, ao passo que as proteínas *HIF* medeiam adaptação a hipóxia celular^(90,91,52). Altos níveis de expressão de *HIF-1 α* no CM humano estão relacionados à carcinogênese mamária e modificações moleculares decorrentes do processo de vascularização tumoral. Além do *HIF-1 α* , o *TGF α* também é secretado por muitos tumores e possui propriedades angiogênicas⁽⁶⁴⁾. A ação desse fator e a interação entre as células epiteliais neoplásicas e as células do estroma têm sido extremamente reconhecidas nos últimos anos^(64,92,93). Os fatores *EGF* e *TGF α* ligam-se a um mesmo receptor (receptor do fator de crescimento epitelial) e são potentes indutores de mitoses durante o desenvolvimento da mama⁽⁹⁴⁾.

Os HT desempenham um papel importante na homeostase e é o principal regulador da atividade mitocondrial. Um estudo realizado por Wrutniak-Cabello et al.⁽⁶⁹⁾, indicou que T₃ também pode influenciar atividades físicas mitocondriais por ativação de vias citoplásmicas⁽⁶⁹⁾. O aumento da expressão de *HIF-1* induzida por T₃ foi observada em linhagens celulares de hepatoma e fibroblastos primários. No entanto, o mecanismo de ação permanece não esclarecido^(95,77). A identificação de uma sinalização explicando a relação entre ação do T₃ na expressão de *HIF-1 α* e células de câncer é necessária.

Estudos descrevem a dependência do efeito proliferativo que os HT⁽²⁶⁾ em células de CM com o ER positivo, demonstrando a capacidade do T₃ em aumentar a proliferação dessas células na presença desse receptor, induzindo a expressão de genes normalmente estimulados por E₂ tais como receptor de progesterona (*PgR*), *TGF α* e *TGF β -1*^(84,96).

Estudos anteriores indicaram que as funções celulares de T_3 promovem a expressão de genes por meio da ligação ao seu receptor nuclear⁽⁹⁷⁾. Por outro lado, estudos recentes sugeriram que as vias de cascatas citosólicas também são responsáveis pela ação do T_3 ^(77,98).

O presente estudo confirma a ação do T_3 sobre células de câncer de mama (MCF-7), demonstrando um aumento da expressão gênica de *HIF-1 α* e *TGF α* pelo T_3 , em diferentes tempos de tratamento (Fig.3 e Fig.8). Esses resultados vêm de acordo com estudos que demonstram o aumento da expressão gênica de diferentes genes tais como, amphiregulin (*AREG*) em células de adenocarcinoma mamário MCF-7⁽⁷⁸⁾, leptina em células de adipócitos 3T3-L1⁽⁹⁹⁾ e *HIF-1 α* em células de fibroblastos humanos⁽⁷⁷⁾, quando tratados com T_3 . Assim, constatamos que o T_3 também age sobre a transcrição de *HIF-1 α* e *TGF α* em curtos e longos períodos de tempo.

Como podemos observar nos resultados apresentados, quando comparamos o grupo C em relação a todos os inibidores não houve diferença estatística na expressão dos genes *HIF-1 α* e *TGF α* , mostrando que os inibidores foram aos níveis do controle em células tumorais mamárias em todos os tempos estudados.

O T_3 mimetiza os efeitos do E_2 na linhagem de câncer de mama de células MCF-7 que possuem o ER positivo⁽⁶⁵⁾. Com intuito de avaliar se o T_3 modula a expressão de *HIF-1 α* e *TGF α* 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⁽¹⁰⁰⁾.

Poucos trabalhos na literatura tratam do mecanismo de ação dos hormônios tireoidianos em células de carcinoma mamário, mas alguns grupos já demonstraram que os hormônios tireoidianos são capazes de levar à fosforilação de ER α com consequente indução da via MAPK, podendo destacar o efeito inibitório do ICI sobre a captação de timidina estimulada pelo hormônio tireoidiano em células de câncer de mama MCF-7⁽²⁶⁾.

O bloqueio do ER com ICI 182,780 no presente estudo alterou a ação do T₃ sobre os genes *HIF-1 α* e *TGF α* nas células MCF-7. Com o bloqueio do ER e posterior adição de T₃ (T₃+ICI), observa-se diminuição na expressão de *HIF-1 α* e *TGF α* , caracterizando a necessidade desse receptor para ação do T₃. Estudo realizado por Marchiori et al.⁽¹⁰¹⁾ mostrou que células MCF-7 expostas ao 17 β -E₂ apresentaram um aumento de 2,0 vezes ou mais na expressão do *PHLDA1* (domínio homólogo à pleckstrina, família A, membro 1) sendo que o tratamento destas células com ICI inibe completamente este efeito⁽¹⁰¹⁾. Isso demonstra a necessidade do ER para ação do E₂ sobre o gene *PHLDA1*, o que vem de encontro com o nosso trabalho visto que na presença do T₃ os genes *HIF-1 α* e *TGF α* estão aumentados, porém na inibição do ER esse aumento é diminuído demonstrando, não exclusivamente, a ação do T₃ por meio de ER, podendo esse mimetizar ações do E₂.

Nosso próximo passo foi verificar a ação do T₃ na manutenção do mRNA de *HIF-1 α* e *TGF α* utilizando o Actinomicina D (ACTD). ACTD é um inibidor de transcrição geral com atividade anticancerígena, e está aprovado para o tratamento de sarcomas de Wilms, células germinativas e tumor trofoblástico^(102,103). Os dados apresentados na figura 5a, em 10', o bloqueio da transcrição de *TGF α* encontra-se diminuída quando associado o hormônio ao inibidor. A partir de 30' não houve diferença demonstrando uma estabilidade do mRNA. Este fato provavelmente se deve a algum mecanismo da célula que preveniu a degradação protéica na presença do inibidor. Nosso resultado vem de acordo com o estudo de Volpato et al.⁽¹⁰⁴⁾ que investigou se o aumento no conteúdo de *GLUT4*, observado nas células 3T3-L1 30' após

a administração do T₃, se mantinha mesmo na presença de ACTD. Observou-se que o ACTD não preveniu a ação do T₃⁽¹⁰⁴⁾.

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⁽⁷⁴⁾. 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 T₃ 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 T₃, 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 T₃⁽⁷⁷⁾.

Com intuito de verificar se a ação de T₃ foi direta ou indireta sobre a modulação dos genes *HIF-1α* e *TGFα*, foi utilizado um inibidor da síntese de proteínas, CHX. Observou-se que o CHX diminui a ação do T₃, levando a diminuição dos níveis de *HIF-1α* e *TGFα*, elevados pelo T₃, em todos os tempos de tratamento em células MCF-7 (Fig.6 e Fig.11) respectivamente, indicando que os efeitos do T₃ sobre estes genes necessitam da síntese de proteína prévia e que o T₃ age por ação indireta. Estudos realizados por Moeller et al.⁽⁷⁷⁾, com fibroblastos humanos, demonstram que a ação do T₃ sobre *HIF-1α* é 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-1α*, porém os genes *GLUT1*, *PFKP* e *MCT4* tiveram sua expressão diminuída na presença de CHX, caracterizando que o gene precursor para modular esses genes indiretamente pelo T₃ é o *HIF-1α*, na linhagem celular estudada por eles⁽⁷⁷⁾.

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^(105,106), além de ter um papel na diferenciação de várias linhagens de celulares^(107,108). O conceito sobre a ação do HT foi diversificado, incluindo ações extra-nucleares de T₃ e T₄. O T₃ apresenta-se como um ativador da via PI3K, que conduz a um aumento de certos genes, tal como o *HIF-1α* e o inibidor de calcineurina (*ZAKI-4α*)^(74,77).

Trabalhos utilizando linhagens celulares destacam uma alteração de expressão gênica após o tratamento com T₃, dependente da via PI3K^(74-77,99). Dentre os genes estimulados pelo tratamento com T₃, por meio da via PI3K, podemos destacar alguns genes relacionados com o metabolismo energético como *HIF-1α*, *GLUT1*, *PFKP* e *MCT4* e recentemente estudos de nosso grupo mostraram que a leptina é modulada pelo T₃ por meio da via PI3K em adipócitos 3T3-L1⁽⁹⁹⁾. 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, para determinar a necessidade da ativação da via PI3K para a regulação pelo T₃ dos níveis de expressão gênica de *HIF-1α* e *TGFα* e observamos os níveis da expressão gênica de ambos os genes. Como demonstrado em nossos resultados, os níveis da expressão gênica que foram aumentados pelo T₃, são suprimidos pela presença de LY294002 (Fig.7 e Fig.12) em ambos os genes 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 dos genes *HIF-1α* e *TGFα* é mediado pela via PI3K, ativada pelo T₃. Moeller et al.⁽⁷⁷⁾ demonstraram em seus estudos a ativação da via PI3K para modulação do gene *HIF-1α* pelo T₃ em fibroblastos humanos, possivelmente independente da linhagem celular a via PI3K é ativada pelo T₃ para modulação desse gene.

Cao et al.⁽⁹⁸⁾ descreveram que o T₃ interage com a subunidade p85α da PI3K por meio de sua ligação ao TRβ no citosol. Essa ligação leva a ativação da PI3K e consequente ativação de uma cascata de sinalização compreendendo fosforilação sequencial da proteína quinase b (Akt), proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e seu substrato, a proteína ribossomal 70 quinase S6 (p70^{S6K}). Essa sinalização ocorre muito rapidamente, com a fosforilação de mTOR ocorrendo em até 10' após o tratamento com T₃⁽¹⁰⁹⁾. 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⁽¹¹⁰⁻¹¹²⁾.

Estudos que demonstrem o mecanismo pelo qual os HT podem alterar a expressão gênica de determinados genes ligados a proliferação do CM ou de outros tipos de câncer oferecerão possibilidades terapêuticas que facilitem o tratamento dessa doença.

7. CONCLUSÃO

Nosso trabalho confirma que o hormônio T₃ age na ativação da via extra-nuclear para a expressão dos genes *HIF-1α* e *TGFα* em linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF-7, especificamente por meio da via PI3K.

Os dados obtidos apresentam grande potencial de aplicação, já que a identificação de novas vias de sinalização e outros mecanismos pelos quais os HT atuam poderão levar ao desenvolvimento de drogas, que poderão ativar/bloquear tais vias para promoção de efeitos desejáveis/bloqueio de efeitos indesejáveis.

8. REFERÊNCIAS

1. Porter P. "Westernizing" women's risks? Breast cancer in lower-income countries. *N Engl J Med*. 2008;358:213-6.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127:2893-917.
3. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. 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*. 2010;28:81-90.
5. Lewis-Wambi JS, Jordan VC. Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit? *Breast Cancer*. 2009;11:206.
6. Mazumdar A, Wang RA, Mishra SK, Adam L, Bagheri-Yarmand R, Mandal M. Transcriptional repression of oestrogen receptor by metastasis-associated protein 1 corepressor. *Nat Cell Biol*. 2001;3:30-7.
7. Mishra SK, Yang Z, Mazumdar A, Talukder AH, Larose L, Kumar R. Metastatic tumor antigen 1 short form (MTA1s) associates with casein kinase I-gamma2, an estrogen-responsive kinase. *Oncogene*. 2004;23:4422-9.
8. Silva JM, Dominguez G, Gonzalez-Sancho JM, Garcia JM, Silva J, Garcia-Andrade C. Expression of thyroid hormone receptor/erbA genes is altered in human breast cancer. *Oncogene*. 2002;21:4307-16.
9. Vorherr H. Thyroid function in benign and malignant breast disease. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1987;23:255-7.
10. Thomas BS, Bulbrook RD, Russell MJ, Hayward JL, Millis R. Thyroid function in early breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1983;19:1213-9.
11. Rose DP, Davis TE. Plasma thyroid-stimulating hormone and thyroxine concentrations in breast cancer. *Cancer*. 1978;41:666-9.
12. Takatani O, Okumoto T, Kosano H, Nishida M, Hiraide H, Tamakuma S. Relationship between the levels of serum thyroid hormones or estrogen status and the risk of breast cancer genesis in Japanese women. *Cancer Res*. 1989;49:3109-12.
13. Cristofanilli M, Yamamura Y, Kau SW, Bevers T, Strom S, Patangan M, et al. Thyroid hormone and breast carcinoma. Primary hypothyroidism is associated with a reduced incidence of primary breast carcinoma. *Cancer*. 2005;103:1122-8.

14. Saraiva PP, Figueiredo NB, Padovani CR, Bertani MM, Nogueira CR. Profile of thyroid hormones in breast cancer patients. *Braz J Med Biol.* 2005;38:761-5.
15. Vonderhaar BK, Greco AE. Lobulo-alveolar development of mouse mammary glands is regulated by thyroid hormones. *Endocrinology.* 1979;104:409-18.
16. Lopez-Barahona M, Fialka I, Gonzalez-Sancho JM, Asuncion M, Gonzalez M, Iglesias T, et al. Thyroid hormone regulates stromelysin expression, protease secretion and the morphogenetic potential of normal polarized mammary epithelial cells. *EMBO J.* 1995; 14:1145-55.
17. Gonzalez-Sancho JM, Figueroa A, Lopez-Barahona M, Lopez E, Beug H, Muñoz A. Inhibition of proliferation and expression of T1 and cyclin D1 genes by thyroid hormone in mammary epithelial cells. *Mol Carcinog.* 2002;34:25-34.
18. Yokoe T, Iino Y, Takei H, Horiguchi J, Koibuchi Y, Maemura M, et al. Relationship between thyroid-pituitary function and response to therapy in patients with recurrent breast cancer. *Anticancer.* 1996;16:2069-72.
19. Yokoe T, Iino Y, Takei H, Horiguchi J, Koibuchi Y, Maemura M, et al. Changes of cytokines and thyroid function in patients with recurrent breast cancer. *Anticancer.* 1997;17:695-99.
20. Goldman MB. Thyroid diseases and breast cancer. *Epidemiol Rev.* 1990;12:16-28.
21. Smyth PP, Smith DF, McDermott EW, Murray MJ, Geraghty JG, O'Higgins NJ. A direct relationship between thyroid enlargement and breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:937-41.
22. Turken O, Narin Y, Demirbas S, Onde ME, Sayan O, Kandemir EG, et al. Breast cancer in association with thyroid disorders. *Breast Cancer.* 2003;5:110-3.
23. Malik R, Mellor N, Selden C, Hodgson H. Triiodothyronine enhances the regenerative capacity of the liver following partial hepatectomy. *Hepatology.* 2003;37:79-86.
24. Francavilla A, Carr BI, Azzarone A, Polimeno L, Wang Z, Van Thiel DH, et al. Hepatocyte proliferation and gene expression induced by triiodothyronine in vivo and in vitro. *Hepatology.* 1994;20:1237-41.
25. Di Fulvio M, Coleoni AH, Pellizas CG, Masini-Repiso AM. Tri-iodothyronine induces proliferation in cultured bovine thyroid cells: evidence for the involvement of epidermal growth factor-associated tyrosine kinase activity. *J Endocrinol.* 2000;166:173-82.

26. Tang HY, Lin HY, Zhang S, Davis FB, Davis PJ. Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor. *Endocrinology*. 2004;145:3265-72.
27. Lin HY, Tang HY, Shih A, Keating T, Cao G, Davis PJ, et al. Thyroid hormone is a MAPK-dependent growth factor for thyroid cancer cells and is anti-apoptotic. *Steroids*. 2007;72:180-7.
28. Conde SJ, Luvizotto RAM, SÍbio MT, Nogueira CR. Thyroid Hormone Status Interferes with Estrogen Target Gene Expression in Breast Cancer Samples in Menopausal Women. *ISRN Endocrinology*. 2014;317398. doi: 10.1155/2014/317398.
29. Conde SJ, Luvizotto RAM, Sibio MT, Nogueira CR. Thyroid hormone profile in breast cancer patients in postmenopause. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2012;56:238-43.
30. Linehan WM, Walther MM, Zbar B. The genetic basis of cancer the kidney. *J Urol*. 2003;170:2163-72
31. Knebelmann B, Ananth S, Cohen HT, Sukhatme VP. Transforming growth factor alpha is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res*. 1998;58:226-31.
32. Gunaratnam L, Morley M, Franovic A, de Paulsen N, Mekhail K, Parolin DA, et al. Hypoxia inducible factor activates the transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor receptor growth stimulatory pathway in VHL(-/-) renal cell carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2003;278:44966-74.
33. Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol*. 2001;18:243-59
34. Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, et al. The hypoxia inducible factor-1 alpha is negative factor for tumor therapy. *Oncogene*. 2003;22:3213-20.
35. 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.
36. Agani FH, Pichiule P, Chavez JC, Lamanna JC. The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia. *J Biol Chem*. 2000;275:35863-67.
37. Chun Y, Kim M, Park J. Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1alpha. *J Korean Med Sci*. 2002;17:581-8.
38. Davies R, Moyes CD, Wang YS. Intra- and Inter-specific variation in metabolic gene

- expression in relationship to environmental hypoxia. *Comp Biochem Physiol.* 2011;159:25-31.
39. Lee J, Bae S, Jeong J, Kim S, Kim K. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med.* 2004;36:1-12.
 40. Lundgren K, Holm C, Landberg G. Hypoxia and breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64:3233-47.
 41. Soitamo AJ, R  bergh CMI, Gassmanni M, Sistonen L, Nikinmaa M. Characterization of a Hypoxia-inducible Factor (HIF-1 α) from rainbow trout. *J Biol Chem.* 2001;276:19699-705.
 42. Sendoel A, Kohler I, Fellmann C, Lowe SW, Hengartner M. HIF-1 antagonizes p53-mediated apoptosis through a secreted neural tyrosinase. *Nature.* 2010;465:577-85.
 43. Iyer NV, Leung SW, Semenza GL. The human hypoxia inducible factor 1 alpha gene: HIF1A structure and evolutionary conservation. *Genomics.* 1998;52:159-65.
 44. Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylates hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem.* 1999;274:32631-7.
 45. Feng W, Ye F, Xue W, Zhou Z, Kang YJ. Copper regulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 activity. *Mol Pharmacol.* 2009;75:174-82.
 46. Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, et al. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF-1 α in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.* 1999;18:1905-14.
 47. Ke Q, Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol.* 2006;70:1469-80.
 48. Rissanen E, Tranberg HK, Sollid J, Nilsson GE. Temperature regulates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in a poikilothermic vertebrate, crucian carp (*Carassius carassius*). *J Exp Biol.* 2006;209:994-1003.
 49. Fátima LA, Papa PC. Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF): Regula  o transcrricional e p  s-transcrricional. *Rev Biol.* 2010;4:22-7.
 50. Ferrara N, Gerber H, Lecouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9:669-76.
 51. Semenza, GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev C  ncer.* 2003;3:721-32.
 52. Zhong H, DeMarzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of Hypoxia-inducible Factor 1 in common human cancers and their

metastases. *Cancer Res.* 1999;59:5830-35.

53. Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, Van Meir EG. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol.* 2005;7:134-53.
54. Semenza G. HIF-1: Using two hands to flip the angiogenic switch. *Cancer Metastasis Rev.* 2000;19:59-65.
55. Duffy JP, Eibl G, Reber HA, Hines OJ. Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer. *Mol Cancer.* 2003;2:12.
56. 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;10:8603-12.
57. Tan C, de Noronha RG, Roecker AJ, Pyrzynska B, Khwaja F, Zhang Z, et al. Identification of a novel small-molecule inhibitor of the hypoxia-inducible factor 1 pathway. *Cancer Res.* 2005;65:605-12.
58. Powis G, Kirkpatrick L. Hypoxia inducible factor-1 α as a cancer drug target. *Mol Cancer Ther.* 2004;3:647-54.
59. Vieira AR. Association between the transforming growth factor α gene and nonsyndromic oral clefts: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2006;163:790-810.
60. Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE, Twardzik DR, De Larco JE, Stephenson JR, et al. Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells: amino acid sequence homology with epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80:4684-8.
61. Wilcox JN, Derynck R. Developmental expression of transforming growth factors α and β in mouse fetus. *Mol Cell Biol.* 1988;8:3415-22.
62. Rapolee DA, Brenner CA, Schultz R, Mark D, Werb Z. Developmental expression of PDGF, TGF- α and TGF- β genes in preimplantation mouse embryos. *Science.* 1998;241:1823-5.
63. Hormi K, Onolfo JP, Gres L, Lebraud V, Lehy T. Developmental expression of transforming growth factor α in the upper digestive tract and pancreas of the rat. *Regul Pept.* 1995;55:67-77.
64. Verheul HM, Voest EE, Schlingemann RO. Are tumours angiogenesis-dependent?. *J Pathol.* 2004;202:5-13.
65. 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.
66. Conde SJ, Luvizotto RA, Sibio MT, Katayama ML, Brentani MM, Nogueira CR. Tamoxifen inhibits transforming growth factor- α gene expression in human breast carcinoma samples treated with triiodothyronine. *J Endocrinol Invest*. 2008;31:1047-51.
 67. Davis PJ, Davis FB, Lawrence WD. Thyroid hormone regulation of membrane CA2(+)-ATPase activity. *Endocr Res*. 1989;15:651-82.
 68. Davis PJ, Shih A, Lin HY, Martino LJ, Davis FB. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *J Biol Chem*. 2000;275:38032-39.
 69. Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G. Thyroid hormone action in mitochondria. *J Mol Endocrinol*. 2001;26:67-77.
 70. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev*. 2010;31:139-70.
 71. Williams GR. Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. *J Neuroendocrinol*. 2008;20:784-94.
 72. Bernal J. Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007;3:249-59.
 73. Liu YY, Brent GA. Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21:166-73.
 74. Moeller LC, Broecker-Preuss M. Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. *Thyroid Res*. 2011;4 Suppl 1:S6.
 75. Cheng SY. Thyroid hormone receptor mutations and disease: beyond thyroid hormone resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 2005;16:176-82.
 76. Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol*. 2008;29:211-8.
 77. Moeller LC, Dumitrescu AM, Refetoff S. Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1 α and glycolytic genes. *Mol Endocrinol*. 2005;19:2955-63.
 78. Figueiredo NB, Cestari SH, Conde SJ, Luvizotto RA, De Sibio MT, Perone D, et al. Estrogen-responsive genes overlap with triiodothyronine-responsive genes in a breast 1 carcinoma cell line. *Scient World J*. 2014;969404. doi:10.1155/2014/969404.
 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;51:1409-16.

80. Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: na update. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;83:249-89.
81. Brandes LJ, Hermonat MW. Receptor Status and Subsequent Sensitivity of Suclones of MCF-7 Human Breast Cancer Cells Surviving Exposure to Diethylstilbestrol 1. *Cancer Research.* 1983;43:2831-35.
82. Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL, Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimmers. *Mol Endocrinol.* 2004;18:2854-65.
83. McGuire Wl, Chamness GC, Costlow ME, Shepherd RE. Hormone dependence in breast cancer. *Metabolism.* 1974;23:75-100.
84. Conde SJ, Luvizotto RD, de Sibio MT, Nogueira CR. Human breast tumor slices as an alternative approach to cell lines to individualiza research for each patient. *Eur J Cancer. Prev.* 2012;21:333-5.
85. Kansra S, Yamagata S, Sneade L, Foster L, Ben-Jonathan N. Differential effects of estrogen receptor antagonists on pituitary lactotroph proliferation and prolactin release. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;239:27-36.
86. Hollstein U, Breitmaier E, Jung G. 13-C nuclear jagnetic resonance study of actinomycin D. *J Am Chem Soc.* 1974;96:8036-40.
87. Sobell HM. Actinomycin and DNA transcription. *Proc Natl Acad Sci.* 1985;82:5328-31.
88. Maira SM, Stauffer F, Schnell C, Garcia-Echeverria C. PI3K inhibitors for cancer treatment: where do we stand? *Biochem Soc Trans.* 2009;37:265-72.
89. 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.
90. Birner P, Schind M, Obermair A, Plank C, Breitenacker G, Oberhuber, G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is amarker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervicalcancer. *Cancer Res.* 2000;60:4693-6.
91. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues,cancers, and tumor associated macrophages. *Am J Pathol.* 2000;157:411-21.
92. Fata JE, Werb Z, Bissell MJ. Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. *Breast Cancer.* 2004;6:1-11.
93. Tlsty TD, Hein PW. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11:54-9.

94. Plaut K. Physiology and management. Role of Epidermal Growth Factor and Transforming Growth factors in mammary development and lactation. *J Dairy Sci.* 1993;76:1526-38.
95. Otto T, Fandrey J. Thyroid hormone induces hypoxia inducible factor 1 α gene expression through TR β /RXR α dependent activation of hepatic leukemia factor. *Endocrinology.* 2008;149:2241-50.
96. Cestari SH, Figueiredo NB, Conde SJ, Clara S, Katayama ML, Padovani CR, et al. Influence of estradiol and triiodothyronine on breast cancer cell lines proliferation and expression of estrogen and thyroid hormone receptors. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53:859-64.
97. Hoopfer ED, Huang L, Denver RJ. Basic transcription element binding protein is a thyroid hormone-regulated transcription factor expressed during metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Dev Growth Differ.* 2002;44:365–81.
98. Cao X, Kambe F, Moeller LC, Refetoff S, Seo H. 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.* 2005;19:102-12.
99. de Oliveira M, Luvizotto RAM, Olimpio RM, De Sibio MT, Conde SJ, Silva CBR, et al. Triiodothyronine Increases mRNA and Protein Leptin Levels in Short Time in 3T3-L1 Adipocytes by PI3K Pathway Activation. *PLoS One.* 2013;8:e74856.
100. Johnston SJ, Cheung KL. Fulvestrant - a novel endocrine therapy for breast cancer. *Curr Med Chem.* 17:902-14.
101. Marchiori AC, Casolari DA, Nagai MA. Transcriptional up-regulation of PHLDA1 by 17 β -estradiol in MCF-7 breast cancer cells. *Braz J Med Biol.* 2008;41:579-82.
102. Tattersall MH, Sodergren JE, Dengupta SK, Trites DH, Modest EJ, Frei E. Pharmacokinetics of actinomycin D in patients with malignant melanoma. *Clin Pharmacol Ther.* 1975;17:701-8.
103. Estlin EJ, Veal GJ. Clinical and cellular pharmacology in relation to solid tumours of childhood. *Cancer Treat.* 2003;29:253-73.
104. Volpato CB, Shiraishi EM, Latronico AC, Nunes MT. Thyroid hormone modulates the polyadenylation of growth hormone mRNA in rats. *Endocr J.* 2000;47:169.
105. Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature.* 1997;387:673-6.

106. Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Panayotou G, Waterfield MD. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci.* 1997;22:267-72.
107. Aubin D, Gagnon A, Sorisky A. Phosphoinositide 3-kinase is required for human adipocyte differentiation in culture. *Int J Obes.* 2005;29:1006-9.
108. Fang J, Ding M, Yang L, Liu LZ, Jiang BH. PI3K/PTEN/AKT signaling regulates prostate tumor angiogenesis. *Cell Signal.* 2007;19:2487-97.
109. 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 beta through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Nucl Recept Signal.* 2006;4:e020.
110. Davis PJ, Davis FB, Lin HY, Mousa SA, Zhou M, Luidens MK. Translational implications of nongenomic actions of thyroid hormone initiated at its integrin receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297:e1238-46.
111. Lei J, Mariash CN, Ingbar DH. 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.* 2004;279:47589-600.
112. Lin HY, Sun M, Tang HY, Lin C, Luidens MK, Mousa SA, et al. 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.* 2009;296:c980-91.

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: (14) 3880-1608 / 3880-1609
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
kleber@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 25 de setembro de 2013

Of. 147/2013-CEP

Ilustríssima Senhora
Prof^a. Dr^a. Célia Regina Nogueira
Departamento de Clínica Médica da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Prof^a. Célia,

Em relação ao Projeto de Pesquisa (Protocolo 3367-2009) "Efeito não genômico do tratamento com T3 e E2 na expressão gênica de Anphiregulin em células tumorais de mama", conduzido por Maria Teresa de Sibio, orientada por Vossa Senhoria, co-orientada pelo Prof. Dr. Sandro José Conde, aprovado por este CEP em 09/11/2009, informo que foi **AUTORIZADA** a inclusão do subprojeto, a saber:

Título: "Ações extra nucleares de Triiodotironina e Estradiol em linhagem celular de adenocarcinoma mamário"

Pesquisador responsável: Fernanda Cristina Fontes Moretto

Orientadora Prof^a. Dr^a. Célia Regina Nogueira

Co-orientador: Prof. Dr. Sandro José Conde

Informo que ao final da execução deverá ser apresentado ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Prof. Dr. Trajano Sardenberg
Coordenador do CEP

ANEXO 02



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



MUDANÇA DE TÍTULO EM PROJETO DE PESQUISA

Objetivo Acadêmico:

- () Pós Doutorado
- () Tese Doutorado
- (X) Dissertação de Mestrado
- () Trabalho científico
- () Outros: Especificar

Título Inicial:

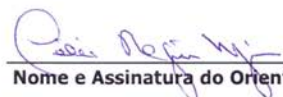
"AÇÕES EXTRA NUCLEARES DE TRIIODOTIRONINA E ESTRADIOL EM LINHAGEM CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO".

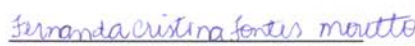
Título Final:

"AÇÃO EXTRA-NUCLEAR DO HORMÔNIO TRIIODOTIRONINA (T₃) NA EXPRESSÃO GÊNICA DE HIF-1 α E TGF α EM LINHAGEM CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO".

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

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


Nome e Assinatura do Orientador(a)


Nome e Assinatura do Orientado(a)

- **Projetos submetidos via Plataforma Brasil:** Preencher o formulário, digitalizar e postar no sistema Plataforma Brasil.
- **Projetos submetidos anteriormente à Plataforma Brasil:** Preencher o formulário em duas vias e protocolar no CEP que emitiu o parecer inicial de aprovação.

Faculdade de Medicina de Botucatu – Seção Técnica de Pós-graduação
Distrito de Rubião Júnior, s/n CEP 18618-970 Botucatu São Paulo Brasil
Tel 55 14 3880 1123 - spg@fmb.unesp.br

15143 12/01/2015 0000000 COMITE DE ETICA EM PESQUISA FMB - UNESP