Ana Paula Zen Petisco Fiore

**INFLUÊNCIA DO EXCESSO DE IODO NA ATIVAÇÃO DO
ONCOGENE RET/PTC3 NA LINHAGEM PCCL3 DE TIRÓIDE
DE RATO**

Ana Paula Zen Petisco Fiore

**INFLUÊNCIA DO EXCESSO DE IODO NA ATIVAÇÃO DO ONCOGENE
RET/PTC3 NA LINHAGEM PCCL3 DE TIRÓIDE DE RATO**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Biologia Celular e Tecidual).

São Paulo
2008

Ana Paula Zen Petisco Fiore

**INFLUÊNCIA DO EXCESSO DE IODO NA ATIVAÇÃO DO ONCOGENE
RET/PTC3 NA LINHAGEM PCCL3 DE TIRÓIDE DE RATO**

Dissertação (Mestrado) apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:
Biologia Celular e Tecidual

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Edna Teruko Kimura

São Paulo
2008

BANCA

ÉTICA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e meus irmãos, pelo
amor incondicional, exemplo de
perseverança e principalmente pela
dedicação.

Aos meus avós, por serem o meu
maior exemplo de vida.

À minha orientadora Edna Teruko
Kimura, que me acolheu e a quem
eu devo todo meu aprendizado.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Edna Teruko Kimura, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos, pela paciência e principalmente pelo incentivo

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular da Tiróide, Alex, César, Eloiza, Gabriella, Julio, Kellen, Luciane, Marley, Murilo, Sabrina, Simone, e Suzana pelo apoio e por estarem sempre presentes nos momentos nos quais precisei de conselhos, de ajuda e de um ombro amigo

À Prof.^a Maria Teresa e seus alunos pela amizade

À Prof.^a Janete e seus alunos pelos conselhos e amizade

À minha mãe, meu pai, meus irmãos e à meus avós, presentes, nos momentos alegres, mas principalmente nos de desespero, por tornarem minha vida mais feliz e nunca me deixaram desanimar

Aos amigos do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, pelos bons momentos, atividades “extracurriculares” e muitas risadas

À Bianca e Manuela, minhas queridas amigas que estiverem sempre presentes, da faculdade para a vida

À Ale, Camila, Daniel, Fabio, Fernanda, Hugo, Ivan, Julia, Juliette, Leandro, Marcelo, Marianna, Natalia, Tiago, Rafael, Ricardo e Vinicius, por fazer parte da minha vida e me tornarem mais feliz

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro ao projeto e pela bolsa de mestrado (05/57957-9).

A Maria José de Jesus Carvalho pela revisão deste trabalho e pelo carinho

À todos direta ou indiretamente envolvidos com este trabalho.

“Não quero ter a limitação de quem
vive apenas do que é passível de fazer
sentido.”

Clarice Lispector

RESUMO

Fiore APZP. Influência do excesso de iodo na ativação do oncogene RET/PTC3 na linhagem PCCl3 de tiróide de rato [Tese de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008.

Carcinomas papilíferos de tiróide (PTC) estão freqüentemente relacionados à ativação da via de sinalização MAPK por diversos oncogenes, como RET/PTC, RAS e BRAF. Estudos recentes têm relacionado a incidência de PTC com a disponibilidade de iodo, um dos mais importante reguladores da função tiroidiana. Recentemente, nosso grupo descreveu alterações na inibição da via de sinalização TGF β durante a indução de RET/PTC3 em células tiroidianas, que podem estar diretamente envolvidos com o desenvolvimento de PTC. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com alta concentração de iodo durante a ativação de RET/PTC em células tiroidianas. Métodos: células PTC3-5, células PCCl3 com um sistema de indução do oncogene *RET/PTC3* controlada pela doxícilina (DOX), fora tratadas com 10⁻³M de NaI (DOX-I), utilizamos células PTC3-5 sem o tratamento com doxícilina como controle. A proliferação celular foi analisada por contagem de célula e teste MTT, a morte celular foi avaliada por coloração com azul de tripan. A expressão de genes específicos tiroidianos (*Nis*, *Tshr*, *Tg* and *Tpo*) e genes da via de sinalização TGF β (*TGF β* , *Smad4*, *Smad7*) foram avaliada por qPCR. A expressão proteica de *Nis*, *Tshr* e de proteínas da via MAPK foram analisadas por Western blotting. Resultados: células DOX apresentaram uma redução de 65% na proliferação e um aumento na morte celular. Além disso, observamos uma redução tempo dependente na expressão gênica de *Nis*, *Tshr* e *Tpo*. As células DOX-I apresentaram uma redução de 20% mais pronunciada, em relação as células DOX, mas não alterou a morte celular. As células DOX-I mantiveram a expressão de genes específicos tiroidianos. Em ambos os tratamento, não observamos diferenças na expressão protéica de Braf e Erk. No entanto, células DOX apresentaram um aumento em pRet e pErk e uma diminuição significativa na expressão protéica de *Nis* e *Tshr*. Concomitantemente, células DOX-I apresentaram uma redução em pRet e pErk, enquanto a expressão protéica de *Nis* e *Tshr* estava aumentada, em comparação as células DOX. Interessantemente, a indução de RET/PTC3 aumentou a expressão gênica de TGF β e fatores inibitórios da via de TGF β . Células DOX-I apresentaram um aumento na expressão de TGF β , e uma redução significativa na expressão dos fatores inibitórios da via de TGF β . Conclusão: a indução do oncogene RET/PTC3 em células normais tiroidianas levam ao aumento da atividade da via MAPK e perda da expressão de genes específicos tiroidianos. Altas

concentrações de iodo reduziram a expressão de efetores da via MAPK e recuperaram a expressão de Nis e Tshr. Esses resultados sugerem uma ação antioncogenica assumida pelo excesso de iodo durante a ativação do oncogene RET/PTC3 em células tiroidianas.

Palavras-chave: Glândula tiróide; Oncogenes; RET/PTC3; Excesso de Iodo; Via de sinalização MAPK; Cultura de células.

ABSTRACT

Fiore APZP. Influence of Iodine Excess in RET/PTC3 Oncogene Activated PCCl3 Thyroid Cell Lineage [Master thesis]. São Paulo: Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, Brazil; 2008.

Papillary thyroid carcinomas (PTC) are related to the activation of the MAPK pathway by several oncogenes such as RET/PTC, RAS and BRAF. PTC incidence is being related to the availability of iodine, one of the most important regulators of the thyroid function. Recently, we described the impairment of TGF β inhibitory effects in thyroid RET/PTC3 induced cells, which can be directly involved in PTC development. The aim of our study was to evaluate the effects of iodine high concentration during RET/PTC activation in thyroid cells. Methods: PTC3-5 cells, PCCl3 cells with doxycycline-inducible *RET/PTC3* (DOX), were treated with NaI 10⁻³M (DOX-I), as control we used PTC3-5 cells without doxycycline treatment. Cell proliferation was analyzed by cell counting and MTT-assay and cell death was evaluated by tripan blue staining. Thyroid specific genes (*Nis*, *Tshr*, *Tg* and *Tpo*) and TGF β signaling pathway related genes (*TGF β* , *Smad 4*, *Smad7*) expression were evaluated by qPCR. *Nis*, *Tshr* and MAPK signaling protein expression were analyzed by Western blotting. Results: DOX cells presented a proliferation reduction of 65% and an increment in cell death. In addition, we observed a time dependent reduction in *Nis*, *Tshr* e *Tpo* gene expression. DOX-I cells presented a proliferation reduction 20% more pronounced than DOX cells and didn't alter death rate. Moreover, DOX-I cells maintained the thyroid specific gene expression. In both treatments, we observed no difference in Braf and Erk protein expression. However, DOX cells presented an increment in pRet and pErk and a significant reduction in *Nis* and *Tshr*. Concomitantly, DOX-I cells presented a reduced pRet and pErk protein expression, while *Nis* and *Tshr* protein expression was increased, in comparison to DOX cells. RET/PTC3 induction also increased TGF β and TGF β inhibitory factors expression. We also observed that iodine treated concomitant to RET/PTC3 induced cells had an increment in TGF β expression, while TGF β inhibitory factors were down regulated. Conclusion: The induction of RET/PTC3 in thyroid normal cells leads to MAPK pathway activation and thyroid specific gene expression loss. High dose iodine treatment decreases the expression of MAPK effectors and recovered the *Nis* and *Tshr* expression. These results suggest an antioncogenic role of high dose iodine during thyroid RET/PTC3 oncogene activation.

Key words: Thyroid gland, Oncogenes, RET/PTC3, Iodine excess, MAPK signaling pathway, Cell culture

LISTA DE ABREVIACÕES

PTC: Papillary Thyroid Carcinoma

RET/PTC: Rearranged in Transformation/Papillary Thyroid Carcinomas

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

BRAF: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

ERK: extracellular signal-regulated kinase

pERK: phosphorylated extracellular signal-regulated kinase

GDNF: Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor

NIS: Sodium/iodine symporter

TSH: Thyroid-stimulating hormone

TSHr: Thyroid-stimulating hormone receptor

TG: Thyroglobulin

MIT: Monoiodotyrosine

DIT: Diiodotyrosine

TPO: Thyroperoxidase

TGFβ: Transforming Growth Factor β

SMADS: Similar to Mothers Against Decapentaplegic in Drosophila

SMURFS: SMAD Specific E3 Ubiquitin Ligase

HAM-F12: Ham's Nutrient Mixture F-12

SFB: Soro Fetal Bovino

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

RNA: Acido Ribonucleico

mRNA: RNA mensageiro

DNase: Desoxiribonuclease

MMLV: Moloney Murine Leukemia Virus

RIPA: do inglês: RadioImmuno Precipitation Assay

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês: *Sodium Dodecil Sulfate*)

RPL19: ribossomal protein L19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de ativação do receptor RET	25
Figura 2. Rearranjo de <i>RET/PTC</i> implica na ativação constitutiva da via MAPK durante a patogênese de PTC.....	26
Figura 3. Desenho representativo da captação de iodo e da síntese hormonal no folículo tireoidiano	28
Figura 4. Esquema da sinalização celular de TGF β	31
Figura 5. Estabelecimento da linhagem PCCl3 com dupla transfecção dos vetores pTet On, pTK Hyg e pTRE	35
Figura 6: Sistema de expressão condicional na presença da doxíciclina para indução do oncogene <i>RET/PTC3</i>	36
Figura 7. Figura demonstrativa dos dados gerados por PCR em tempo real	40
Figura 8. Expressão do oncogene <i>RET/PTC3</i> induzida pela doxíciclina em células PTC3-5 tratadas com alta concentração de iodo	45
Figura 9. Aspectos morfológicos de células com indução controlada do oncogene <i>RET/PTC3</i> na presença da doxíciclina	46
Figura 10. Efeito do tratamento com alta dose de iodo na proliferação e viabilidade de células com a indução do oncogene <i>RET/PTC3</i>	49
Figura 11. Efeito do tratamento com alta dose de iodo na via de sinalização MAPK de células com a indução do oncogene <i>RET/PTC3</i>	52
Figura 12. Efeito do tratamento com alta dose de iodo na expressão de genes da via de sinalização TGF β células com a indução do oncogene <i>RET/PTC3</i>	55
Figura 13. Efeito do tratamento com alta dose de iodo na expressão de genes específicos tireoidianos em células com a indução do oncogene <i>RET/PTC3</i>	58

Figura 14. Efeito do tratamento com alta dose de iodo na expressão de proteínas específicas tiroidianas.....	60
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de <i>primers</i> utilizados para validar a expressão dos genes selecionados por RT-PCR quantitativo	39
Tabela 2. Resultados numéricos da análise da expressão de proteínas relacionadas com a via MAPK.....	51
Tabela 3. Resultados numéricos da análise da expressão de genes inibitórios a via TGF β	54
Tabela 4: Resultados numéricos da análise da expressão de genes específicos tireoidianos	57
Tabela 5. Resultados numéricos da análise da expressão de proteínas específicas tireoidianas	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 OBJETIVO	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Cultura celular e indução do oncogene RET/PTC3	35
3.2 Proliferação e viabilidade celular.....	37
3.2.1 Contagem celular	37
3.2.2 Ensaio de 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).....	37
3.3 Expressão gênica por RT-PCR quantitativo.....	38
3.3.1 Extração de RNA total	38
3.3.2 Transcrição reversa (RT)	38
3.3.3 PCR quantitativo real time	39
3.3.4 Quantificação da expressão gênica	40
3.4 Extração proteica e Western blotting	41
3.4.1 Extração de proteínas.....	41
3.4.2 Western Blotting.....	42
3.5 Estatística	43
4 RESULTADOS	45
4.1 Efeito do tratamento com alta concentração de iodo na indução controlada do oncogene RET/PTC3 em células normais de rato	45
4.2 Efeito da Alta Dose de Iodo na Proliferação e Viabilidade	47
4.3 Efeito do tratamento com alta dose de iodo na via de sinalização MAPK.....	50
4.4 Efeito do tratamento com alta dose de iodo na expressão de genes da via TGFβ ..	53
4.5 Efeito do tratamento com alta dose de iodo na expressão de genes específicos tireoidianos.....	56

5 DISCUSSÃO	62
6 CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve um aumento significativo na incidência de tumores tireoidianos na população mundial (Delellis, 2004). Interessantemente, tanto a incidência de tumores tireoidianos benignos quanto de malignos vem sendo relacionada ao consumo flutuante de iodo (Knobel *et al.*, 2007). Porém, os estudos quanto à participação do iodo, elemento essencial para a síntese de hormônios tireoidianos, na patogênese do câncer tireoidiano permanecem inconclusivos.

Os carcinomas de tiróide são as neoplasias malignas mais prevalentes dentre as do sistema endócrino, sendo 70% correspondente ao subtipo histomorfológico papilífero (Delellis, 2004). Embora muito estudado, a caracterização dos eventos moleculares iniciais do desenvolvimento do carcinoma papilífero de tiróide permanece, em parte, desconhecida. Sabe-se que a patogênese deste subtipo de câncer tireoidiano, está em sua maioria (60%), relacionada a alterações nos genes *RET*, *RAS* ou *BRAF*, que ocorrem praticamente sem justaposição (Kimura *et al.*, 2003; Fagin, 2005; Fusco *et al.*, 2007). Em particular, rearranjos do gene *RET* ocorrem em cerca de 20% dos carcinomas papilíferos de tiróide (PTC) (Fusco *et al.*, 1987; Santoro *et al.*, 1992).

O gene *RET* normal, que tem expressão restrita a células derivadas da crista neural, está inserido no cromossomo 10 (10q11.2) e codifica para um receptor tirosino-kinase composto por três domínios: 1) domínio de afinidade por um ligante, com quatro repetições caderina-*like* e uma região rica em cisteína, extracelular; 2) domínio hidrofóbico, transmembrana; 3) domínio tirosino-kinase (TK), citoplasmático. RET apresenta afinidade por receptores de fatores de crescimento da família das GDNF (sGFR α 1), e sua ativação pode gerar a ativação de várias cascatas de sinalização, que regulam sobrevivência, diferenciação, proliferação, migração, quimiotaxia, entre outras (Arighi *et al.*, 2005). A ativação da Tyr1062 no domínio citoplasmático de RET gera a ativação da via MAP kinase (Figura 1 e 2) (Knauf *et al.*, 2003), uma das vias de sinalização mais bem caracterizadas, já que sua

participação é observada em diversos tipos de tumores de células epiteliais, dentre os quais mama, pulmão, melanomas e carcinomas de célula folicular tiroideana (Dhillon *et al.*, 2007).

Figura1 - Modelo de ativação do receptor RET. GDNF se liga a sGFR α solúvel. O complexo GDNF-sGFR α se liga ao receptor RET, formado por um dímero de RET. A ativação de RET se associa preferencialmente a ativadores da via MAPK. (Adaptado de Arighi *et al.*, 2005).

Na célula folicular tiroideana, a ativação de *RET* ocorre quando há um rearranjo intracromossomal entre o domínio TK de RET e a porção N-terminal de um gene heterólogo (Grieco *et al.*, 1990). O resultado é uma ativação constitutiva do receptor, com estímulo sustentado da via MAP kinase (Fusco *et al.*, 2007). Os efeitos biológicos mediados por RET/PTC na célula folicular tiroideana incluem o aumento da proliferação, perda de função e invasão, dependentes da ativação constitutiva da via de sinalização RET/PTC-RAS-BRAF-MAP kinase (Figura 2) (Santoro *et al.*, 1993). Nas células tiroideanas com ativação da via MAPK, a inibição de RAS e BRAF é capaz de interferir na fosforilação de ERK em células que apresentem expressão do oncogene RET/PTC (Melillo *et al.*, 2005; Mitsutake *et al.*, 2006).

Figura 2 - Rearranjo de RET/PTC implica na ativação constitutiva da via MAPK durante a patogênese de PTC. Diversos estudos in vitro apontam para a ativação da Y1062 como principal responsável por essa sustentação da via de RET/PTC-RAS-BRAF-MAP kinase, na transformação e desdiferenciação da célula tireoidiana. (Adaptado de Fagin, 2004b).

Em carcinoma de célula folicular tireoidiana as isoformas identificadas do rearranjo RET/PTC, identificadas, variam de acordo com o gene envolvido no segmento 5' do rearranjo de *RET/PTC* (Fusco *et al.*, 1987). Dentre as isoformas conhecidas do rearranjo de *RET*, as que prevalecem em PTC são *RET/PTC1* e *RET/PTC3* (Fagin, 2004). Ao contrário de *RET/PTC1* que é encontrado em PTC de indivíduos adultos, *RET/PTC3* é a alteração gênica prevalente na variante folicular de PTC pediátrico (Klugbauer *et al.*, 1995,1996). Apesar da baixa ocorrência de PTC em crianças, a exposição à radiação ionizante é um evento que promove um grande aumento na incidência de PTC pediátrico (Klugbauer *et al.*, 1995,1996).

Estudos pós-acidente de Chernobyl mostraram um grande aumento na incidência de PTCs pediátricos no decorrer dos anos, sendo que a maior parte dos casos se referia à formação quimérica RET/PTC3 (Klugbauer *et al.*, 1995; Nikiforov

et al., 1997). Recentes estudos revelaram que as regiões expostas à radiação, em especial Belarus, eram deficientes de iodo e que a incidência de PTC, relacionada ao rearranjo RET/PTC3, era muito alta em crianças habitantes desta região (Kazakov *et al.*, 1992; Cardis *et al.*, 2005). Contudo, áreas expostas à mesma concentração de radioisótopos, onde havia suficiência, ou até excesso de consumo de iodo na alimentação havia uma menor frequência do tipo tumoral papilífero (Shakhtarin *et al.*, 2003). Embora os estudos epidemiológicos de exposição à radiação indiquem um importante papel do iodo na incidência de PTC, o mecanismo molecular de atuação de iodo em células tireoidianas expostas à radiação é pouco conhecido até o momento. Dayem e colaboradores hipotetizam que os transportadores de iodo internalizariam preferencialmente o iodo estável, inibindo a entrada do iodo radioativo (Dayem *et al.*, 2006).

A ingestão de iodo é indispensável para a síntese dos hormônios tireoidianos T3 e T4, na glândula tireóide atua como um dos principais reguladores da fisiologia. O iodo é absorvido pelo trato digestório, liberado na corrente sanguínea e captado pela tireóide (Kimura, 2007). O transporte do iodo para dentro da célula folicular ocorre por transporte ativo pela membrana basal (Figura 3), mediado pela proteína NIS (Dohan, De La Vieja *et al.*, 2003). Na membrana apical o iodo é organificado pela TPO na presença de H_2O_2 e é incorporado aos resíduos de tirosina da molécula de TG. Os hormônios tireoidianos são sintetizados através do acoplamento dos resíduos de iodo tirosinas (DIT e MIT) e são liberados na corrente sanguínea, em resposta a estímulos do TSH (Larsen *et al.*, 1998).

Figura 3 - Desenho representativo da captação de iodo e da síntese hormonal no foliculo tireoidiano, mediado pelo TSH. O iodo proveniente da corrente sanguínea é transportado para o interior do tireócito via NIS. Após seu transporte para o colóide, o iodo é oxidado pela tiroperoxidase (TPO), na presença de H_2O_2 , e incorporado nos resíduos de tirosina (Tir) na tiroglobulina (TG), formando MIT e DIT. O acoplamento das iodotirosinas forma os hormônios T_3 e T_4 , que são liberados para a corrente sanguínea por um processo realizado pela célula folicular, que envolve a endocitose e a hidrólise da TG. (Adaptado de Leoni, 2007).

É conhecido que grande parte do território brasileiro está em uma zona de bócio endêmico, que não atinge o consumo diário de iodo sugerido, 150-200 μ g para adultos. Em 1974 foi criada a lei nº 6.150, que dispõe da obrigatoriedade de iodação do sal destinado ao consumo, porém o controle de qualidade não previa um rigoroso controle da concentração de iodo adicionado ao sal (40-60mg/kg de sal). A ingestão de sal diária passou a atingir uma alta concentração média, 500 μ g/dia, muito acima da dose recomendada (Medeiros-Neto *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2004).

A administração de altas concentrações de iodo é responsável pelo mecanismo auto-regulatório do excesso de iodo na tiróide, reconhecido pela queda do transporte de iodo para o interior da célula folicular e inibição da síntese hormonal, clinicamente chamado efeito “Wolff-Chaikoff” (Morton *et al.*, 1944; Wolff, 1949) e inibição da proliferação de células tiroidianas, já comprovado em experimentos *in vivo* e *in vitro* (Becks *et al.*, 1988; Tramontano *et al.*, 1989; Dumont *et al.*, 1992; Uyttersprot *et al.*, 1997). Os mecanismos responsáveis por estes efeitos permanecem pouco esclarecidos, porém alguns trabalhos indicam que a ação inibitória do iodo na tiróide pode ser resultado de um aumento intracelular da concentração de iodolipídeos, após tratamento com alta dose de iodo (Dugrillon, 1996). Sugere-se que os iodolipídeos desempenhem um importante papel na inibição da organificação do iodo, através da inibição da produção de H_2O_2 pelo bloqueio da atividade da enzima *Thox* (Vaisman *et al.*, 2004).

O efeito inibitório do iodo na síntese hormonal é transiente, após o período de 26 a 50 horas a tiróide se adapta ao excesso de iodo e a produção hormonal retorna aos níveis normais. Este fenômeno é chamado de escape ao efeito Wolff-Chaikoff (Wolff, 1949). A adaptação da tiróide a altas doses de iodo era causada por uma diminuição no transporte de iodo na tiróide, resultando em uma redução na quantidade de iodo intratiroidiano, que se tornaria insuficiente para sustentar o efeito de bloqueio na síntese hormonal (Braverman *et al.*, 1963). Mais recentemente foi demonstrado que esta diminuição da captação de iodo pela célula folicular, resultando no escape da glândula ao efeito Wolff-Chaikoff, pode ser resultado da diminuição da expressão do RNA mensageiro e de proteína de *NIS* (Eng *et al.*, 1999).

Recentemente, nosso grupo avaliou a expressão global de genes em células tiroidianas normais tratadas com altas concentrações de iodo, observamos a promoção da expressão diferencial de diversos genes envolvidos em vias distintas, dependentes e independentes de AMPc. Estas vias podem estar envolvidas em funções complementares na inibição da proliferação e diferenciação de células foliculares pelo excesso de iodo (Leoni *et al.*, 2008).

Alguns estudos verificaram a participação de diversos fatores de crescimento no mecanismo auto-regulatório exercido pelo iodo na célula folicular tiroideana, dentre os quais TGF β foi observado aumentado em células tratadas com alta concentração do iodo (Yuasa *et al.*, 1992). O fator de crescimento TGF β possui reconhecida ação inibitória na síntese de DNA e na proliferação de células foliculares da tireóide (Massague *et al.*, 2000; Matsuo *et al.*, 2006). No entanto, TGF β possui uma expressão aumentada em tumores tireoidianos benignos e malignos (Kimura *et al.*, 1999), indicando que a participação da via de TGF β pode influenciar na tumorigênese tiroideana.

Na transdução de sinal, TGF β se liga ao seu receptor tipo II (T β RII) na membrana celular, o qual fosforila e ativa o receptor tipo I (T β RI). O receptor tipo I propaga a sinalização através da ativação e fosforilação de proteínas citoplasmáticas da família de SMADs. As Smads regulatórias SMAD2 e SMAD3 (*R-SMAD*) quando fosforiladas associam-se a outro componente da família, a SMAD4 (*Co-SMAD*) ligando-se à região promotora de genes regulatórios do ciclo celular. Além destes SMADs, o SMAD7 (*I-SMAD*) inibe a fosforilação dos R-SMADs, interferindo na fosforilação de SMAD2/3 pelo receptor tipo I e na formação do complexo R-SMAD/Co-SMAD (Heldin *et al.*, 1997).

Figura 4 - Esquema da sinalização celular de TGFβ. TGFβ se liga ao seu receptor de membrana tipo II (TβRII), o qual recruta e ativa o receptor tipo I (TβRI). A sinalização intracelular é propagada através de proteínas SMADs, sendo que *SMAD2* e *SMAD3* são fosforiladas e ativadas pelos receptores tipo I. A *SMAD4* se une a *SMAD2/3* fosforilada e este complexo modula a transcrição de genes alvos no núcleo. *SMAD7* inibe a sinalização de TGFβ. (Adaptado de Massague *et al.*, 2000).

Neste estudo procuramos buscar um melhor entendimento do mecanismo molecular do efeito do excesso de iodo durante a transformação de células tireoidianas, utilizando um sistema de expressão condicional do oncogene *RET/PTC3* *in vitro* tratadas com altas concentrações de iodo.

2 OBJETIVOS

Caracterizar a influência do excesso de iodo em célula folicular tiroidiana com indução controlada do oncogene *RET/PTC3*, na proliferação e viabilidade celular, expressão de efetores das vias de sinalização MAPK e TGF β , na expressão de fatores de diferenciação tiroidiana.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura celular e indução do oncogene RET/PTC3

As células da linhagem de tiróide normal de rato PCCl3 foram transfectadas com rtTA, selecionadas em presença de Neomicina (Neo), o cDNA *RET/PTC3* foi subclonado no vetor PUGH10-3. Este, possui heptâmeros repetidos de tetO e um promotor mínimo de citomegalovírus (CMV) (Gossen *et al.*, 1995). PUGH10-3 contendo o gene *RET/PTC3*, que foram também transfectados em células PCCl3 que expressam elevados níveis de rtTA (PCCl3-rtTA), com co-transfecção de vetor TK-Hyg que possui um gene de resistência a higromicina (Hyg) regulado pelo promotor TK em células PCCl3-rtTA, as células foram então denominadas PTC3-5 (Figura 5). Os clones positivos foram selecionados pelo tratamento com a Hyg (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A eficácia da indução do gene RET/PTC foi verificada por RT-PCR (Figura 6) (Wang *et al.*, 2003).

Figura 5 - Estabelecimento da linhagem PCCl3 com dupla transfecção dos vetores pTet On, pTK Hyg e pTRE. Necessários para a indução do oncogene RET/PTC3 nas células foliculares em cultivo.

Figura 6 - Sistema de expressão condicional na presença da doxíciclina para indução do oncogene RET/PTC3. A doxíciclina se liga a proteína quimérica rtTA, que se liga a região responsiva a rtTA do vetor PUHG e induz a transcrição do gene de interesse.

As células foram mantidas em meio Ham-F12 suplementado com soro fetal bovino (5%), 1 mIU/ mL de TSH bovino (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), 10 µg/mL de insulina (Sigma), 5 µg/mL de apotransferrina (Sigma), 10 nM de hidrocortisona (Sigma), 100 U/mL penicilina/100 µg/mL streptomycina (Invitrogen), 1 µg/mL de anfotericina (Invitrogen) e antibióticos (Neomicina e Hygromicina) em uma incubadora 5% CO₂, umidificada a 37 °C. A expressão de RET/PTC3 foi induzida após o tratamento de células PTC3-5 com 1 µg/mL doxíciclina (Calbiochem, San Diego, CA, EUA), grupo RET/PTC3, outro grupo de células foi tratado com doxíciclina e 10⁻³M de NaI (Merck, Damstadt, Alemanha), chamado RET/PTC3-I. Células PTC3-5 cultivadas sem doxíciclina foram utilizadas como grupo controle (CTR) e foram também cultivadas em presença de 10⁻³M de NaI (grupo Io), os diferentes grupos foram cultivados durante 0, 24, 48, 72 e 120 horas.

3.2 Proliferação e viabilidade celular

3.2.1 Contagem celular com azul de tripan:

Foram semeadas e tratadas 5×10^4 células/poço, nos tempos estabelecidos, as células foram removidas das placas pela solução de tripsina/EDTA (Matsuo *et al.*, 2006). As células foram então centrifugadas e ressuspensas em meio completo, utilizamos uma concentração 1:1 de meio e azul de tripan 4% (Invitrogen). As células inviáveis se coram na presença do azul de tripan, o que possibilita a diferença visual das células viáveis e inviáveis. Foram realizados três ensaios distintos em triplicatas.

3.2.2 Ensaio de 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT):

Em placas de 96 poços foram semeadas 10^4 células/poço, nos tempos determinados 10 µl de solução MTT (0,125 mg/mL) (Invitrogen) foi adicionado em cada poço, seguido por incubação a 37 °C por 3 horas, quando o meio foi removido. Após remoção do meio, 100 µl de HCL 0,04 M em isopropanol foi adicionado aos poços para solubilizar o produto formado, que foi levado para leitura no espectrofotômetro Spectra Max Plus (MDS, Concord, ON, Canadá). A leitura do sinal foi feita na absorbância 595 nm. MTT é um ensaio colorimétrico quantitativo baseado na clivagem de um sal amarelo tetrazolium (MTT) pela enzima desidrogenase da mitocôndria e a subsequente formação de um cristal azul escuro insolúvel, que se acumula somente no interior das células metabolicamente ativas. A quantidade de cor produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Mosmann, 1983).

3.3 Expressão gênica por RT-PCR quantitativo

3.3.1 Extração de RNA total:

Foram cultivadas 5×10^5 células/poço em placas de 6 poços, as células foram submetidas ao tratamento com NaI (10^{-3} M) e doxíciclina. Após a remoção do meio de cultura as células foram lavadas duas vezes com PBS. As células foram removidas das placas com reagente Trizol (Invitrogen), com auxílio de um *scraper* e homogeneizadas em aparelho Politron (Kinemática, Lucerna, Suíça). Para a extração do RNA, 0.2 ml de clorofórmio (Merck) foi adicionado às células, seguido de centrifugação das amostras a 10.600 rpm, a 4 °C por 15 minutos. A fase aquosa foi coletada e precipitada com isopropanol (Merck), seguindo-se de incubação em temperatura ambiente e nova centrifugação a 10.600 rpm, a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi removido, e o *pellet*, que corresponde ao RNA total, foi lavado com etanol 95% e centrifugado a 7.500 rpm a 4 °C por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspenso em 20 µl de água DEPC inativa. As amostras foram levadas para quantificação de RNA total em espectrofotômetro (Hitachi, Tokyo, Japão), esperando-se obter valores da relação $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$, e mantidas a -20°C até o momento de uso (Chomczynski *et al.*, 1987). Cada 10 µg de amostra de RNA foi tratado com DNase (1 U/µl) (Invitrogen) por 10 minutos em temperatura ambiente, foi então adicionado EDTA (5 mM), após isso inativamos a ação da DNase incubando as amostras a 75 °C.

3.3.2 Transcrição reversa:

Para obtenção do DNA complementar (cDNA), realizamos reações de transcrição reversa (RT) a partir de 3 µg do RNA total, de células PCC13 sem tratamento e células PCC13 tratadas com 10^{-3} M de NaI. Para cada reação foram adicionados 200 ng de random *primer* (Invitrogen), 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 0,1mM de deoxinucleotídeos trifosfatados (GE Healthcare, Munique, Alemanha), 400U de M-MLV (Invitrogen) e água DEPC, para completar o volume total de 20 µl. A reação foi levada ao termociclador Cyclogene a 21 °C por 10

minutos, 42 °C por 30 minutos e 99 °C por 10 minutos para geração do cDNA, estocado a -20 °C até o momento de utilização em reações de PCR (Leoni, 2007).

3.3.4 PCR quantitativo real time:

Para a reação de PCR em tempo real utilizamos o reagente SYBR[®]Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), que possui a capacidade de se intercalar entre as fitas de DNA. Desta maneira, a expressão gênica é calculada através da quantidade de fluorescência emitida em cada reação. Foram utilizados 50ng de cDNA, em uma reação com volume final de 20 µl contendo 10 µL de SYBR[®]Green PCR Master Mix e 200 nM de cada par de *primers* (tabela1) . Os *primers* utilizados para esta análise foram desenhados pelo programa *Primer Express* (Applied Biosystems), baseados em seqüências dos genes de interesse disponíveis no banco de dados do *GenBank*. Os *primers* sense e antisense foram escolhidos em éxons distintos, identificados pelo programa *Blat* (Altschul *et al.*, 1997), para evitar amplificação de DNA genômico (Leoni, 2007).

Tabela 1 - Lista de *primers* utilizados para validar a expressão dos genes selecionados por RT-PCR quantitativo.

Gene	Seqüência dos primers
<i>Tshr</i>	FWD: GGCTGCTGGCTGCTTCTTTT REV: TCAGACGCATGATCAAAATGAAA
<i>Nis</i>	FWD: AGCCTCGCTCAGAACCATTC REV: GTGTACCGGCTCCGAGGAT
<i>Tg</i>	FWD: CTCAGGACGATGGGCTTATCA REV: GTTCGGCCTTGGCTTTCTTC
<i>Tpo</i>	FWD: ACAGTTCTCCACGGATGCACTA REV: GGCAAGCATCCTGACAGGTT
<i>Tgfβ</i>	FWD: AAGAAGTCACCCCGCGTGCTA REV: TGTGTGATGTCTTTGGTTTTGTCA
<i>Smad4</i>	FWD: GTACCACCAACTTCCCCAACA REV: TGCTTTCTGTCCCGTAATTGTG
<i>Smad 7</i>	FW: TCCTGCTGTGCAAAGTGTTT REV: CAGGCTCCAGAAGTTGG
<i>Rpl19</i>	FWD: TCTCATGGAACACATCCACAA REV: TGGTCAGCCAGGAGCTTCTT

Como controle interno da reação, *primers* para amplificação do gene RPL19 foram utilizados. A reação de PCR foi realizada em aparelho ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 95 °C por 15 segundos (40 ciclos) e 60 °C por 1 minuto. Os resultados das reações de PCR foram analisados pelo programa ABI PRISM 7300 Sequence Detection System. Neste programa, a expressão gênica é calculada a partir do número de ciclos necessários (*CT threshold cycle*) para que a fluorescência emitida atinja um valor inicial para cada gene (*threshold value*). Este valor foi estipulado como 0.1 para todos os genes analisados (Figura 7).

Figura 7 - Figura demonstrativa dos dados gerados por PCR em tempo real. O valor de *threshold cycle* (CT) para o gene alvo em cada amostra é determinado pelo número de ciclos em que o sinal da fluorescência cruza a linha de *threshold* (0.1).

3.3.5 Quantificação da expressão gênica:

A expressão gênica foi calculada através dos valores CT (dos genes de interesse e do gene de referência) obtidos no programa ABI 7300 System Software (Applied Biosystems). Calculamos a média da expressão para cada gene utilizando a

planilha Qgene. O cálculo da expressão gênica normalizada (MNE) de cada gene alvo foi calculada em relação ao gene de referência, utilizando a fórmula:

$$MNE = \frac{(Ef_{\text{gene referência}})^{CT_{\text{referência média}}}}{(Ef_{\text{gene alvo}})^{CT_{\text{alvo média}}}}$$

Os dados foram utilizados para comparar a quantidade relativa de mRNA para cada gene. As reações foram realizadas em triplicata, e repetidas três vezes.

3.4 Extração proteica e *Western blotting*

3.4.1 *Extração de proteínas:*

Foram cultivadas 5×10^5 células/poço em placas de 6 poços, as células foram submetidas ao tratamento com NaI (10^{-3} M) e doxíciclina, como o descrito anteriormente. Nos tempos determinados (48 e 72 horas) as células foram retiradas da placa de cultivo, em 1 ml de solução de PBS gelado contendo 10% de com o auxílio de um *scraper* e transferidas para tubos de 1,5 ml. Após a centrifugação (2000rpm) a solução de PBS foi removida e o *pellet* foi incubado com tampão de lise RIPA (20 mM de Tris pH 7.5, 150 mM de NaCl, 1% de Nonidet P-40, 0.5% de Sodium Deoxycholate, 1 mM de EDTA e 0.1% de SDS), contendo 10% Coquetel Inibidor de Protease (Invitrogen). Após a centrifugação a 14000 rpm, a 4 °C, o sobrenadante contendo o extrato de proteína total foi transferido para um tubo de 200 µl, e estocado a -70 °C. A concentração de proteínas em cada amostra foi quantificada pelo método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). O equivalente a 20 µg de cada proteína foi desnaturado em tampão de amostra 5x (Tris HCl 0.5 M, SDS 10%, Glycerol, β-mercaptoetanol) a 100 °C por 5 minutos e resfriadas rapidamente em gelo.

3.4.2 Western Blotting:

20 µg de cada amostra foi aplicada em gel de poliacrilamida 10% usando tampão de corrida (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS; pH= 8,3) em equipamento de eletroforese vertical Mini-Protean (Bio-Rad Laboratories). Em seguida as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (GE Healthcare) utilizando tampão de transferência *Towbin* (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina e 20% de Metanol; pH= 8,3) em equipamento de transferência úmida vertical Mini-Protean (Bio-Rad Laboratories). Após lavagem com solução TBS (20mM de Tris-HCl e 137 mM de NaCl; pH= 7,6), as membranas foram incubadas com solução de bloqueio (3% BSA em TBS) por 1 hora.

Para a detecção da proteína de interesse a membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpos primários policlonais específicos para NIS (cedidos gentilmente pela Dr Sissy M. Jhiang de Ohio State University, USA), TSHr (sc-13936, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), pRET (sc-20252R, Santa Cruz), BRAF (sc-166, Santa Cruz), ERK (sc-94, Santa Cruz), pERK (sc-7383, Santa Cruz) e α -tubulina (sc-5286, Santa Cruz) diluídos em 6ml de solução T-TBS (solução TBS contendo 0,1% de Tween 20) e 0,5% de leite desnatado (Nestlé, Brasil) à temperatura ambiente, sob agitação constante, durante 2 horas. Após 3 lavagens com solução T-TBS, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário específicos para coelho (NA934V; GE Healthcare) ou camundongo (NXA931; GE Healthcare) a temperatura ambiente, durante 1 hora. Os complexos proteína-anticorpo foram visualizados após a incubação da membrana com solução reveladora (50 mM de p-cumárico, 50 mM de luminol, 3,6% de H₂O₂ em 100 mM de Tris-HCl; pH= 8,8) por 1 minuto e exposição da membrana em filme de raio X (GE Healthcare). A análise quantitativa da expressão protéica das amostras é feita através das bandas específicas que ficam marcadas no filme exposto. A área total de cada banda foi quantificada usando o sistema de análise de imagem Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MA, EUA). Foram realizados três ensaios em duplicatas.

3.5 Estatística

Os resultados foram agrupados e expressos em média $\pm$ desvio padrão (Dawson-Saunders, 1994) por *Teste-T* e *Studen-Newman-Keuls test*, utilizando programa estatístico Instat ou Primer. Foram consideradas diferenças significativas para os testes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do tratamento com alta concentração de iodo na indução controlada do oncogene *RET/PTC3* em células normais de rato

O rearranjo *RET/PTC* é considerado um importante evento inicial no desenvolvimento de carcinomas papilífero de tiróide, assim a linhagem PCC13 com indução controlada do oncogene *RET/PTC* representa um excelente modelo para o estudo dos mecanismos iniciais de tumorigênese tiroidiana. Validamos a expressão do gene *RET/PTC3* nas células PTC3-5 tratadas com doxíciclina (DOX), e nas células tratadas com doxíciclina e 10^{-3} M de NaI (DOX-I). Na Figura 8, confirmamos a eficiência do sistema de indução em células PTC3-5 por RT-PCR. A indução do oncogene foi observada já em 24 horas de tratamento, e persiste em 48 e 72 horas. Observamos que o tratamento com alta dose de iodo nas células com indução do oncogene não modulou a expressão de *RET/PTC3* nestas células (Figura 8).

Figura 8 - Expressão do oncogene RET/PTC3 induzida pela doxíciclina em células PTC3-5 tratadas com alta concentração de iodo. Gel representativo mostrando os produtos amplificados por RT-PCR do gene RET/PTC3 e RPL19. As células PTC3-5 foram cultivadas na ausência (CTR), na presença de doxíciclina (DOX) e na presença da doxíciclina tratadas com 10^{-3} M NaI (DOX-I) por 24, 48 e 72 horas.

Na Figura 9 mostramos as alterações morfológicas, característica da indução de RET/PTC3 em 24, 48 e 72 horas. Apesar da indução do oncogene ser constatada em 24 horas de tratamento com a doxíciclina, as alterações na morfologia da célula são observadas apenas em 48 horas de tratamento. O tratamento com 10^{-3} M de NaI mantém o mesmo padrão morfológico das células com RET/PTC3 ativado. As células com indução do oncogene foram denominadas grupo RET/PTC3 e com indução do oncogene tratadas com excesso de iodo grupo RET/PTC3-I

Figura 9 - Expressão do oncogene RET/PTC3 induzida pela doxíciclina em células PTC3-5 tratadas com alta concentração de iodo.

Figura representativa mostrando as alterações morfológicas. As células PTC3-5 foram cultivadas na ausência (CTR), na presença de doxíciclina (DOX) e na presença da doxíciclina tratadas com 10^{-3} M NaI (DOX-I) por 24, 48 e 72 horas.

4.2 Proliferação e viabilidade de células tiroideas com indução do oncogene *RET/PTC3* em reposta ao tratamento com alta dose de iodo

Uma vez que observamos que a indução do oncogene induz mudanças morfológicas nas células PTC3-5 e que a alta concentração de iodo aparentemente não altera esse efeito, investigamos o efeito do tratamento com alta concentração de iodo na proliferação e morte de células com indução do oncogene RET/PTC3. As células foram divididas em grupo não tratado (CTR), grupo tratado com 10^{-3} M de NaI (Io), grupo com indução do oncogene RET/PTC3 (RET/PTC3) e grupo com indução do oncogene tratado com 10^{-3} M de NaI (RET/PTC3-I). Os grupos foram submetidos a contagem de células, ensaio de viabilidade celular teste MTT e coloração com azul de tripan.

Observamos no grupo de células tratadas apenas com 10^{-3} M de NaI (grupo Io) uma redução de até 28% no número de células em 48 horas (24h: $4,89 \pm 1,39$; 48h: $5,96 \pm 0,27$; 72h: $7,56 \pm 1,02$; 120h: $16,67 \pm 2$), que foi recuperada em 120 horas de tratamento. O grupo de células com indução do oncogene RET/PTC3 apresentou uma redução de até 48% (24h: $4,89 \pm 0,277$; 48h: $5 \pm 0,158$; 72h: $5,64 \pm 0,954$; 120: $8,67 \pm 0,813$), essa redução no número de células foi observada em até 120 horas. Enquanto que as células com indução de RET/PTC3 com concomitante tratamento de 10^{-3} M de NaI (RET/PTC3-I) apresentou uma redução no número de células de até 56% (24h: $3,78 \pm 0,4802$; 48h: $4,69 \pm 0,275$; 72h: $6,44 \pm 0,293$; 120h: $6,67 \pm 0,393$), que também foi observada a te o final do tratamento (Figura 10A).

Por teste MTT obtivemos resultados similares. O Grupo Io apresentou uma redução de até 39% em 48 horas de tratamento (24h: $0,277 \pm 0,009$; 48h: $0,308 \pm 0,013$; 72h: $0,431 \pm 0,018$; 120h: $0,685 \pm 0,056$). O grupo RET/PTC3 apresentou uma redução de até 63% (24h: $0,264 \pm 0,024$; 48h: $0,31 \pm 0,003$; 72h: $0,389 \pm 0,021$; 120h: $0,421 \pm 0,033$), observada em até 120 horas de tratamento. E o grupo RET/PTC3-I apresentou até 67% de redução na proliferação (24h: $0,236 \pm 0,05$; 48h: $0,258 \pm 0,0256$; 72h: $0,278 \pm 0,019$; 120h: $0,32 \pm 0,025$) (Figura 10B).

Utilizamos contagem das células que se coradas pelo azul de tripan, observamos um aumento no número de células mortas no grupo Io (24h: $0,44 \pm 0,37$; 48h: $1,11 \pm 0,77$; 72h: $2 \pm 0,67$; 120h: $5,11 \pm 1,02$). Um grande aumento no número de células coradas foi observado nas células RET/PTC3, esse efeito foi crescente com o passar dos dias de tratamento (24h: $0,89 \pm 0,67$; 48h: $2,67 \pm 0,67$; 72h: $4,44 \pm 0,92$; 120h: $8 \pm 0,94$) (Figura 10C). Interessantemente, o número de células mortas no grupo RET/PTC3-I (24h: $1,11 \pm 0,52$; 48h: $2,18 \pm 0,43$; 72h: $4,67 \pm 0,67$; 120h: $8,22 \pm 0,94$) não foi diferente das células do grupo RET/PTC3.

Figura 10 - Efeito do tratamento com alta dose de iodo na proliferação e viabilidade de células com a indução do oncogene *RET/PTC3*. Células PTC3-5 com indução do oncogene *RET/PTC3*, células CTR e Io, cultivadas em meio completo com e sem adição de NaI (10^{-3} M) e células *RET/PTC3* e *RET/PTC3-I*, cultivadas na presença de doxyciclina ($1\mu\text{g/ml}$) e NaI (10^{-3} M) durante 24, 48, 72 e 120h. Contagem de células, resultado correspondente a número de células $\times 10^4$ (A), Teste MTT, correspondente a absorbância (A_{595}) (B), Contagem de células coradas com o azul de tripan (número de células $\times 10^4$) (C). A linha basal refere-se aos resultados no tempo zero. Resultados representados em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos realizados em triplicatas. * $P < 0.05$ vs. CTR, ** $P < 0.05$ vs. *RET/PTC3*.

4.3 Efeito do tratamento com alta dose de iodo na via de sinalização MAPK de células com o oncogene *RET/PTC3* induzido

Uma vez que uma das características mais relatadas na literatura da indução do oncogene *RET/PTC3* é a ativação sustentada da cascata de sinalização MAPK. Investigamos se a alta concentração de iodo teria algum efeito sobre essa via de grande importância para o desenvolvimento tumoral tiroidiano. Para tanto, verificamos a expressão das proteínas pRET (75kda), Braf (80 kDa), Erk (30-45 kDa) e pErk (30-45 kDa) (Tabela 2 e Figura 11).

Observamos que o grupo Io, assim como grupo CTR não apresentou alteração em nenhum dos componentes da via MAPK. No entanto, o grupo *RET/PTC3* apresentou um grande aumento de pRet (98%), observamos também neste grupo o aumento de pErk (56%), sem alteração na expressão de Braf e Erk.

Constatamos que o grupo *RET/PTC3-I*, quando comparado ao grupo *RET/PTC3* apresentou em 48 horas uma redução na expressão de pRet (17%) e pErk (26%), que se manteve até 72 horas, sem alterar significativamente a expressão de Erk e Braf (Figura 11).

Tabela 2 - Resultados numéricos da análise da expressão de proteínas relacionadas com a via MAPK. Resultado da expressão proteica utilizando anticorpos específicos para pRet, Braf, Erk, e pErk. A análise foi feita utilizando o software Scion Image para quantificação das bandas. As médias obtidas referem-se a dois ensaios realizados independentemente em duplicatas.

Tempo (horas)		CTR	Io	RET/PTC3	RET/PTC3-I
48h	pRET	0,41±0,02	0,32±0,02	1,00±0,09	0,94±0,05
	BRAF	0,85±0,05	0,65±0,11	0,89±0,07	0,92±0,07
	Erk	2,09±0,03	2,10±0,07	2,12±0,09	2,34±0,07
	pErk	0,84±0,04	0,87±0,07	1,20±0,01	1,08±0,01
72h	pRET	0,41±0,02	0,37±0,02	0,83±0,04	0,49±0,03
	BRAF	0,95±0,05	0,85±0,04	0,97±0,06	0,84±0,11
	Erk	1,87±0,08	1,84±0,01	1,97±0,02	2,00±0,07
	pErk	0,75±0,05	0,77±0,05	1,17±0,01	0,86±0,06

Figura 11 - Efeito do tratamento com alta dose de iodo na via de sinalização MAPK de células com a indução do oncogene *RET/PTC3*. Gel representativo da expressão proteica de Braf, Erk, pErk and α -tubulina em células PTC3-5 cultivadas na presença de doxíciclina e de NaI (10^{-3} M) durante 48 e 72h por Western Blotting (A). Representação gráfica do ensaio semi-quantitativo da expressão protéica de pRET (70Kda), BRAF (85Kda), Erk (35-40 Kda), pERK (35-40 Kda) em relação a α -tubulina em 48 horas de tratamento nos grupos CTR, Io, RET/PTC3 e RET/PTC3-I (B). Representação gráfica do ensaio semi-quantitativo da expressão protéica de pRET (70Kda), BRAF (85Kda), Erk (35-40 Kda), pERK (35-40 Kda) em relação a α -tubulina em 72 horas de tratamento nos grupos CTR, Io, RET/PTC3 e RET/PTC3-I (C). Resultados representativos de dois experimentos realizados em duplicatas. * $P < 0.05$ vs. CTR, ** $P < 0.05$ vs. RET/PTC3.

4.4 Efeito do tratamento com alta dose de iodo na expressão de genes da via de sinalização TGF β em células com o oncogene *RET/PTC3* induzido

A expressão desregulada de fatores inibitórios à via de sinalização TGF β , vem sendo relatado em diversos tipos tumorais, inclusive em o carcinoma papilífero tireoidiano, que apresenta aumento da expressão de Smad7, relacionada ao escape do efeito inibitório de TGF β . Para investigar o efeito do tratamento com alta concentração de iodo na expressão de genes relacionados com via de sinalização TGF β durante a ativação oncogênica da tiróide, analisamos a expressão de mRNA de *TGF β* , *Smad4* e *Smad7* (Tabela 3 e Figura 12). O grupo Io apresentou aumento na expressão de todos os genes analisados em 48 horas (*TGF β* : 64%; *Smad4*: 38% e *Smad7*: 44%), com restabelecimento na expressão de *TGF β* e *Smad4* em 120 horas. As células com indução do oncogene apresentaram um aumento na expressão de *TGF β* e acentuada redução na expressão de *Smad4* (88%) (Figura 12A), observamos também um significativo aumento na expressão de genes inibitórios à via de sinalização TGF β como *Smad7* (97%).

Nas células tratadas com RET/PTC3-I observamos um grande aumento na expressão de *TGF β* em 48 horas (74%), que não se sustenta ao longo do tratamento. Já a expressão de *Smad4* estava aumentada em 24horas e perdurou durante todo o período de tratamento (24h: 48%; 48h: 49%; 72h: 8% e 120h: 55%) Em contrapartida, observamos uma redução acentuada na expressão de *Smad7* (42%), fator inibitório à via de sinalização TGF β .

Tabela 3 - Resultados numéricos da análise da expressão de genes inibitórios a via TGF β . Resultado da expressão de mRNA utilizando *primers* específicos para os genes selecionados por reação de PCR quantitativo. A análise foi feita utilizando a planilha Qgene. As médias obtidas referem-se a três ensaios realizados independentemente em triplicatas.

Tempo (horas)	<i>TGFβ</i>				<i>Smad4</i>				<i>Smad7</i>			
	CTR	I ₀	RET/PTC3	RET/PTC3-I	CTR	I ₀	RET/PTC3	RET/PTC3-I	CTR	I ₀	RET/PTC3	RET/PTC3-I
24h	0,62±0,04	1,71±0,12	3,48±0,07	1,54±0,15	0,163±0,015	0,203±0,016	0,020±0,003	0,039±0,002	0,09±0,01	0,13±0,02	0,18±0,01	0,13±0,01
48h	0,53±0,04	0,47±0,03	1,65±0,10	6,41±0,14	0,150±0,002	0,240±0,001	0,026±0,001	0,051±0,001	0,10±0,01	0,14±0,01	0,23±0,03	0,13±0,01
72h	0,53±0,01	0,42±0,06	1,01±0,06	0,95±0,08	0,160±0,002	0,209±0,002	0,019±0,002	0,020±0,003	0,11±0,01	0,13±0,01	0,15±0,01	0,13±0,01
120h	0,63±0,03	0,58±0,07	0,68±0,02	0,92±0,12	0,159±0,002	0,116±0,001	0,023±0,001	0,010±0,001	0,11±0,0	0,16±0,01	0,15±0,01	0,15±0,01

Figura 12 - Efeito do tratamento com alta dose de iodo na expressão de genes da via de sinalização TGFβ em células com a indução do oncogene *RET/PTC3*. Expressão gênica de TGFβ (A), Smad4 (B), Smad7 (C), normalizadas em relação ao gene referência (RPL19), em células PTC3-5 controle (CTR), tratadas com 10^{-3} M de NaI (Io), com indução do oncogene *RET/PTC3* (RET/PTC3) e com indução do oncogene concomitante ao tratamento com 10^{-3} M de NaI (RET/PTC3-I) durante 24, 48, 72h e 120horas. A linha basal refere-se à quantificação relativa da expressão de mRNA no tempo zero. Resultados de três experimentos realizados em triplicatas. * $P < 0.05$ vs. Co, ** $P < 0.05$ vs. RET/PTC3.

4.5 Efeito do tratamento com alta dose de iodo na expressão de genes específicos tiroidianos em células com o oncogene *RET/PTC3* induzido

Um dos eventos mais importantes, relatados durante a indução do oncogene *RET/PTC3* em células foliculares tiroidianas *in vitro* é a redução da expressão de genes específicos tiroidianos. Neste estudo investigamos o efeito do tratamento com alta concentração de iodo na expressão de genes relacionados com a função tiroidiana durante a ativação oncogênica da tiróide, analisamos a expressão de mRNA de *Nis*, *Tshr*, *Tg* e *Tpo* (Tabela 4 e Figura 13). As células do grupo Io, tratado com 10^{-3} M de NaI, apresentaram uma redução da expressão de todos os genes analisados já em 48 horas de tratamento (*Nis*: 13% ; *Tshr*: 26% ; *Tg*: 70% ; *Tpo*: 6%), com restabelecimento de todos os genes em 120 horas. A indução do oncogene *RET/PTC3*, reduziu a expressão de *Nis*, já em 24 horas de tratamento (14%), efeito observado até 120 horas, na qual chegou a uma redução de 81%. Um resultado semelhante foi observado na expressão de *Tshr* (43%) e *Tg* (88%) e *Tpo* (61%).

Nas células *RET/PTC3-I* a expressão de *Nis* apresentou um grande aumento após 48 horas (93%), este aumento se sustenta até 72 horas, porém diminuiu 33% em 120 horas de tratamento, quando comparada ao grupo *RET/PTC3* (Figura 13A). Resultados semelhantes, porém em menor intensidade, foram observados na expressão de mRNA de *Tshr* (24 horas: 23% de aumento e 72 horas: 17% de diminuição) e *Tpo* (48 horas: 16% de aumento e 72 horas: 13% de diminuição) como mostrado nas Figuras 12B e 12C. Como o observado na Figura 12D, a expressão *Tg* de diminui 80% em 48h, porém em 72 horas a diminuição se limita a 12% e em 120 horas de tratamento não há diferença quando comparado ao grupo tratado com DOX.

Tabela 4 - Resultados numéricos da análise da expressão de genes específicos tireoidianos. Resultado da expressão de mRNA utilizando *primers* específicos para os genes selecionados por reação de PCR quantitativo. A análise foi feita utilizando a planilha Qgene. As médias obtidas referem-se a três ensaios realizados independentemente em triplicatas.

	<i>Nis</i>				<i>Tshr</i>				<i>Tg</i>				<i>Tpo</i>			
Tempo (horas)	CTR	Io	RET/PTC3	RET/PTC3- I	CTR	Io	RET/PTC3	RET/PTC3- I	CTR	Io	RET/PTC3	RET/PTC3- I	CTR	Io	RET/PTC3	RET/PTC3- I
24h	4,28±0,22	4,28±0,29	3,69±0,16	3,63±0,26	1,5±0,061	1,5±0,09	1,3±0,064	1,6±0,06	17,60±0,66	13,00±0,85	14,80±0,62	13,80±0,14	1,5±0,06	1,5±0,09	1,3±0,06	1,6±0,06
48h	4,92±0,14	4,30±0,13	2,00±0,23	3,86±0,28	1,2±0,037	0,9±0,01	0,9±0,070	0,8±0,05	15,84±0,54	4,83±0,70	8,41±0,24	8,45±0,14	1,2±0,03	0,9±0,01	0,9±0,07	0,8±0,05
72h	5,49±0,16	3,90±0,25	1,37±0,11	2,00±0,08	1,5±0,10	1,1±0,09	0,9±0,080	0,8±0,04	19,60±1,13	13,80±0,79	5,02±0,22	2,37±0,21	1,5±0,10	1,1±0,09	0,9±0,08	0,8±0,04
120h	5,30±0,17	4,90±0,13	1,00±0,09	0,67±0,03	1,5±0,06	1,5±0,02	0,9±0,019	0,8±0,01	22,80±0,92	14,30±1,17	2,75±0,14	3,16±0,23	1,5±0,06	1,5±0,02	0,9±0,02	0,8±0,02

Figura 13 - Efeito do tratamento com alta dose de iodo na expressão de genes específicos tiroidianos em células com a indução do oncogene *RET/PTC*. Expressão gênica de Nis(A), Tshr (B), Tpo (C) and Tg (D) normalizadas em relação ao gene referência (RPL19), em células PTC3-5 controle (CTR), tratadas com 10^{-3} M de NaI (Io), com indução do oncogene *RET/PTC3* (RET/PTC3) e com indução do oncogene concomitante ao tratamento com 10^{-3} M de NaI (RET/PTC3-I) durante 24, 48, 72h e 120horas. A linha basal refere-se à quantificação relativa da expressão de mRNA no tempo Zero. Resultados de três experimentos realizados em triplicatas. * $P < 0.05$ vs. Co, ** $P < 0.05$ vs. RET/PTC3.

A observação dos níveis proteicos de Nis e Tshr comprovaram o observado na expressão gênica. Observamos que o grupo Io apresentou redução na expressão proteica de Nis e Tshr em 48 horas (Nis: 19%; Tshr: 23% e 27%), e essa expressão está reduzida também em 72 horas (Nis: 8%; Tshr: 31% e 19%). Da mesma forma, no grupo RET/PTC3, a indução do oncogene revelou, também, a redução da expressão proteica de Nis e Tshr em 48 (Nis: 17%; Tshr: 18% e 15%) e 72 horas (Nis: 20%; Tshr: 38% e 15%). Contudo, o grupo RET/PTC3-I apresentou a recuperação da expressão de ambas as proteínas em 48 horas (Nis: 19%; Tshr: 14% e 26%). Interessantemente no grupo RET/PTC3-I em 72 horas de tratamento há uma queda acentuada na expressão de Tshr (19% e 21%), enquanto Nis permanece aumentado (25%) (Figura 14).

Tabela 5 - Resultados numéricos da análise da expressão de proteínas específicas tiroidianas. Resultado da expressão proteica utilizando anticorpos específicos para Nis e Tshr. A análise foi feita utilizando o software Scion Image para quantificação das bandas. As médias obtidas referem-se a dois ensaios realizados independentemente em duplicatas.

Tempo (horas)		CTR	Io	RET/PTC3	RET/PTC3- I
48	Nis	0,82±0,08	0,66±0,01	0,68±0,03	0,81±0,05
	Tshr120(Kda)	0,65±0,02	0,50±0,04	0,54±0,00	0,61±0,06
	Tshr60(Kda)	0,83±0,03	0,60±0,01	0,70±0,03	0,88±0,05
72	Nis	1,73±0,01	1,59±0,01	1,39±0,11	1,73±0,04
	Tshr120(Kda)	1,52±0,02	1,04±0,02	0,94±0,07	0,76±0,02
	Tshr60(Kda)	1,63±0,04	1,32±0,04	1,38±0,05	0,09±0,03

Figura 14 - Efeito do tratamento com alta dose de iodo na expressão de proteínas específicas tiroidianas de células com a indução do oncogene *RET/PTC3*: Gel representativo da expressão proteica de Nis, Tshr e α -tubulin em células PTC3-5 com indução do oncogene *RET/PTC3* na presença de doxíciclina (1 μ g/ml) e NaI (10⁻³M) durante 48 e 72h por Western Blotting (A). Esquema quantitativo da expressão protéica de NIS (85Kda) e rTSH (120Kda e 60Kda) em relação a α -tubulina em 48 horas de tratamento nos grupos CTR, Io, RET/PTC3 e RET/PTC3-I (B). Representação gráfica da expressão protéica de NIS (85Kda) e rTSH (120Kda e 60Kda) em relação a α -tubulina em 72 horas de tratamento nos grupos CTR, Io, RET/PTC3 e RET/PTC3-I (B). Resultados representativos de três experimentos realizados em duplicatas. * $P < 0.05$ vs. CTR, ** $P < 0.05$ vs. RET/PTC3.

5 DISCUSSÃO

O iodo é um dos principais elementos de regulação tiroidiana, tanto seu alto quanto seu baixo consumo podem levar a severas alterações de produção hormonal tiroidiana e metabolismo da célula folicular (Nagataki S *et al.*, 1991; Farwell *et al.*, 2001). Os efeitos moleculares do consumo excessivo de iodo na população mundial, assim como o efeito do excesso de iodo na tumorigênese tiroidiana permanecem pouco esclarecidas.

Neste estudo mostramos o efeito do tratamento com alta dose de iodo na célula folicular tiroidiana durante a ativação oncogênica, utilizando um sistema de indução controlada do oncogene *RET/PTC3*, a linhagem PCC13 com indução controlada do oncogene *RET/PTC3* se torna uma poderosa ferramenta nos estudos dos mecanismos moleculares de tumorigênese tiroidiana. A via de sinalização MAPK clássica está diretamente relacionada ao desenvolvimento de carcinoma papilífero de tiróide, sendo as mutações nos genes RAS e BRAF e o rearranjo RET/PTC as alterações genéticas mais prevalentes no câncer tiroidiano (Grieco *et al.*, 1990; Namba *et al.*, 1990; Kimura *et al.*, 2003; Fusco *et al.*, 2007). A ativação do oncogene *RET/PTC3* altera os aspectos morfológicos das células foliculares tiroidianas *in vitro* (Wang *et al.*, 2003), sendo que o tratamento com alta dose de iodo mantém os níveis de expressão do oncogene *RET/PTC3* e não altera as mudanças morfológicas causadas pela indução do oncogene (Figura 8 e 9).

Na ausência da indução do oncogene notamos o efeito inibitório da alta dose iodo na proliferação de células normais foi transitório e observado no período entre 24 horas e 72 horas de tratamento, efeito vinculado ao efeito auto-regulatório do excesso de iodo. Porém, após 120 horas ocorre a recuperação da capacidade proliferativa, indicando estar vinculada ao escape do efeito auto-regulatório da célula tiroidiana, esse fenômeno foi observado por outros autores (Nagataki S *et al.*, 1991; Leoni, 2007).

Wang e colaboradores mostraram que a indução do oncogene *RET/PTC3* aumenta a síntese de DNA em célula folicular de rato, assim como está associado à morte celular por instabilidade genômica (Wang *et al.*, 2003). Constatamos que as células com ativação de *RET/PTC3* apresentam uma notória diminuição no número de células, com redução da viabilidade celular no decorrer do tempo de cultivo. Porém, esta é ainda mais acentuada nas células submetidas a tratamento com alta dose de iodo concomitantemente à ativação de *RET/PTC3*, entretanto, sem a alteração no número de células mortas, indicando que a redução da proliferação de células foliculares com ativação de *RET/PTC3* pela alta concentração de iodo não é influenciada pela morte celular (Figura 10).

A ativação sustentada da cascata de sinalização MAPK tem como consequência o aumento na fosforilação da proteína ERK, e aumento da transcrição de genes relacionados ao ciclo celular (Santoro *et al.*, 1992; Santoro *et al.*, 1993; Kimura *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2003; Frattini *et al.*, 2004). A ativação do oncogene *RET/PTC3* apesar de não promover o aumento da expressão proteica de Braf e Erk, induz o aumento da fosforilação de Erk e de Ret, e esse efeito foi revertido pelo tratamento com alta dose de iodo. O tratamento com alta dose de iodo atenua a fosforilação de Erk, mostrando que a ativação da via MAPK é regulada negativamente pela alta dose de iodo durante a ativação oncogênica em células foliculares tiroidianas. O tratamento com alta concentração de iodo ainda diminui a fosforilação de Ret, mesmo que sem alterar a expressão gênica de *RET/PTC3*, indicando que o iodo pode atenuar a ativação de RET. Interessante ressaltar que este efeito não é observado em célula folicular normal tratada com alta concentração de iodo (Figura 11).

Em célula folicular tiroidiana, estudos demonstraram tanto o aumento quanto a inibição da proliferação celular tem a participação de diferentes fatores de crescimento (Kimura *et al.*, 2001). A constatação de que níveis de TGF β aumentam sob tratamento com alta concentração de iodo em cultura de células FRTL-5 de tireóide é indicativa do envolvimento deste fator na inibição da proliferação destas células pelo tratamento com alta concentração de iodo (Cowin *et al.*, 1992; Yuasa *et*

al., 1992). Observamos um aumento significativo na expressão gênica de TGF β nas células PTC3-5 tratadas com alta concentração de iodo, sem a indução do oncogene RET/PTC3 (Figura 12).

Outros estudos mostraram que TGF β quando introduzido no meio de cultura de células foliculares normais de tiróide de diversos animais, induz uma potente inibição da proliferação celular (Morris *et al.*, 1988; Cirafici *et al.*, 1992; Pang *et al.*, 1992). No entanto, cultura primária derivada de carcinoma papilífero tratada com TGF β apresenta resposta variável na proliferação desde queda até mesmo estímulo da proliferação (Schulte *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2003). Nas células com indução do oncogene *RET/PTC3* observamos um aumento significativo na expressão gênica de TGF β , em contrapartida, uma grande redução na expressão de *Smad4*, importante membro da cascata de sinalização TGF β . Esses dados indicam que apesar do aumento da expressão de TGF β em células com ativação oncogênica, a via de sinalização correspondente poderia estar comprometida.

Recentemente, observamos um aumento na expressão de *Smad7*, inibidor da via TGF β , em carcinoma papilífero e carcinoma anaplásico de tiróide. Indicando que essa via pode estar sendo regulada negativamente durante a oncogênese da tiróide, e ainda que a inibição do efeito de TGF β está diretamente relacionada à patogênese de carcinomas de tiróide (Cerutti *et al.*, 2003). O tratamento com alta concentração de iodo aumenta a expressão de TGF β e *Smad4* e atenua a expressão dos genes inibitórios à via TGF β (*Smad7*), indicando que esta via é potencialmente restaurada pelo tratamento com alta concentração de iodo em células com indução de RET/PTC3 (Figura 12). Estudos recentes mostraram em células normais de tiróide com ativação de *K-Ras* o restabelecimento da via TGF β levou a redução da migração e aderência de células com potencial altamente maligno (Nicolussi *et al.*, 2006). Nossos dados indicam que a recuperação da expressão de TGF β , *Smad4* e a diminuição da expressão da *Smad* inibitória, *Smad7*, podem restabelecer a responsividade à via TGF β nas células com indução do oncogene RET/PTC3.

Evento este que poderia estar envolvido com a redução da proliferação das células tiroideas com indução de RET/PTC3 tratadas com alta concentração de iodo.

A célula folicular tiroidea é caracterizada pela expressão de genes específicos cujo produto está envolvido com a fisiologia normal tiroidea (Nis, Tshr, Tpo, Tg) (Kimura, 2007). Observamos que em 24 a 72 horas o efeito autoregulatório do iodo induz a redução transitória da expressão gênica de *Nis*, *Tshr*, *Tpo*, *Tg*, sendo que em 120 horas observa-se uma recuperação da expressão destes genes, esse evento é vinculado ao escape do efeito regulatório do iodo na célula folicular tiroidea (Corvilain *et al.*, 1988; Eng *et al.*, 2001).

Uma característica bem conhecida dos carcinomas de tireóide é a perda da expressão de genes específicos da função tiroidea (*Nis*, *Tshr*, *Tpo* e *Tg*), muitos autores relatam que a ativação de RET/PTC3 e BRAF^{V600E} em células foliculares tiroideas reduz a expressão desses genes tiroideos (Santoro *et al.*, 1993; Knauf *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007).

Nis é indispensável no transporte do iodeto para o interior do tireócito, é um dos principais marcadores de diferenciação da célula folicular tiroidea (Dohan, Carrasco, 2003). A perda da expressão de Nis é um evento bem relatado durante a tumorigênese tiroidea (Santoro *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2003; Mitsutake *et al.*, 2006). Observamos que a indução do oncogene *RET/PTC3* reduz drasticamente a expressão de mRNA e proteína Nis. Interessantemente, o tratamento com alta concentração de iodo simultâneo à ativação do oncogene *RET/PTC3* leva ao aumento transitório tanto da expressão mRNA quanto da expressão proteica de Nis (Figura 13 e 14), indicando a manutenção do transporte de iodo para dentro da célula folicular durante esse evento.

A regulação da expressão de Nis depende da integridade da via de sinalização Tsh-Tshr-cAMP (Kogai *et al.*, 1997). O Tsh é o principal hormônio regulador da função tiroidea, sua interação com seu receptor (Tshr), ativa a adenil ciclase as vias de sinalização por AMPc (Vassart *et al.*, 1992). Observamos que a ativação de *RET/PTC3* reduz a expressão de mRNA de *Tshr*. No entanto, esse efeito

pode ser contornado pelo tratamento com alta dose de iodo, transitoriamente em 72 horas, tanto na expressão de mRNA quanto na expressão proteica de Tshr, que está diminuída em 72 horas de tratamento (Figura 13 e 14). O iodo estaria mantendo a resposta ao efeito do Tsh durante a ativação precoce do oncogene *RET/PTC3*. Apesar do aumento na expressão gênica de rTSH, observamos a redução na proliferação das células tratadas com alta dose de iodo. Esses dados indicam que mecanismos independentes de TSH-TSHr-AMPC podem influenciar no efeito do iodo na ativação oncogênica tireoidiana.

Após a internalização o iodo é levado à membrana apical celular, a organificação do iodo é controlada pela enzima Tpo, que atua pela via catalítica dependente de H₂O₂ (Alexander, 1977). A etapa de organificação do iodo é crucial na síntese hormonal tireoidiana e fundamental para o funcionamento da glândula tireóide (Vaisman *et al.*, 2004). Devido a perda de expressão em tecido tumoral tireoidiano, *Tpo* é um marcador da transformação maligna tireoidiana (Matsuo *et al.*, 2004). A indução do oncogene *RET/PTC3* diminuiu a expressão de mRNA de *Tpo*, um evento observado anteriormente por outros autores (Santoro *et al.*, 1993). De maneira geral o tratamento com alta dose de iodo mantém os níveis da expressão de mRNA de *Tpo*, sugerindo que o iodo preserva a diferenciação da célula folicular tireoidiana durante a ativação oncogênica (Figura 13).

Na molécula de Tg estão os principais componentes dos hormônios tireoidianos. Apesar de Tg não ser um potencial marcador tumorigênico (Pacini, 2002). Observamos que a ativação de *RET/PTC3* reduz a expressão de mRNA de *Tg*, esse evento foi relatado por outros autores (Knauf *et al.*, 2003). O tratamento com iodo, ao contrário do observado na expressão dos outros genes analisados (*Nis*, *Tshr* e *Tpo*), diminui ainda mais a expressão de *Tg* (Figura 13).

O excesso de iodo apresenta efeitos atenuantes na perda da expressão dos genes essenciais para a manutenção da fisiologia tireoidiana, que não se sustentam ao longo do tratamento, indicando um atraso transitório na perda da função tireoidiana durante a ativação do oncogene *RET/PTC3*, além disso, mostramos que o iodo também pode agir como inibidor da via MAPK, inibindo a ativação de RET e

resultando na redução de pErk. Recentemente, um estudo com a droga U0126, inibidora da via MAPK mostra que além de reduzir a expressão de pErk, ocorre a recuperação da expressão de genes tiroidianos em PTC, entre os quais *Tshr* e *Nis* (Liu *et al.*, 2007). Estes efeitos são semelhantes aos observados em células com ativação de RET/PTC3 tratadas com alta dose de iodo.

O tratamento agudo com alta dose de iodo é uma das medidas profiláticas utilizadas em habitantes de regiões expostas à radiação ionizante, para impedir a entrada do iodo radioativo (Nauman *et al.*, 1993). Existem evidências de um efeito protetor do iodo a longo prazo, pois estudos epidemiológicos em regiões expostas a radiação indicam que crianças habitantes de regiões com dieta suficiente ou de excesso de iodo, apresentam menor incidência de PTC em relação a habitantes de regiões deficientes em iodo (Cardis *et al.*, 2005). Desta forma, o papel do excesso de iodo parece se estender além do efeito bloqueador da entrada de iodo radioativo, extravasando para uma regulação das vias clássicas MAPK e TGF β , de grande importância na regulação da função tiroidiana.

6 CONCLUSÃO

No modelo de indução do oncogene RET/PTC3 em células foliculares tiroideanas, o tratamento com alta concentração de iodo:

- inibe a proliferação,
- reduz a expressão de efetores da via MAPK,
- recupera a expressão de genes estimulatórios à via inibitória de TGF β
- restaura a expressão de genes específicos tiroideanos.

O iodo em alta dose induz a quiescência transiente e a refratariedade aos efeitos moleculares da ativação do oncogene RET/PTC3 em células foliculares tiroideanas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Alexander NM. Purification of bovine thyroid peroxidase. *Endocrinology*. 1977; 100 (6): 1610-20.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, *et al*. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25 (17): 3389-402.

Arighi E, Borrello MG, Sariola H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005; 16 (4-5): 441-67.

Becks GP, Eggo MC, Burrow GN. Organic iodine inhibits deoxyribonucleic acid synthesis and growth in FRTL-5 thyroid cells. *Endocrinology*. 1988; 123 (1): 545-51.

Braverman LE, Ingbar SH. Changes in Thyroidal Function During Adaptation to Large Doses of Iodide. *J Clin Invest*. 1963; 42: 1216-31.

Bravo SB, Pampin S, Cameselle-Teijeiro J, Carneiro C, Dominguez F, Barreiro F, *et al*. TGF-beta-induced apoptosis in human thyrocytes is mediated by p27kip1 reduction and is overridden in neoplastic thyrocytes by NF-kappaB activation. *Oncogene*. 2003; 22 (49): 7819-30.

Cardis E, Kesminiene A, Ivanov V, Malakhova I, Shibata Y, Khrouch V, *et al*. Risk of thyroid cancer after exposure to ¹³¹I in childhood. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97 (10): 724-32.

Cerutti JM, Ebina KN, Matsuo SE, Martins L, Maciel RM, Kimura ET. Expression of Smad4 and Smad7 in human thyroid follicular carcinoma cell lines. *J Endocrinol Invest*. 2003; 26 (6): 516-21.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162 (1): 156-9.

Cirafici AM, Pepe S, Mincione G, Esposito D, Colletta G. TGF beta inhibits rat thyroid cell proliferation without alterations in the expression of TSH-induced cell cycle-related genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 187 (1): 225-33.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. c2003 – [updated 2005 June 15; cited 2006 May 16]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Corvilain B, Van Sande J, Dumont JE. Inhibition by iodide of iodide binding to proteins: the "Wolff-Chaikoff" effect is caused by inhibition of H₂O₂ generation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 154 (3): 1287-92.

Cowin AJ, Davis JR, Bidey SP. Transforming growth factor-beta 1 production in porcine thyroid follicular cells: regulation by intrathyroidal organic iodine. *J Mol Endocrinol*. 1992; 9 (3): 197-205.

Dawson-Saunders B, Trapp RG. *Basis & Clinical Biostatistic*. Norwalk: Appleton & Lange; 1994.

Dayem M, Navarro V, Marsault R, Darcourt J, Lindenthal S, Pourcher T. From the molecular characterization of iodide transporters to the prevention of radioactive iodide exposure. *Biochimie*. 2006; 88 (11): 1793-806.

DeLellis RAL, R. V.; Heitz, P. U.; Eng, C. *WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. Lyon: IARC Press; 2004.

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007; 26 (22): 3279-90.

Dohan O, Carrasco N. Advances in Na(+)/I(-) symporter (NIS) research in the thyroid and beyond. *Mol Cell Endocrinol*. 2003; 213 (1): 59-70.

Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, *et al*. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev*. 2003; 24 (1): 48-77.

Duarte GC, Tomimori EK, Boriolli RA, Ferreira JE, Catarino RM, Camargo RYA *et al*. Avaliação ultra-sonográfica da tireóide e determinação da iodúria em escolares de diferentes regiões do Estado de São Paulo. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004; 48 (6): 842-848.

Dugrillon A. Iodolactones and iodoaldehydes- mediators of iodine in thyroid autoregulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1996; 104 Suppl 4: 41-5.

Dumont JE, Lamy F, Roger P, Maenhaut C. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol Rev*. 1992; 72 (3): 667-97.

Eng PH, Cardona GR, Fang SL, Previti M, Alex S, Carrasco N, *et al*. Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology*. 1999; 140 (8): 3404-10.

Eng PH, Cardona GR, Previti MC, Chin WW, Braverman LE. Regulation of the sodium iodide symporter by iodide in FRTL-5 cells. *Eur J Endocrinol*. 2001; 144 (2): 139-44.

Fagin JA. How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy. *J Endocrinol*. 2004; 183 (2): 249-56.

Fagin JA. Genetics of papillary thyroid cancer initiation: implications for therapy. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2005; 116: 259-69; discussion 269-71.

Farwell AP, Braverman LE. Thyroid and antithyroid drugs. In: Hardman JG & Limbird LE. *The pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw - Hill; 2001. p. 1563-96

Fiore A, Ricarte-Filho J, Martins D, Kimura ET. Smurfs E3 Ligases are Highly Expressed in Papillary Thyroid Carcinoma. In: 78th American Thyroid Association Meeting. New York: Thyroid; 2007.

Frattini M, Ferrario C, Bressan P, Balestra D, De Cecco L, Mondellini P, *et al*. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene*. 2004; 23 (44): 7436-40.

Fusco A, Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Pilotti S, Pierotti MA, *et al*. A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature*. 1987; 328 (6126): 170-2.

Fusco A, Santoro M. 20 years of RET/PTC in thyroid cancer: clinico-pathological correlations. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007; 51 (5): 731-5.

Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W , Bujard H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*. 1995; 268 (5218): 1766-9.

Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, *et al*. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell*. 1990; 60 (4): 557-63.

Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997; 390 (6659): 465-71.

Kazakov VS, Demidchik EP, Astakhova LN. Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature*. 1992; 359 (6390): 21.

Kimura ET. Glândula Tiróide. In: Aires MM. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.1; 2007. Glândula Tiróide, p.991.

Kimura ET, Kopp P, Zbaeren J, Asmis LM, Ruchti C, Maciel RM, *et al.* Expression of transforming growth factor beta1, beta2, and beta3 in multinodular goiters and differentiated thyroid carcinomas: a comparative study. *Thyroid*. 1999; 9 (2): 119-25.

Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 2003; 63 (7): 1454-7.

Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, Fusco A, Dumont JE, Roger PP. Regulation of Thyroid Cell Proliferation by TSH and Other Factors: A Critical Evaluation of *in Vitro* Models. *Endocr Rev*. 2001; 22(5):631–56

Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik EP, Rabes HM. High prevalence of RET rearrangement in thyroid tumors of children from Belarus after the Chernobyl reactor accident. *Oncogene*. 1995; 11 (12): 2459-67.

Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik EP, Rabes HM. A new form of RET rearrangement in thyroid carcinomas of children after the Chernobyl reactor accident. *Oncogene*. 1996; 13 (5): 1099-1102.

Knauf JA, Kuroda H, Basu S, Fagin JA. RET/PTC-induced dedifferentiation of thyroid cells is mediated through Y1062 signaling through SHC-RAS-MAP kinase. *Oncogene*. 2003; 22 (28): 4406-12.

Knobel M, Medeiros-Neto G. Relevance of iodine intake as a reputed predisposing factor for thyroid cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007; 51 (5): 701-12.

Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A, Kawaguchi A, Onaya T. Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology*. 1997; 138 (6): 2227-32.

Langer R, Burzler C, Bechtner G, Gartner R. Influence of iodide and iodolactones on thyroid apoptosis. Evidence that apoptosis induced by iodide is mediated by iodolactones in intact porcine thyroid follicles. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2003; 111 (6): 325-9.

Larsen PR, Davies TF, Hay ID. Thyroid. In: Larsen PR, Davies TF, Hay ID, Williams Textbook of Endocrinology. Philadelphia: W.B. Saunders; 1998. p. 389-515

Leoni S. Perfil da expressão diferencial de genes de célula folicular tireoidiana PCCl3 tratada com excesso de iodo [tese de doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

Leoni SG, Galante PA, Ricarte-Filho JC, Kimura ET. Differential gene expression analysis of iodide-treated rat thyroid follicular cell line PCCl3. *Genomics*. 2008; 91 (4): 356-66.

Liu D, Hu S, Hou P, Jiang D, Condouris S, Xing M. Suppression of BRAF/MEK/MAP kinase pathway restores expression of iodide-metabolizing genes in thyroid cells expressing the V⁶⁰⁰E *BRAF* mutant. *Clin Cancer Res*. 2007; 13 (4): 1341-9.

Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. 2000; 103 (2): 295-309.

Matsuo SE, Leoni SG, Colquhoun A, Kimura ET. Transforming growth factor-beta1 and activin A generate antiproliferative signaling in thyroid cancer cells. *J Endocrinol*. 2006; 190 (1): 141-50.

Matsuo SE, Martins L, Leoni SG, Hajjar D, Ricarte-Filho JCM, Ebina KN, *et al*. Marcadores biológicos de tumores tireoidianos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004; 48: 114-25.

Medeiros-Neto G. The salt ionization program in Brazil: a medical and political conundrum. *IDD News*. 2000; 16 (2): 31-2.

Melillo RM, Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Cirafici AM, Salvatore G, *et al*. The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest*. 2005; 115 (4): 1068-81.

Mitsutake N, Miyagishi M, Mitsutake S, Akeno N, Mesa C, Jr., Knauf JA, *et al*. BRAF mediates RET/PTC-induced mitogen-activated protein kinase activation in thyroid cells: functional support for requirement of the RET/PTC-RAS-BRAF pathway in papillary thyroid carcinogenesis. *Endocrinology*. 2006; 147 (2): 1014-9.

Morris JC, Ranganathan G, Hay ID, Nelson RE, Jiang NS. The effects of transforming growth factor-beta on growth and differentiation of the continuous rat thyroid follicular cell line, FRTL-5. *Endocrinology*. 1988; 123 (3): 1385-94.

Morton ME, Chaikoff IL, Rosenfeld S. Inhibiting effect of inorganic iodide on the formation in vitro of thyroxine and diiodotyrosine by surviving thyroid tissue. *J Biol Chem*. 1944; 154: 381-87.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65 (1-2): 55-63.

Nagataki S, Yokoyama N. Autoregulation: effects of iodide. In: Braverman LE, Utiger RD. *Werner and Ingbar's: The thyroid: a fundamental and clinical text*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1991. p.241-247.

Namba H, Rubin SA, Fagin JA. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol*. 1990; 4: 1474-79.

Nauman J, Wolff J. Iodide prophylaxis in Poland after the Chernobyl reactor accident: benefits and risks. *Am J Med*. 1993; 94 (5): 524-32.

Nicolussi A, D'Inzeo S, Gismondi A, Coppa A. Reduction of invasive potential in K-ras-transformed thyroid cells by restoring of TGF-beta pathway. *Clin Exp Metastasis*. 2006; 23 (5-6): 237-48.

Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H, Fagin JA. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Res*. 1997; 57 (9): 1690-4.

Pacini F. Follow-up of differentiated thyroid cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002; 29 Suppl 2: S492-6.

Pang XP, Park M, Hershman JM. Transforming growth factor-beta blocks protein kinase-A-mediated iodide transport and protein kinase-C-mediated DNA synthesis in FRTL-5 rat thyroid cells. *Endocrinology*. 1992; 131 (1): 45-50.

Santoro M, Carlomagno F, Hay ID, Herrmann MA, Grieco M, Melillo R, *et al*. Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. *J Clin Invest*. 1992; 89 (5): 1517-22.

Santoro M, Melillo RM, Grieco M, Berlingieri MT, Vecchio G, Fusco A. The TRK and RET tyrosine kinase oncogenes cooperate with ras in the neoplastic transformation of a rat thyroid epithelial cell line. *Cell Growth Differ*. 1993; 4 (2): 77-84.

Schulte KM, Jonas C, Krebs R, Roher HD. Activin A and activin receptors in thyroid cancer. *Thyroid*. 2001; 11 (1): 3-14.

Shakhtarin VV, Tsyb AF, Stepanenko VF, Orlov MY, Kopecky KJ, Davis S. Iodine deficiency, radiation dose, and the risk of thyroid cancer among children and adolescents in the Bryansk region of Russia following the Chernobyl power station accident. *Int J Epidemiol*. 2003; 32 (4): 584-91.

Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, *et al*. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene*. 2003; 22 (29): 4578-80.

Tramontano D, Veneziani BM, Lombardi A, Villone G, Ingbar SH. Iodine inhibits the proliferation of rat thyroid cells in culture. *Endocrinology*. 1989; 125 (2): 984-92.

Uyttersprot N, Pelgrims N, Carrasco N, Gervy C, Maenhaut C, Dumont JE, *et al.* Moderate doses of iodide in vivo inhibit cell proliferation and the expression of thyroperoxidase and Na⁺/I⁻ symporter mRNAs in dog thyroid. *Mol Cell Endocrinol.* 1997; 131 (2): 195-203.

Vaisman M, Rosenthal D, Carvalho DP. Enzimas envolvidas na organificação tireoideana do iodo. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004; 48 (1): 9-15.

Vassart G, Dumont JE. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev.* 1992; 13 (3): 596-611.

Wang J, Knauf JA, Basu S, Puxeddu E, Kuroda H, Santoro M, *et al.* Conditional expression of RET/PTC induces a weak oncogenic drive in thyroid PCCL3 cells and inhibits thyrotropin action at multiple levels. *Mol Endocrinol.* 2003; 17 (7): 1425-36.

Wolff J, Chaikoff, IL, Goldberg, RC, Meier, J.R. The temporary nature of the inhibitory action of excess iodide on organic iodine synthesis in the normal thyroid. *Endocrinology.* 1949; 45: 504-13.

Yuasa R, Eggo MC, Meinkoth J, Dillmann WH, Burrow GN. Iodide induces transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) mRNA in sheep thyroid cells. *Thyroid.* 1992; 2 (2): 141-5.