

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**CLÉO OTAVIANO MESA JÚNIOR**

**PERFIL DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DECORRENTE DA  
ATIVAÇÃO CONDICIONAL DE RET/PTC3 E BRAF<sup>V600E</sup>  
EM CÉLULAS PCCL3 DE TIREÓIDE DE RATO**

**CURITIBA**

**2010**

**CLÉO OTAVIANO MESA JÚNIOR**

**PERFIL DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DECORRENTE DA  
ATIVÇÃO CONDICIONAL DE RET/PTC3 E BRAF<sup>V600E</sup>  
EM CÉLULAS PCCL3 DE TIREÓIDE DE RATO**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, ao Curso de Pos-graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Hans Graf  
Co-orientador: Dr. James A. Fagin

**CURITIBA**

**2010**

## AGRADECIMENTOS

Em 2003 o Dr. César Boguszewski e o Dr. Hans Graf me procuraram a respeito de uma possibilidade de ficar um tempo fora do Brasil em um laboratório de pesquisa em biologia molecular. A Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM), capitaneada pela Dr.<sup>a</sup> Valéria Guimarães havia feito um acordo com a Endocrine Society para enviar cinco jovens endocrinologistas brasileiros para ficar 2 ou 3 anos nos EUA, em laboratórios de referência, aprendendo técnicas atuais de pesquisa básica direcionada a endocrinologia para depois implantá-las em seus respectivos centros de origem. A SBEM avaliaria os currículos e selecionaria os candidatos e a Endocrine Society financiaria a viagem deles até Filadélfia para o encontro anual da Endocrine Society para as entrevistas com os pesquisadores principais dos laboratórios.

Com o estímulo do Dr. Hans e do Dr César enviei meu currículo, descrente da possibilidade de ser selecionado, já que concorreria com endocrinologistas de todo o Brasil. Na verdade não fui de início. Foram separados 6 currículos para em seguida excluir um deles e o meu foi o excluído. Entretanto, o Dr. César, que participava da banca de seleção, interveio e o grupo decidiu solicitar à Endocrine Society uma vaga adicional para que os 6 candidatos pudessem participar do programa, o que deu certo.

Foi assim que iniciou a história deste projeto de doutorado. Neste mesmo ano nasceu meu primeiro filho e eu estava prestes a defender minha dissertação de mestrado, na mesma pós-graduação da UFPR e também orientada pelo Dr. Hans Graf, o grande incentivador de minha vida acadêmica. Em meio a este turbilhão, o Dr. Hans me ajudou a escolher os possíveis pesquisadores principais para as entrevistas e iniciaram-se as trocas de email até o congresso na Filadélfia. Quando me encontrei com o Dr. James Fagin, sua objetividade e simplicidade, além de sua imensa produção científica e das referências da Dr.<sup>a</sup> Edna Kimura, recém-chegada de seu laboratório, foram suficientes para minha decisão. O laboratório do Dr James A. Fagin ficava na *University of Cincinnati, Division of Endocrinology*, em um prédio chamado: *The Vontz Center for Molecular Studies*. Seis meses após chegávamos a Cincinnati OH, eu, minha esposa e meu filho de 9 meses de idade.

Todos que passaram por isto sabem das imensas dificuldades. Estar em um país estrangeiro com uma criança pequena, iniciando um trabalho totalmente novo foram os grandes desafios que encontramos. Entretanto, olhando para trás

vejo que tudo deu tão certo que nem acredito. Cláudia, minha esposa, logo conseguiu uma posição em um laboratório do Cincinnati Children's Hospital. Leonardo, meu filho, demorou um pouco mas logo se adaptou. Eu tive a grande sorte de ter como chefe o Dr. James Fagin, além de Jeff Knauf e Norisato Mitsutake, dois pesquisadores espetaculares que tiveram a paciência de me ensinar tudo, desde o princípio, sobre como trabalhar em uma bancada de laboratório. Em momentos difíceis, os colegas de laboratório, minha família e mesmos os amigos do Brasil como Dr. Hans Graf e Dr.<sup>a</sup> Edna Kimura sempre me tranquilizaram e ajudaram na decisão de não desistir. Neste período participei de dois projetos que já estavam em andamento com Norisato Mitsutake (primeiro autor). Ambos relacionados a validação de dois dos modelos experimentais que usei em meu projeto principal, as células PC-BRAF<sup>V600E</sup> e as células PTC3-BRAF<sup>RNAi</sup>. Os dois artigos relacionados estão anexados ao final da tese.

Terminados os 2 anos, retornamos ao Brasil com meu projeto principal já executado e prestes a ser submetido para publicação e uma vontade de transformá-lo em tese de doutorado. A Pós-Graduação em Medicina Interna através do Dr. José Gastão e do Dr. César aceitou os projetos, meu e de minha esposa. Entenderam que apesar deles não terem sido executados em nossa universidade, nosso retorno à UFPR tinha ambições maiores como estabelecer novas linhas de pesquisa e uma interação mais forte entre a parte clínica e básica.

Espero ser esta defesa de tese não o término de uma etapa, mas o início de um projeto maior e junto com os colegas da endocrinologia, Dr. Hans Graf e Dr.<sup>a</sup> Gisah A. de Carvalho retirar o Laboratório de Endocrinologia Molecular do SEMPR (Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR) do papel.

Estamos quase lá!

## RESUMO

Carcinomas papilíferos de tireóide (CPT) estão associados a mutações em genes que codificam proteínas da via de sinalização intracelular da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) como os receptores tirosinoquinase RET e NTRK e as proteínas sinalizadoras RAS e BRAF. Este dado é uma forte evidência da importância de mutações em componentes da via MAPK para a transformação em CPT. Apesar de CPTs com mutações *RET/PTC* ou *BRAF* apresentarem semelhanças histológicas, a presença da mutação *BRAF* está associada a extensão extratireoidiana e pode dar origem a carcinomas pouco diferenciados. Com o objetivo de identificar vias ou grupo de genes que possam justificar as diferenças fenotípicas observadas em carcinomas humanos, examinamos o padrão de expressão gênica após a ativação destas oncoproteínas em células PCCL3 de tireóide de rato. DNAs complementares (cDNA), provenientes de células tratadas ou não com doxaciclina foram hibridizados para indução de expressão de BRAF<sup>V600E</sup>, RET/PTC3 ou RET/PTC3 com inativação do BRAF pela técnica de interferência do RNA, com placas de microarranjo compostas com uma biblioteca de 27.342 oligonucleotídeos (*rat 70-mer oligonucleotide library*). Entre os genes induzidos pelo RET/PTC3, 2552 não precisaram do BRAF já que foram regulados de forma similar pelo RET/PTC3 com ou sem a inativação do BRAF e não pelo BRAF<sup>V600E</sup>. Genes associados à resposta imune e ao interferon gama estavam presentes em grande quantidade neste grupo. Aproximadamente 25% dos genes regulados pelo RET/PTC3 foram dependentes do BRAF já que se modificaram pela expressão de RET/PTC3 e BRAF<sup>V600E</sup> mas não por células expressando RET/PTC3 com a inativação do BRAF. Um grupamento de genes que codificam componentes da via mitocondrial de transporte de elétrons estava inibido neste grupo, potencialmente envolvido com a viabilidade celular. As metaloproteinases foram preferencialmente induzidas pelo BRAF, particularmente metaloproteinase 3 (MMP3), MMP9 e MMP13. A ativação condicional do BRAF<sup>V600E</sup> foi associada com um importante aumento da invasão celular através do Matrigel em comparação com células que expressam RET/PTC3. A indução das MMPs preferencialmente por BRAF poderia explicar em parte o comportamento mais agressivo dos CPT associados a mutação do *BRAF*.

## ABSTRACT

Papillary thyroid cancers (PTC) are associated with non-overlapping mutations of genes coding for MAP kinase signaling proteins, i.e. the TK receptors RET or NTRK, and the signaling proteins RAS and BRAF. This lack of overlap provides compelling genetic evidence for a requirement of mutation of MAPK signaling components for transformation to PTC. Although PTCs with *BRAF* and *RET/PTC* mutations partially overlap in histological appearance, the former is more prone to extrathyroidal invasion and can give rise to undifferentiated carcinomas. We examined the pattern of gene expression after activation of these oncoproteins in rat thyroid PCCL3 cells, with the goal of identifying pathways or gene subsets that could account for the phenotypic differences observed in human cancers. Complementary DNA from PC-BRAF<sup>V600E</sup>, PTC3-5 or PTC3-BRAF<sup>RNAi</sup> cells treated with or without doxycycline to induce expression of BRAF<sup>V600E</sup>, RET/PTC3 or RET/PTC3 with siRNA-mediated knock down of BRAF, respectively, were hybridized to slides arrayed with a rat 70-mer oligonucleotide library consisting of 27,342 oligonucleotides. Among the RET/PTC3-induced genes, 2552 did not require BRAF as they changed similarly in PTC3-5 and PTC3-BRAF<sup>RNAi</sup> but not in PC-BRAF<sup>V600E</sup> cells. Immune response and interferon-related genes were highly represented in this group. About 25% of RET/PTC3-regulated genes were BRAF-dependent as they were similarly modified in PTC3-5 and PC-BRAF<sup>V600E</sup>, but not in PTC3-BRAF<sup>RNAi</sup> cells. A gene cluster coding for components of the mitochondrial electron transport chain pathway was down regulated in this group, potentially altering regulation of cell viability/apoptosis. Metalloproteinases were preferentially induced by BRAF, particularly MMP3, 9 and 13. Overexpression of these MMPs in PC-BRAF<sup>V600E</sup> cells was confirmed by Western blotting and zymography. Accordingly, conditional expression of BRAF was associated with markedly increased invasion into Matrigel as compared to cells expressing RET/PTC3. The preferential induction of MMPs by BRAF could explain in part the more invasive behavior of thyroid cancers with *BRAF* mutations.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	GERAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES COM ATIVAÇÃO DE GENES INDUZIDAS POR DOXACICLINA.....	23
FIGURA 2 -	WESTERN BLOTTING DE CÉLULAS PTC3-5, PC-BRAF <sup>V600E</sup> E PTC3-BRAF <sup>RNAi</sup> PARA TESTE DE EXPRESSÃO DE RET/PTC3 E BRAF COM OU SEM DOXACICLINA .....	24
FIGURA 3-	DESENHO ESQUEMÁTICO CORRESPONDENTE AS HIBRIDIZAÇÕES REALIZADAS NO ESTUDO DE MICROARRANJO .....	26
FIGURA 4 -	TRANSCRITOS INIBIDOS OU ESTIMULADOS EM PELO MENOS UM DOS TEMPOS APÓS TRATAMENTO COM DOXACICLINA NA TRÊS LINHAGENS CELULARES .....	32
FIGURA 5 -	AGRUPAMENTOS DE GENES CO-EXPRESSOS CRIADOS A PARTIR DE TRANSCRITOS QUE SE MODIFICARAM SIGNIFICATIVAMENTE APÓS ESTÍMULO COM DOXACICLINA .....	33
FIGURA 6 -	WESTERN BLOTS DOS MEIOS DE CULTURA CONDICIONADOS DE CÉLULAS PTC3 E BRAF <sup>V600E</sup> NOS DIAS DE TRATAMENTO DE DOXACICLINA INDICADO, NA AUSÊNCIA DE TSH .....	38
FIGURA 7 -	ZIMOGRAFOS DE GELATINA (ACIMA) E CASEÍNA (ABAIXO) DOS MEIOS DE CULTURA CONDICIONADOS DE CÉLULAR PTC3-5 E BRAF <sup>V600E</sup> NOS DIAS DE TRATAMENTO DE DOXACICLINA INDICADOS, NA AUSÊNCIA DE TSH .....	38
FIGURA 8 -	RET/PTC3 E BRAF <sup>V600E</sup> INDUZEM NÍVEIS DE MIGRAÇÃO CELULAR SIMILARES EM CÉLULAS PCCL3 APÓS TRATAMENTO COM DOXACICLINA .....	39
GRÁFICO 1 -	EXPRESSÃO RELATIVA DOS RNAm DAS MMPs POR RT-PCR NAS CÉLULAS PTC 3-5 E PC-BRAF <sup>V600E</sup> .....	36
GRÁFICO 2 -	INVASÃO PREFERENCIAL INDUZIDA POR DOXACICLINA EM CÉLULAS BRAF <sup>V600E</sup> COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO QUIMIOATRAATIVO SDF 1 $\alpha$ EM CÂMARAS DE CULTURA.....	40
GRÁFICO 3 -	INVASÃO INDUZIDA POR BRAF É INIBIDA POR UM PAN INIBIDOR DE MMPs MAS NÃO POR UM INIBIDOR ESPECÍFICO DE MMP13.....	41

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	GENES ASSOCIADOS À RESPOSTA IMUNOLÓGICA COM ESTÍMULO MAIOR QUE 4 VEZES NO DIA 4 DO TRATAMENTO COM DOXACICLINA COMPARADOS COM CONTROLES .....	34
TABELA 2 -	GENES ASSOCIADOS AS MMPs NO DIA 4 DE TRATAMENTO COM DOXACICLINA COMPARADOS COM CONTROLES .....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS

AKAP9	- "A-kinase anchor protein 9"
AMPc	- Adenosina monofosfato cíclico
AP-1	- "Activated protein 1"
BRAF	- "v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1"
BRAF <sup>V600E</sup>	- mutação no gene BRAF, substituição timina por adenina na posição 1799
BSA	- "Bovine serum albumine"
CCL15	- "Chemokine (C-C motif) ligand 15"
CCR1	- "C-C chemokine receptor type 1"
cDNA	- DNA complementar
CPT	- Carcinoma papilífero de tireóide
CT	- "Cycle threshold value"
CXCL1	- "Chemokine (C-X-C motif) ligand 1"
CXCL10	- "Chemokine (C-X-C motif) ligand 10"
cy3	- Cianina 3
cy5	- Cianina 5
DNA	- Ácido desoxiribonucleico
EGFR	- "Epidermal growth factor receptor"
EphA2	- Efrina A2
ERK	- "Extracellular signal-regulated kinase"
ETS	- Fator de transcrição "E-twenty six"
EUA	- Estados Unidos da América
FRS2	- "Fibroblast growth factor receptor substrate 2"
GM-CSF	- Fator de estimulação de colônias de macrófagos
IFN	- Interferon
MAPK	- "Mitogen activated protein kinase"
MCPs	- "monocyte chemotactic proteins"
MEK	- "Mitogen-activated protein kinase kinase 1"
Mig-6	- "Mitogen induced gene 6"
MMPs	- Metaloproteinases
MRC	- Cadeia respiratória mitocondrial
MT1MMP	- "Membrane type 1 metalloproteinase"
Myc	- "myelocytomatosis viral oncogene homolog"
NADH	- "Nicotinamide adenine dinucleotide"
NFkB	- "Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells"
NPA	- Linhagem de células derivadas de carcinoma de tireóide humano
NTRK	- "NT growth factor receptor"



PAX8	- "Paired box gene 8"
PC-BRAF <sup>V600E</sup>	- Linhagem de células com expressão de BRAF <sup>V600E</sup> Induzida por doxaciclina
PCCL3	- Linhagem de células derivadas de tireóide de rato
PCR	- Reação de cadeia da polimerase
PI3K	- Fosfatidilinositol 3 fosfato quinase
PPAR $\gamma$	- "Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ "
PTC3-5	- Linhagem de células com expressão de RET/PTC3 induzida por doxaciclina
PTC3-BRAF <sup>RNAi</sup>	- Linhagem de células com expressão de RET/PTC3 induzida por doxaciclina com inativação do BRAF por RNAi
PTEN	- "Phosphatase and tensin homolog"
RAS	- Genes que codificam pequenas GTPases
RET	- Receptor tirosinoquinase
RET/PTC	- Rearranjo cromossômico encontrado em carcinoma papilífero de tireóide
RNA	- Ácido ribonucleico
RNAi	- Técnica de interferência de RNA
RNA <sub>m</sub>	- RNA mensageiro
RT-PCR	- PCR em tempo real
rtTA	- Transativador reverso da tetraciclina
SBEM	- Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia
SDF 1 $\alpha$	- "Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ "
SDS	- "Sodium dodecyl sulfate"
SDS-PAGE	- "Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis"
SEMPR	- Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR
SSC	- "Saline sodium citrate buffer"
STAT	- "Signal transducers and activators of transcription protein"
TFD	- Taxa falsa de detecção
TGF $\alpha$	- "Transforming growth factor $\alpha$ "
TIMP	- "Tissue inhibitor of metalloproteinases"
tRNA	- RNA transportador
TSH	- Hormônio estimulante da tireóide
TTF2	- "Transcription termination factor 2"
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
WRO	- Linhagem de células derivadas de carcinoma de tireóide humano

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREÓIDE .....	14
2.2 ALTERAÇÕES GENÉTICAS DO CPT .....	15
2.2.1 Via da MAPK ( <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> ) .....	15
2.2.2 Via da MAPK como Alvo Terapêutico .....	18
2.3 ESTUDOS DE MICROARRANJO.....	19
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	21
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
4.1 TRANSFECCÕES E LINHAGENS CELULARES .....	22
4.2 MICROARRANJO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS .....	24
4.3 PCR EM TEMPO REAL (RT-PCR) .....	26
4.4 <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	27
4.5 ZIMÓGRAFO DE CASEÍNA E GELATINA.....	28
4.6 ENSAIO DE MOTILIDADE CELULAR .....	29
4.7 ENSAIO DE INVASÃO COM MATRIGEL .....	29
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
<b>5 RESULTADOS</b> .....	32
5.1 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA APÓS ATIVAÇÃO AGUDA DA EXPRESSÃO DE RET/PTC3, BRAF E RET/PTC3 COM INATIVAÇÃO PARCIAL DE BRAF EM CÉLULAS PCCL3.....	32
5.2 COMPLEMENTAÇÃO MANUAL DOS AGRUPAMENTOS DE GENES NÃO SUPERVISIONADOS.....	35
5.3 REGULAÇÃO PREFERENCIAL DAS MMPS POR BRAF <sup>V600E</sup> .....	36
5.4 A MIGRAÇÃO CELULAR FOI INDUZIDA PELA EXPRESSÃO DAS DUAS ONCOPROTEÍNAS ENQUANTO A INVASÃO PELO MATRIGEL FOI PREFERENCIALMENTE ESTIMULADA PELA EXPRESSÃO DO BRAF <sup>V600E</sup> INDUZIDA PELA DOXACICLINA .....	39
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	42

<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	49
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50
<b>ANEXO 1 - GENES ASSOCIADOS À CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL (MRC) COM REDUÇÃO SIGNIFICATIVA NO DIA 4 DE TRATAMENTO COM DOXACICLINA COMPARADOS COM CONTROLES. ....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO 2 - GENES DE FOSFATASES ASSOCIADAS A VIA DA MAPK NO DIA 4 DE TRATAMENTO COM DOXACICLINA COMPARADOS COM CONTROLE.....</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Carcinomas Papilíferos de Tireóide (CPTs) são o tipo mais comum de neoplasia maligna de tireóide. Eles estão associados com mutações oncogênicas características, com claro papel demonstrado em estágios iniciais do desenvolvimento tumoral. Entre eles estão os receptores tirosinoquinase RET/PTC e NTRK, os quais são formados através de rearranjos cromossômicos levando a expressão de proteínas quiméricas e ativação constitutiva de suas respectivas tirosinoquinases (SANTORO et al., 2002). Recentemente, uma mutação ativadora do *BRAF* foi encontrada como o mais prevalente oncogene associado a formas esporádicas do CPT, com uma prevalência aproximada de 40% (XING, 2005). Essa mutação é quase que exclusivamente uma substituição de timina por adenina na posição 1799, levando a uma substituição de valina por glutamato no resíduo 600 (V600E). Um mecanismo adicional de ativação do BRAF em CPTs é através da formação do gene *AKAP9-BRAF*, que codifica uma BRAF quinase constitutivamente ativada (CIAMPI et al., 2005). Além disto, mutações ativadoras dos 3 genes *RAS* são também associadas a um grupo menor de CPTs, particularmente variantes foliculares destas neoplasias (ZHU et al., 2003). Vários grupos analisaram CPTs procurando mutações para todos ou quase todos os oncogenes associados a esta neoplasia: *RET/PTC*, *NTRK*, *NRAS*, *HRAS*, *KRAS* e *BRAF*, uma vez que todos estes ativam a via de sinalização intracelular da MAPK (KIMURA et al., 2003, SOARES et al., 2003; FRATTINI et al., 2004). Mutações em um dos componentes desta via estavam presentes em 70% dos casos. Entretanto não houve um único caso com mutação em mais de um destes genes. Este fato sugere forte evidência genética que uma mutação em componentes da via MAPK é essencial para transformação em CPT já que a ativação inapropriada de um destes componentes é suficiente para o fenótipo. Isto também é consistente com o fato de que a desdiferenciação induzida por RET/PTC (KNAUF et al., 2003) e a indução de crescimento pelo TSH (CASTELLONE et al., 2003) necessitam da ativação da via MAPK em células tireoidianas. Além disto, várias linhas de evidências indicam que a atividade desregulada da MAPK em CPT

ocorre no início da carcinogênese e também é importante para manutenção do tumor. CPTs com mutações *RET/PTC*, *RAS* ou *BRAF* tem características histopatológicas e comportamento clínico diferentes. Variantes foliculares, as quais tem menos chances de desenvolver metástases para linfonodos e maior predisposição para metástases pulmonares, estão associados a mutações no *RAS* ou translocações *PAX8-PPAR $\gamma$*  (CASTRO et al., 2006). CPTs com mutações no *BRAF* se apresentam com mais frequência com invasão extratireoidiana e em estágios mais avançados da doença, estão associados a maior recorrência e mortalidade (OLER; CERUTTI, 2009; ELISEI et al., 2008), além de serem mais suscetíveis à progressão para carcinoma indiferenciado de tireóide (NIKIFOROVA et al. 2003; NAMBA et al., 2003). Portanto, apesar de todos estes oncogenes sinalizarem via MEK e ERK, eles têm propriedades fenotípicas únicas provavelmente resultantes da ativação de padrões únicos de expressão gênica. Isto foi recentemente demonstrado em carcinomas humanos. Giordano et al. (2005) analisaram o padrão de expressão gênica de 51 CPTs que tinham sido genotipados para mutações *RET/PTC*, *RAS* ou *BRAF* e encontraram associação entre o padrão de expressão gênica e o tipo de mutação. Melillo et al. (2005) avaliaram o perfil transcricional de células PCCL3 transfectadas em massa expressando de forma estável *RET/PTC* e os oncogenes *RAS* e *BRAF*). Uma grande parte dos genes ativados pelo *RET/PTC3* também foi ativada por *RAS* ou *BRAF*, consistente com o papel primário desta via na transformação. Isto foi confirmado em um grupo de genes usando a técnica de interferência do RNA para o *BRAF*, ou por inibidores do MEK. Além disto, eles demonstraram um papel desta via na estimulação da mobilidade celular, mediada em parte pela indução de quimiocinas CXCL1 e CXCL10. Melillo et al. (2005) não analisaram características que distinguem estes oncogenes em células tireoidianas já que não fizeram comparações diretas usando pares de sondas derivados de células expressando estes oncogenes. A proposta do presente estudo é comparar o padrão de expressão gênica induzido pela expressão do *RET/PTC3* e *BRAF* em células tireoidianas PCCL3 de rato usando microarranjo de oligonucleotídeos, com o objetivo de identificar categorias funcionais de genes que possam auxiliar no entendimento de algumas características

similares e diferentes entre estas neoplasias. Isto é importante porque CPTs com mutações no *BRAF* e *RET/PTC* parecem ter comportamento biológico distintos e isto se deve provavelmente a perfis de transcrição gênica diferentes. Como a ativação destes oncogenes provavelmente ocorre no início da tumorigênese, nós determinamos o perfil transcricional em pontos iniciais após a ativação dos oncogenes *in vitro*, permitindo uma comparação rigorosa entre células submetidas à condições similares. Estes experimentos permitem definir grupos funcionais de genes induzidos preferencialmente por *RET/PTC3* ou por *BRAF*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREÓIDE

O câncer de tireóide é a neoplasia endócrina maligna mais comum, sendo o CPT responsável por aproximadamente 80% dos casos. Sua incidência tem aumentado nas últimas décadas e se tornou um dos dez tipos de câncer mais prevalentes em mulheres (DAVIES; WELCH, 2006). Este aumento ocorre principalmente decorrente de CPT pequenos ou microcarcinomas, embora um trabalho recente sugira que a taxa de incidência dos CPT de todos os tamanhos tenha aumentado entre 1988 e 2005 tanto em homens como mulheres nos EUA (CHEN; JEMAL; WARD, 2009). Apesar disto, a sobrevida relativa do câncer de tireóide aumentou significativamente de 93% em 1983-1985 para 97% em 1995-2001, possivelmente associado a esta detecção mais precoce por métodos mais sensíveis como ultrassonografia e punção aspirativa, já que o manejo clínico desta doença pouco mudou nos últimos anos e ainda se baseia em tireoidectomia total ou raramente parcial para todos os pacientes, seguida de iodo radioativo e supressão do TSH (JEMAL et al., 2007). Embora em pacientes de baixo risco, considerados curados após o tratamento inicial, não é necessário manter a supressão do TSH (PACINI et al., 2003). Apesar de taxas de sobrevida elevadas, o CPT pode evoluir com metástases com frequência relativamente alta, ao redor de 15%. Destas, 75% são loco-regionais e 25% à distância (ROUXEL et al., 2004; DURANTE et al., 2006). Nos pacientes com doença recorrente está bastante claro que a sobrevida é diretamente relacionada a captação de radioiodo pelas metástases. Em casos de metástases radioiodo resistentes, pouco temos a oferecer, já que regimes de quimioterapia são pouco efetivos e radioterapia e outros tratamentos não convencionais são paliativos e usados em casos selecionados (DURANTE et al., 2006). Portanto, entender os mecanismos moleculares associados, através dos quais estes tumores iniciam, progredem e se desdiferenciam é fundamental tanto para identificar pacientes de alto risco quanto para estabelecer novas formas de tratamento para pacientes

refratários a terapia convencional. Esta revisão se restringe ao CPT, por ser a neoplasia maligna de tireóide mais prevalente e por ter suas alterações genéticas amplamente estudadas.

## 2.2 ALTERAÇÕES GENÉTICAS DO CPT

### 2.2.1 Via da MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*)

A ativação constitutiva da via MAPK é um evento bastante comum em cânceres humanos. Isto ocorre através de mutações ativadoras ou hiperexpressão de efetores desta via incluindo os receptores tirosinoquinase, RAS e RAF (SANTORO et al., 2002). Aproximadamente 70% dos CPTs apresentam mutações mutualmente exclusivas em um dos componentes desta via confirmando ser esta essencial no desenvolvimento desses tumores (RIESCO-EIZAGUIRRE, SANTISTEBAN, 2007). Apesar dessas mutações provocarem ativação constitutiva desta mesma via, existem diferenças significativas entre elas.

A família de genes *RAS* que compreende *H-RAS*, *K-RAS* e *N-RAS* codifica proteínas G que fazem parte de vias de sinalização associadas com uma grande variedade de receptores de fatores de crescimento. Aproximadamente 30% dos cânceres humanos apresentam mutações nessa família, sendo a primeira alteração genética associada a tumores de tireóide (RIESCO-EIZAGUIRRE; SANTISTEBAN, 2007). Essas mutações não são no entanto exclusivas de cânceres de tireóide, podendo também ser encontradas em adenomas foliculares e bóciós multinodulares. A prevalência em CPTs é relativamente baixa, geralmente associada a variante folicular. Entretanto pode ser elevada em carcinomas anaplásicos e pouco diferenciados e conseqüentemente associada a pior prognóstico (GARCIA-ROSTAN et al., 2003). O mecanismo pelo qual mutações ativadoras desta família de oncoproteínas induz tumorigênese em células tireoidianas é bastante complexo.



A ativação condicional induzida por doxaciclina, do oncogene *H-RAS* em células PCCL3 de tireóide de rato induz apoptose e não expansão como seria esperado. Entretanto esse efeito foi dependente da ativação concomitante da via do AMPc pelo TSH (SHIROKAWA et al., 2000). Podemos especular que a maioria das células morreriam com a ativação simultânea de RAS e da via do AMPc, e aquelas que sobrevivessem perderiam a sensibilidade ao TSH e/ou inativariam o mecanismo de apoptose por eventos secundários e teriam expansão clonal. A ativação de *H-RAS* induzida por doxaciclina em células PCCL3 foi associada a instabilidade genômica através da via da MAPK (SAAVEDRA et al., 2000), este dado enfatiza o papel desta mutação como evento inicial na tumorigênese. Além disto, um estudo *in vivo* com camundongo transgênico hiperexpressando *N-RAS* sob controle do promotor da tireoglobulina, demonstrou o aparecimento de carcinoma de tireóide em 40% dos animais, principalmente folicular, e 25% deles com áreas pouco diferenciadas, além de tendência para metástases a distância (VITAGLIANO et al., 2006). Os achados desses estudos e dados clínicos em humanos confirmam a complexidade das mutações *RAS*, estando as mesmas associadas a lesões benignas de tireóide, bem como carcinomas diferenciados e carcinomas pouco diferenciados e anaplásicos.

Os oncogenes *RET/PTC* estão também associados a uma parcela de CPT, particularmente associados a exposição a radiação e especialmente na população pediátrica. Esses oncogenes consistem de rearranjos cromossômicos que ligam a região promotora e o domínio N terminal de genes não relacionados à região C terminal do gene *RET*, resultando na produção aberrante de um receptor quimérico constitutivamente ativado (SANTORO et al., 2002). Várias formas foram descritas variando o parceiro do gene *RET* neste rearranjo, sendo os mais prevalentes *RET/PTC 1* e *RET/PTC 3*. *RET/PTC 1* é formado por uma inversão paramétrica do braço longo do cromossomo 10 levando a fusão do *RET* com o gene *H4/D10S170* (GRIECO et al., 1990). *RET/PTC 3* também é resultado de um rearranjo intracromossômico neste caso associado com o gene *RFG/ELE1* (SANTORO et al., 1994). Rearranjos *RET* foram encontrados em 0-87% dos CPT. As possíveis explicações para esta variabilidade são

principalmente diferenças entre os diversos métodos de detecção e possíveis exposições ambientais à radiação ionizante ou outros fatores carcinogênicos não conhecidos, além de variabilidade geográfica (FUSCO; SANTORO, 2007). Um estudo realizado usando 5 métodos diferentes para detecção de rearranjos *RET* no mesmo tumor demonstrou que RT-PCR de baixa sensibilidade e *southern blotting* são provavelmente os mais confiáveis com positividade em torno de 20% dos casos de PTC (ZHU et al., 2006). Não foram encontradas mutações *RET/PTC* em adenomas ou carcinomas foliculares e carcinomas anaplásicos (FUSCO; SANTORO, 2007). Entretanto foram descritos em doenças não malignas como a tireoidite de Hashimoto (NIKIFOROVA et al., 2002). Existem várias evidências que apontam o rearranjo *RET/PTC* como evento inicial na tumorigênese tireoidiana tais como: (1) a alta prevalência em CPT microscópicos (VIGLIETTO et al., 1995, SUGG et al., 1998), (2) animais transgênicos com hiperexpressão específica na tireóide de *RET/PTC 1* (JHIANG et al., 1996; SANTORO et al., 1996) e *RET/PTC 3* (POWELL et al., 1998) evoluem com tumores tireoidianos semelhantes ao CPT humano e (3) exposição de culturas de células tireoidianas à radiação ionizante resulta na expressão de *RET/PTC* (ITO et al., 1993). Entretanto, a expressão aguda de *RET/PTC 1* e *RET/PTC 3* em células PCCL3 não confere crescimento independente do TSH ou instabilidade genômica indicando que estes oncogenes tem poder tumorigênico reduzido (WANG et al., 2003). Recentemente foi demonstrado que a ação proliferativa do *RET/PTC3* em células PCCL3 pode ser inibida pelo tratamento com iodo no meio de cultura (FIORE; FUZIWARA; KIMURA, 2009). Esses achados são importantes, pois apontam para uma interação entre a parte genética (mutação *RET/PTC3*) e ambiental (quantidade de iodo na dieta) na gênese do CPT.

O gene *BRAF* codifica uma serina trioninaquinase que transmite sinal de RAS para a quinase ativada por mitógeno/quinase regulada por sinal extracelular (MEK/ERK). Mutações somáticas no gene *BRAF* tem sido descritas em uma grande variedade de neoplasias humanas como melanomas, câncer de colon e ovário. O CPT apresenta uma prevalência aproximada de 45% de mutação *BRAF*, o qual é caracterizada quase

que exclusivamente uma substituição de timina por adenina na posição 1799, levando a substituição de valina por glutamato no resíduo 600 (V600E), que promove uma ativação constitutiva desta proteína (XING, 2005). Mutações *BRAF* são exclusivas de CPT e não são encontradas em outros tumores de tireóide bem diferenciados. Essas, foram encontradas em microcarcinomas e associadas com a variante de células altas do CPT (NIKIFOROVA et al., 2003). A maioria dos estudos demonstra associação dessa mutação com características mais agressivas do tumor, tais como: extensão extratireoidiana, metástases para linfonodos, estágios mais avançados ao diagnóstico e recorrência (XING, 2007). Um estudo na população brasileira revelou a presença da mutação *BRAF* em 48% dos casos de CPT, e estava a mesma associada a fatores de pior prognóstico, recorrência e mortalidade (OLER; CERUTTI, 2009). Recentemente também essa mutação foi associada a maior mortalidade em estudo com seguimento de 15 anos (ELISEI et al., 2008). Além disto, carcinomas pouco diferenciados ou anaplásicos derivados de CPT preexistentes apresentam uma prevalência significativa de mutações *BRAF* (NAMBA et al., 2003; NIKIFOROVA et al., 2003; BEGUN et al., 2004; SOARES et al., 2004; XING et al., 2004; QUIROS et al., 2005). Assim como as outras alterações genéticas em CPT, a mutação *BRAF* é considerada um evento inicial na tumorigênese. Células PCCL3 de rato com indução aguda de  $BRAF^{V600E}$  sofrem dediferenciação e instabilidade genômica (MITSUTAKE et al., 2005) e a hiperexpressão específica desse mesmo oncogene na tireóide de camundongos transgênicos leva ao aparecimento de tumores com aspecto semelhante ao CPT humano, áreas de dediferenciação e sobrevida de 30% em 5 meses (KNAUF et al., 2005). Nesse modelo animal a hiperexpressão do *BRAF* dificultou a biossíntese do hormônio tireoidiano levando a aumento de TSH, que pode cooperar com o *BRAF* para indução de tumorigênese tireoidiana.

## 2.2.2 Via da MAPK como Alvo Terapêutico

As observações de que mutações na via MAPK são mutualmente exclusivas apontam para um papel importante desta via na tumorigênese em CPTs. Desta forma,

a inibição da mesma poderia ser efetiva em carcinomas que apresentam essas mutações. Estudos iniciais em culturas de células com inibidores RAF AAL-881 e LBT-613 aparentemente confirmam esta hipótese. Entretanto, eles poderiam ter alvos moleculares adicionais que seriam responsáveis pelos efeitos inibitórios no crescimento (OUYANG et al., 2006). Um estudo usando inibidores MEK em cultura de células de câncer de tireóide demonstrou que células com mutação *BRAF* tem redução de crescimento enquanto as que apresentam mutação *RAS* apresentam resultados contraditórios (LEBOUEF et al., 2008). Esses dados indicam que a inibição desta via em pacientes com CPT poderia ser efetiva, embora evidências atuais demonstram que provavelmente a inibição isolada desta via pode não ser suficiente (KNAUF; FAGIN, 2009). É importante lembrar que pacientes candidatos a tratamentos novos para câncer de tireóide apresentam tumores avançados e refratários aos tratamentos convencionais, provavelmente decorrente de desdiferenciação tumoral, o que pode indicar o envolvimento de outras vias no processo.

### 2.3 ESTUDOS DE MICROARRANJO.

O sequenciamento de todo o genoma humano e de outras espécies tornou necessária a análise da expressão destes genes de uma forma mais global. A evolução disto se deu através de experimentos com microarranjo onde uma grande quantidade de cDNA ou oligonucleotídeos é automaticamente aderido à uma plataforma de vidro. Essa plataforma é incubada com o cDNA proveniente de células ou tecidos em estudo marcados com partículas fluorescentes. Após hibridização, é feita a leitura das cores e intensidades obtidas. Esses ensaios podem ser feitos com dois marcadores diferentes, cianina 3 (Cy3) e cianina 5 (Cy5), e nesses casos o resultado fornece uma estimativa da expressão diferencial entre a amostra estudada e o controle, ou ainda podem ser realizados com apenas um marcador como nas plataformas Affymetrix (Santa Clara, CA, EUA) onde se utiliza biotina marcada, a qual permite quantificação absoluta (ESZLINGER et al., 2007). Além das diferentes técnicas

e desenhos de estudo de microarranjos, os métodos estatísticos e de bioinformática usados para análise dos dados são extremamente importantes para a validação dos estudos. A análise dos genes diferentemente expressos pode ocorrer de 3 formas: (1) agrupamentos supervisionados, onde o pesquisador procura genes ou categoria de genes geralmente coexpressos; (2) agrupamentos não supervisionados, que é feito de forma automática e (3) classificação supervisionadas das amostras. Como experimentos de microarranjo geralmente apresentam pequeno número de amostras e grande número de variáveis (genes) o grande problema desses ensaios são as comparações múltiplas, por isto a necessidade de uma correção chamada de taxa falsa de detecção (TFD). Agrupamento hierárquico não supervisionado tem sido a forma mais comum de análise, porém quando se tem uma quantidade grande de genes eles tendem a se agrupar de alguma forma e isto nem sempre tem um significado clínico. Portanto, experimentos com microarranjos são geradores de hipóteses e geralmente tem por objetivo o entendimento da fisiopatologia de doenças e/ou a busca de novos marcadores para diferenciá-las.

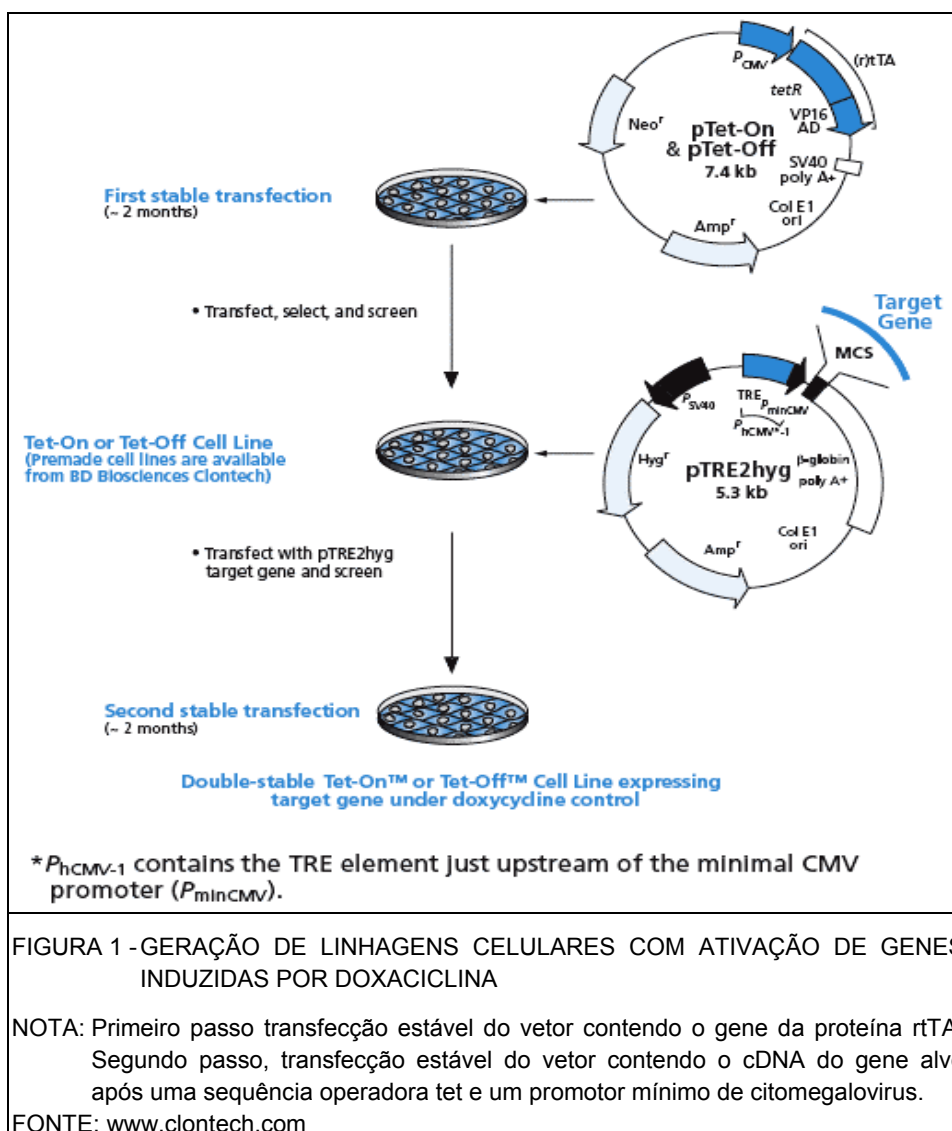
### 3 OBJETIVOS

1. Comparar o perfil de expressão gênica em células PCCL3 de tireóide de rato induzido após ativação pela doxaciclina das oncoproteínas RET/PTC3, BRAF<sup>V600E</sup> e RET/PTC3 com inativação de BRAF com a técnica de interferência de RNA.
2. Selecionar as categorias de genes que se expressam de forma diferente entre as oncoproteínas RET/PTC3 e BRAF<sup>V600E</sup>.
3. Selecionar, a partir dos dados do microarranjo, genes ou vias de sinalização para prosseguir a investigação pela mensuração de RNAm, proteínas e/ou testes funcionais.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 TRANSFECCÕES E LINHAGENS CELULARES

Células PCCL3 de tireóide de rato foram mantidas em meio de cultura H4 que consiste de meio de Coon/F12 suplementado com zinco; 5% de soro de fetal bovino; 0,3 mg/ml L-glutamina; 1mIU/ml de TSH; 10 µg/ml de insulina; 5 µg/ml de apotransferrina; 10 nmol/l de hidrocortisona e penicilina/ estreptomicina. As células PTC3-5 e PC-BRAF<sup>V600E</sup> foram derivadas de células PCCL3 para obtenção de indução de *RET/PTC3* e *BRAF<sup>V600E</sup>* pela doxaciclina, respectivamente, conforme descrito previamente (WANG et al., 2003, MITSUTAKE et al., 2005). Em resumo, o sistema de ativação de genes pela doxaciclina ou tetraciclina consiste na utilização de um elemento do operador de resistência à tetraciclina da *E. coli*. Inicialmente transfectamos de forma estável as células PCCL3 com um vetor que expressa a proteína conhecida como transativador reverso da tetraciclina (células rTA). A expressão da proteína rTA nestas células independe da presença de doxaciclina. Em seguida, nós subclonamos um cDNA *BRAF<sup>V600E</sup>* ligado ao cDNA *myc* para células *BRAF<sup>V600E</sup>* ou *RET/PTC3* para células PTC3-5 (*BRAF<sup>V600E</sup>* foi gentilmente cedido pelo Dr. Richard Marais, Institute of Cancer Research, University of London, Reino Unido e *RET/PTC3* pela Dra Sissy Jhiang Ohio State University, EUA) em um vetor pUHG10-3, após uma sequência operadora *tet* repetida sete vezes e um promotor mínimo de citomegalovirus. Esse vetor foi cotransfectado em células rTA que expressavam de forma estável o transativador reverso da tetraciclina (rTA) com o vetor pTKhygro usando lipofectAMINE 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (Figura 1). Os clones foram selecionados com base na ausência de expressão sob condições basais e forte indução pela doxaciclina. As células PTC3-BRAF<sup>RNAi</sup> foram obtidas pela expressão estável de um RNAi para BRAF em células PTC3-5, como previamente descrito (MITSUTAKE et al., 2006). É importante ressaltar que, neste sistema, os genes alvos subclonados (*BRAF<sup>V600E</sup>* e *RET-PTC3*) são humanos e utilizam a maquinaria da célula PCCL3 que é de rato.



Uma alíquota destas células foi usada para extração de proteína para testar a expressão das oncoproteínas através de *western blotting* antes da geração de cDNA para o microarranjo (Figura 2). Também houve cuidado para adequar a expressão do RET/PTC3 nas células com ou sem a inativação do BRAF.



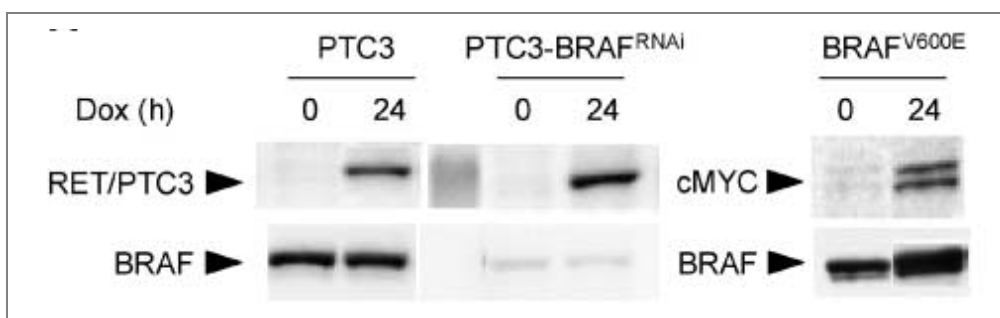


FIGURA 2 - WESTERN BLOTTING DE CÉLULAS PTC3-5, PC-BRAF<sup>V600E</sup> E PTC3-BRAF<sup>RNAi</sup> PARA TESTE DE EXPRESSÃO DE RET/PTC3 E BRAF COM OU SEM DOXACICLINA

NOTA: As células indicadas foram incubadas sem ou com doxamiclina por 24 horas. PTC3-5 e PTC3-BRAF<sup>RNAi</sup> demonstram indução de RET/PTC3 pela doxamiclina. Na linha inferior, as células que expressam BRAF<sup>RNAi</sup> demonstram uma intensa inibição de BRAF. À direita, a indução do oncogene BRAF<sup>V600E</sup> marcado com MYC pela incubação com doxamiclina em células PC-BRAF<sup>V600E</sup>.

## 4.2 MICROARRANJO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

As células PTC3-5, PC-BRAF<sup>V600E</sup> e PTC3-BRAF<sup>RNAi</sup> foram cultivadas em placas de petri de 10cm até confluência total. O TSH foi removido do meio por 2 dias. Em seguida, cada placa foi tratada com doxamiclina por 0, 1, 2 ou 4 dias para indução das respectivas oncoproteínas. Em cada ponto de tratamento, material derivado de 3 experimentos independentes foram usados para extração de RNA com TRIZOL (Invitrogen, San Diego, CA, EUA) e purificados com RNAeasy kit (Qiagen, Alameda, CA, EUA). A biblioteca de oligonucleotídeos de rato 70-mer versão 3.0 (Qiagen), que consiste de 27342 oligos, foi organizada e resumida. A lista completa de genes pode ser vista no site <http://microarray.uc.edu>. DNAs complementares (cDNA) marcados com fluorescência foram sintetizados a partir do RNA das células usando o método indireto amino alil através de reação de transcriptase reversa. Os cDNAs foram marcados com partículas fluorescentes monofuncionais reativas cy3 e cy5 (Amersham, Piscataway, NJ, EUA). Hibridizações pareadas foram feitas entre os cDNAs marcados correspondentes às células não estimuladas *versus* tratadas com doxamiclina para cada tempo e linhagem celular. Além disto, foram feitas comparações entre todas as linhagens celulares no tempo basal e entre PTC3-5 e PTC3-BRAF<sup>RNAi</sup> também nos tempos 1, 2 e 4 pós tratamento com doxamiclina com o objetivo de aumentar o poder

estatístico (Figura 3). Os detalhes da hibridização e lavagem podem ser encontrados no *web site* indicado. Em resumo: as placas são incubadas em uma solução tampão pré hibridização (5xSSC, SDS 0,1% e BSA 1% - Sigma #B-4287) por 45 a 60 minutos à 48°C e depois lavadas em água deionizada. Para a hibridização junta-se as amostras de cDNA marcadas com Cy3 ou Cy5 aquecidas a 95°C por 3 minutos para desnaturação, a solução tampão de hibridização consiste de 50% formamida, 10xSSC e SDS 0,2% e uma mistura para reduzir as hibridizações não específicas (Calf Thymus DNA, poly (A) DNA e yeast tRNA). Esta solução é incubada com a placa já preparada por 40 a 60 horas a 48°C. A imagem foi gerada usando GenePix 4000<sup>a</sup> e GenePix 4000B (Axon Instruments, Union City, CA, EUA). As placas de microarranjo foram escaneadas com lasers duplos com frequências de onda para excitar partículas fluorescentes cy3 e cy5. As imagens foram capturadas em arquivos JPEG e TIFF e os pontos de DNA capturados pelo método adaptativo de segmentação circular. A informação obtida proveniente de cada ponto de DNA foi baseada na mediana do sinal de pixels menos a mediana do sinal de pixels do fundo para produzir dados de um grupo de genes em arquivo para todos os DNAs avaliados. A intensidade do sinal fluorescente de cy3 e cy5 foi normalizada em duas etapas para cada microarranjo separadamente. Primeiro, as intensidades de fundo foram transformadas em logaritmo e calculadas as diferenças (R) e médias (A) dos valores transformados em logaritmo:  $R = \log_2(X_1) - \log_2(X_2)$  e  $A = [\log_2(X_1) - \log_2(X_2)] / 2$ , onde  $X_1$  e  $X_2$  correspondem as intensidades de cy3 e cy5, após subtração do sinal de fundo, respectivamente. Segundo, a centralização dos dados foi realizada por meio de ajuste do modelo de regressão local arranjo-específico de R como uma função de A. A diferença entre a razão de log observada e o valor ajustado correspondente representa a razão de expressão gênica log transformada normalizada. Listas de genes de rato foram suplementadas com os homólogos de humanos ou camundongos para oligonucleotídeos correspondentes a genes desconhecidos.

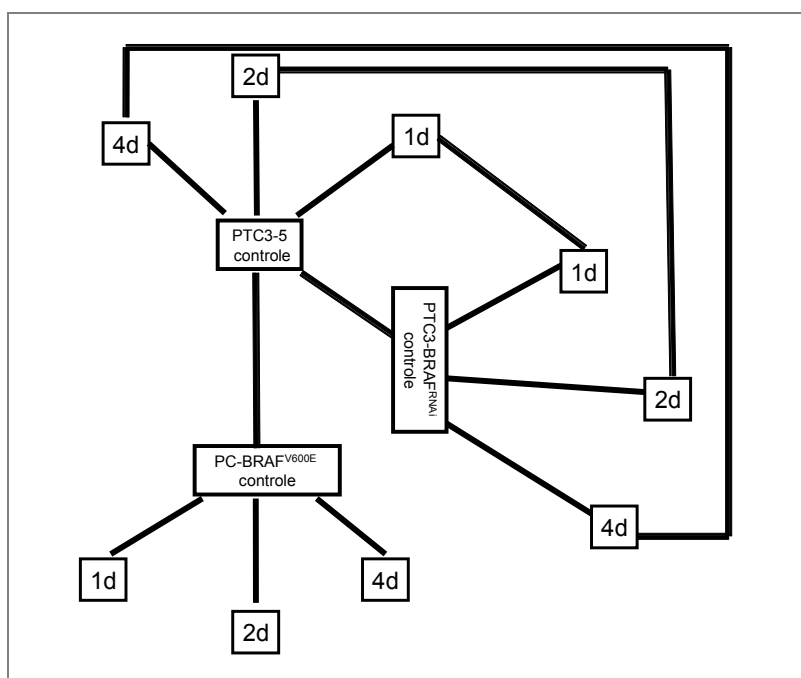


FIGURA 3- DESENHO ESQUEMÁTICO CORRESPONDENTE AS HIBRIDIZAÇÕES REALIZADAS NO ESTUDO DE MICROARRANJO

NOTA: As caixas representam as linhagens celulares e os dias de tratamento com doxamiclina (1d, 2d e 4d). As linhas representam as hibridizações realizadas: do basal para cada dia de tratamento com doxamiclina dentro de cada linhagem celular, nos tempos basais entre as diferentes linhagens celulares e em cada tempo de tratamento entre PTC3-5 e PTC3-BRAF<sup>RNAi</sup>.

#### 4.3 PCR EM TEMPO REAL (RT-PCR)

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 2 µg de RNA total pela utilização da transcriptase reversa (Superscript III – Invitrogen, Life Technologies) na presença de hexanucleotídeos randômicos. A RT-PCR foi feita usando o conjunto de reagentes *QuantiTect SYBR Green for quantitative, real time PCR* (Qiagen, Hilden, Alemanha) em um aparelho LightCycler (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA). A quantificação relativa foi obtida pelos valores de limiar do ciclo (*cycle threshold value - CT*), no qual o aumento no sinal associado à fase exponencial de amplificação do produto da PCR começa a ser detectada. O CT foi determinado usando a segunda derivativa e usado para calcular a expressão normalizada dos genes indicados usando o software Q-Gene (MULLER et al, 2002). A β-actina foi utilizada como gene de referência. Os iniciadores específicos foram desenhados

usando o programa Primer3 tomando-se o cuidado para que os pares se ligassem a exons diferentes, como a seguir: *β-actina*, 5'-CTG AAC CCT AAG GCC AAC CGT G- 3' e 5'-GGC ATA CAG GGA CAG CAC AGC C- 3'; *mmpP2*, 5'-TGA CGA TGA AGC TGT GGA CTC- 3' e 5'-CTG CTG TAT TCC CGA CCA TT- 3'; *mmp3*, 5'-GCT CAT CCT ACC CAT TGC AT- 3' e 5' –CGT TCC CTG TCA TCT TCA GC- 3'; *mmp9*, 5' –CCC TGC GTA TTT CCA TTC AT- 3' e 5' –AGT TGC CCC CCAG TTC CAG TG- 3'; *mmp13*, 5' –GAG GTG AAA AGG CTC AGT GC- 3' e 5' –ATG AGG CGG GGA TAG TCT TT- 3'; *mt1-mmp*, 5' –TCA TGG CTC CCT TTT ACC AG- 3' e 5' –CTT TGT GGG TGA CCC TGA CT- 3'; *inibidor tissular das metaloproteinases 2 (timp2)*, 5' –GCA TCA CCC AGA AGA AGA GC- 3' e 5' –TGA TGC AGG CAA AGA ACT TG- 3'.

#### 4.4 WESTERN BLOTTING

As células foram lisadas em uma solução tampão contendo 20 mmol/L de Tris-HCl (pH 7,5), 1 mmol/L de EDTA, 150 mmol/L de NaCl, 0,5% de Triton X-100, 50 mmol/L de fluoreto de sódio, 10 mmol/L de fosfato de sódio, 2 mmol/L de fenilmetilsulfonil fluoreto, 1 mmol/L ortovanadato de sódio e um coquetel de inibidor de protease (Sigma, St Louis, MO, EUA). O meio de cultura livre de soro foi coletado das placas de cultura, centrifugado brevemente para remoção de células mortas e concentrado 20 vezes usando o concentrador Centricon (Amicon, Inc., Billerica, MA, EUA). Soro bovino fetal foi usado como controle positivo para MMP2 e MMP9. Após medir concentração de proteínas usando Micro Bicinchoninic Acid Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL, EUA), 50 µg do lisado celular ou 30 µL do meio de cultura concentrado foi separado por SDS-PAGE e transferido em uma membrana de nitrocelulose (Amershan Biotechnology). Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-MMP2 AB809, anti-MMP3 MAB3306, anti-MMP9 AB19016, anti-MMP13 MAB13426 (Chemicon International, Temecula, CA, EUA), anti-RET (cedido por Yuri Nikiforov, University of Cincinnati, Cincinnati, OH), anti-BRAF F7 (Santa Cruz Biotechnology), anti-myc 9E10 (Oncogene, Boston, MA, EUA, EUA). O complexo

antígeno-anticorpo foi visualizado utilizando-se anticorpo IgG de camundongo anti-camundongo ou anti-coelho conjugado à enzima peroxidase (Santa Cruz Biotechnology) e amplificado por um sistema de quimioluminescência (Amershan Bioscience).

#### 4.5 ZIMÓGRAFO DE CASEÍNA E GELATINA

Células PTC3-5 ou PC-BRAF<sup>V600E</sup> confluentes foram tratadas com ou sem doxaciclina por 2 e 4 dias na ausência de TSH. As células foram mantidas sem soro no meio de cultura nas últimas 24 horas de incubação. O meio de cultura condicionado foi coletado em gelo, centrifugado a 3000 rpm para remoção de células mortas e restos celulares e concentrado 20 vezes utilizando Centricon Concentrator 10 (Amicon). Trinta microlitros do meio de cultura concentrado foram corridos em um gel de poliacrilamida a 7,5% contendo 1 mg/ml de gelatina (Sigma G8150) e a 10% contendo 1mg/ml de  $\beta$ -caseína (C6905). A gelatina e a caseína foram copolimerizados ao gel de poliacrilamida e funcionam como substrato para a degradação pelas metaloproteinases. Os seguintes controles positivos foram usados: soro fetal bovino para MMP2 e MMP9 no gel de gelatina e MMP3 humana (Chemicon CC1035) no gel de caseína. Após a eletroforese, o gel foi lavado em solução de Triton X 100 2,5% por 30 minutos e outros 30 minutos na solução de revelação (50 mmol/L Tris, 0,2 mol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0,02% Brij 35, ph 7,4) à temperatura ambiente. O líquido foi removido e adicionado solução de revelação novamente, seguido de incubação por 18 horas a 37°C. O gel foi corado em uma solução contendo Coomassie blue R-250, 30% de metanol e 10% de ácido acético por 3 horas e após lavado com uma solução contendo 45% de metanol e 10% de ácido acético. As áreas do substrato degradadas pelas enzimas foram identificadas como bandas claras contra um fundo azul. O gel foi fotografado com Nikon coolpix 5700 e convertido em escala cinza.

#### 4.6 ENSAIO DE MOTILIDADE CELULAR

O experimento de motilidade celular avalia a taxa de repopulação das células após a ruptura da camada celular em placa de cultura. Células PTC3-5 ou PC-BRAF<sup>V600E</sup> com 90% de confluência foram tratadas ou não com doxaciclina por 2 dias na ausência de TSH. As respectivas camadas de células foram rompidas com uma ponteira de pipeta de 10 µL. A repopulação das áreas livres de células foi acessada através de microscópio nos tempos 0, 12, 22 e 38 horas. Nesse período de tempo a divisão celular é desprezível em meio de cultura sem TSH. Ao final de 22 horas, as células que entraram no espaço livre foram contadas em toda a extensão da placa. Células PTC3-5 ou PC-BRAF<sup>V600E</sup> cultivadas em meio de cultura H3 (sem TSH) não aumentam a proliferação celular nesse período de tempo.

#### 4.7 ENSAIO DE INVASÃO COM MATRIGEL

O ensaio de invasão foi realizado em câmaras de cultura de células usando membranas policarbonadas com poros de 10 µm (Costar, Cambridge MA, EUA). Ambos os lados da membrana foram embebidos em colágeno de rato tipo I e o Matrigel (60 µg) foi colocado como barreira no lado de cima. Células PTC3-5 ou PC-BRAF<sup>V600E</sup> que foram cultivadas na presença ou ausência de doxaciclina por 4 dias, em meio sem TSH, foram coletadas com tripsina/EDTA e ressuspensas em meio de cultura com ou sem doxaciclina, na ausência de TSH. As células ( $2,5 \times 10^5$ ) foram colocadas na parte de cima da câmara. A parte de baixo da câmara continha 0,6 ml de meio de cultura com diferentes concentrações de SDF 1α (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA) como quimioatraente. Essa quimioquina demonstrou ser um potente quimioatraente para células PCCL3 cronicamente expressando RET/PTC1 (CASTELLONE et al., 2004). Células foram cultivadas por 24 horas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células da parte de cima da câmara que não migraram foram removidas com um *swab* de algodão. Os filtros foram fixados com paraformaldeído à 4% e corados com cristal violeta. O número total de células que migrou para a superfície de baixo foi contado em microscópio de visão ampliada. O experimento que verificou o envolvimento das metaloproteinases,

concentrações equimolares dos inibidores das MMPs indicados abaixo foram adicionados em ambos os lados da câmara. GM6001 (Calbiochem, La Jolla, CA, EUA), um potente inibidor das MMPs foi comparado com um controle negativo estruturalmente modificado. A invasão através do Matrigel foi ainda testada na presença de um inibidor seletivo da MMP13 CL82198 (Calbiochem). Os compostos foram dissolvidos em DMSO e diluídos para que a concentração do veículo fosse menor que 1% no ensaio.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística para o experimento com microarranjo foi feita para cada gene separadamente através do ajuste de um modelo linear de efeitos mistos (DUDOIT; FRIDLAND, 2002). As inferências sobre as variáveis do modelo experimental são as mesmas descritas na referência (WOLFINGER et al., 2001), sendo os efeitos do arranjo randômico e os tratamentos e fluorescências fixos. A significância estatística da diferença de expressão foi obtida através do cálculo dos Ps e ajustando-se pelo teste de hipóteses múltiplas e cálculo da TFD (REINER; YEKUTIELI; BENJAMINI, 2003) considerado um valor de 0,05 como limite de significância estatística para genes regulados (estimulados ou inibidos). Foram também calculadas as estimativas do grau de alteração. A normalização dos dados e a análise estatística foi feita usando o pacote de software estatísticos SAS (SAS institute, Inc., Cary, NC). A partir dos genes transcritos significativamente foram criados agrupamentos de genes usando o modelo Bayesiano avançado. Este modelo permite analisar a significância estatística de padrões de expressão identificados. Testes funcionais foram realizados em contraposição à base de dados de processos biológicos e função molecular do Gene Ontology através do programa EASE. Desta forma foram definidas categorias de genes de acordo com sua função biológica. Foi aplicado o teste exato de Fisher para cada categoria de genes (HOSACK et al., 2003), ajustado para múltiplas hipóteses para identificar as categorias que obtiveram significância estatística. Para o experimento de invasão através do Matrigel o número de células foi expresso em média e desvio padrão e utilizado o teste T de Student não pareado e valor de  $P < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA APÓS ATIVAÇÃO AGUDA DA EXPRESSÃO DE RET/PTC3, BRAF E RET/PTC3 COM INATIVAÇÃO PARCIAL DO BRAF EM CÉLULAS PCCL3

RET/PTC3 regulou a expressão de 3399 genes enquanto BRAF<sup>V600E</sup> teve efeito em grupo menor de transcritos (1415) (Figura 4). Destes, 847 foram co-regulados por ambos os estímulos. Em contraste, 471 transcritos deste grupo não foram regulados pelas células PTC3-BRAF<sup>RNAi</sup>, demonstrando que elas necessitaram do BRAF para o efeito mediado por RET/PTC3. Este grupo foi considerado como sendo representativo de genes dependentes da via da MAPK quinase. Por outro lado, 645 genes foram regulados por RET/PTC3 não importando se expressavam ou não BRAF e não foram induzidos por BRAF<sup>V600E</sup>. Este grupo foi representativo de genes que não precisaram da via da MAPK quinase para sua ativação.

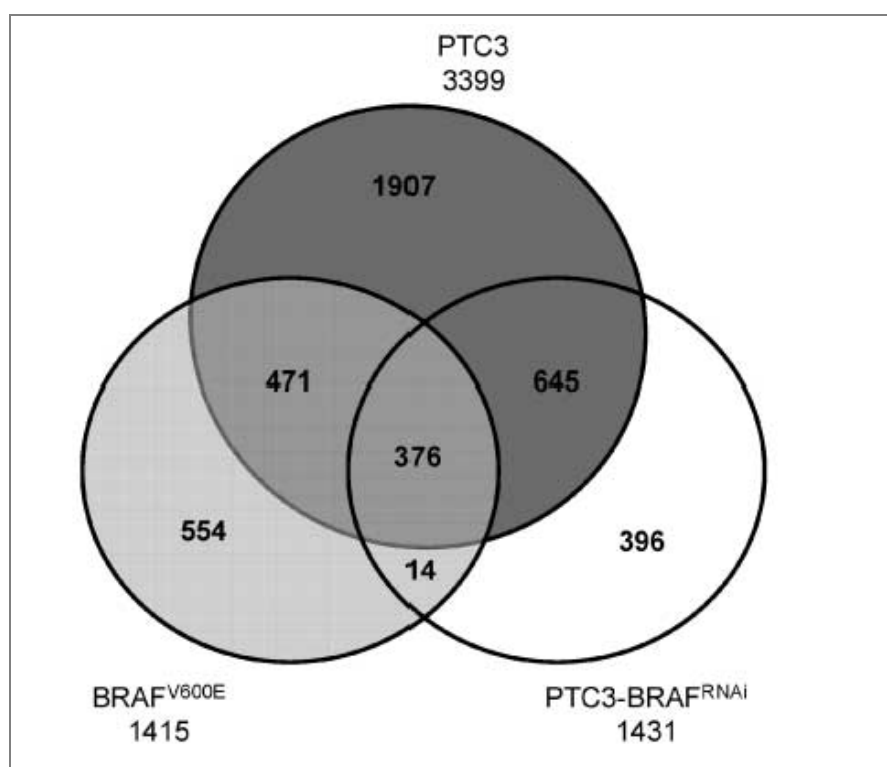


FIGURA 4 - TRANSCRITOS INIBIDOS OU ESTIMULADOS EM PELO MENOS UM DOS TEMPOS APÓS TRATAMENTO COM DOXACICLINA NA TRÊS LINHAGENS CELULARES



Entre os genes que foram inibidos pela ativação das oncoproteínas, um grupo deles demonstrou ser claramente dependente do BRAF, já que foi mais intensamente inibido por BRAF<sup>V600E</sup> comparado a RET/PTC3. Esse efeito inibitório foi removido pela inativação do BRAF nas células RET/PTC3 (Figura 5). Componentes da via de sinalização da cadeia respiratória mitocondrial (MRC) estavam altamente representados neste grupo ( $P = 9,6 \times 10^{-21}$  - obtido pelo teste exato de Fisher e referente a significância estatística desta categoria de genes). O MRC consiste de cinco complexos enzimáticos, sendo que a subunidade NADH ubiquinona oxireductase faz parte do complexo 1. Oito de um total de 42 genes deste complexo estavam inibidos primariamente via ativação do BRAF. A magnitude da inibição foi em média de 2 vezes (Anexo 1).

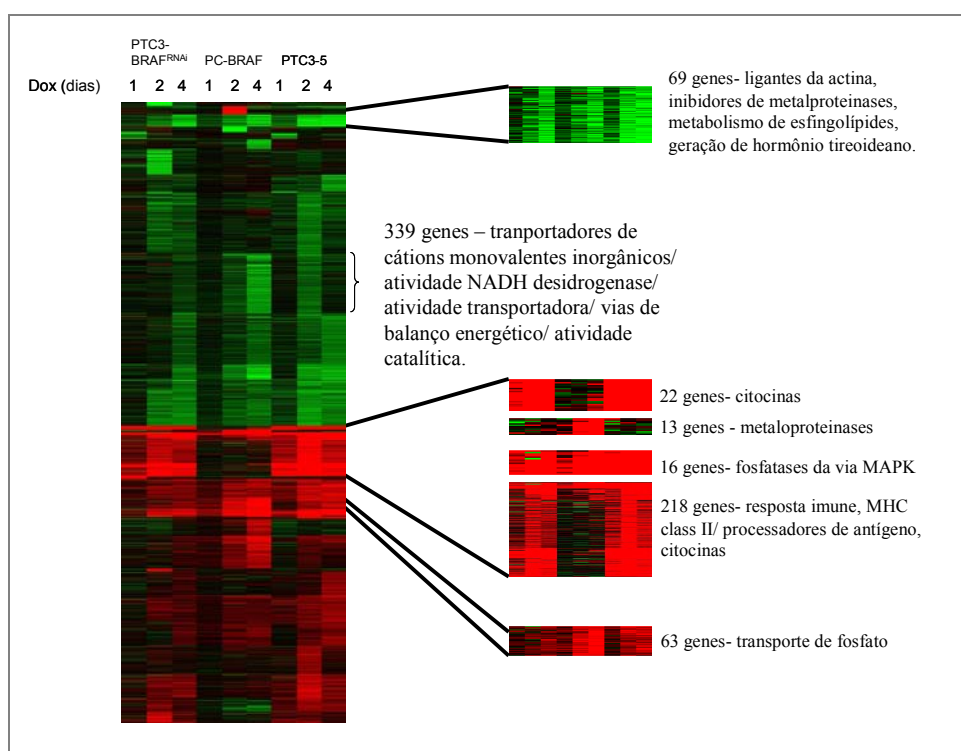


FIGURA 5 - AGRUPAMENTOS DE GENES CO-EXPRESSOS CRIADOS A PARTIR DE TRANSCRITOS QUE SE MODIFICARAM SIGNIFICATIVAMENTE APÓS ESTÍMULO COM DOXACICLINA

NOTA: As colunas representam a expressão dos genes após os dias de estímulo com doxaciolina nos dias 0, 1, 2 e 4 em células PTC3-5, PC-BRAF<sup>V600E</sup> e PTC3-BRAF<sup>RNAi</sup> respectivamente. As porções amplificadas correspondem a categorias funcionais agrupadas citadas no texto. A planilha completa de dados está disponível no site: [hyyp://eh3.uc.edu](http://hyyp://eh3.uc.edu).

Como descrito previamente, o grupo de genes com maior representatividade entre os regulados por RET/PTC3 consiste de genes envolvidos na resposta imunológica (Ps para os vários grupamentos de genes variam de  $1,7 \times 10^{-3}$  a  $3,1 \times 10^{-15}$ ). Uma pequena parte destes genes precisaram da sinalização via BRAF, já que sua indução foi bloqueada nas células PTC3-BRAF<sup>RNAi</sup> e foram induzidos mais intensamente por BRAF<sup>V600E</sup>. Entre esses genes dependentes de BRAF estão os que codificam proteínas envolvidas na resposta imunológica inata como o fator de estimulação de colônia de macrófagos (GM-CSF), as quimiocinas de macrófagos MCP-1 e MCP-3 e o do receptor de quimiocinas CCR1. Em contraste, a maioria dos genes envolvidos na resposta imunológica que não necessitaram BRAF para sua indução por RET/PTC3 consiste de genes envolvidos na apresentação de antígenos ( $P = 6,13 \times 10^{-7}$ ) e na via de sinalização do interferon (Ps para os vários grupamentos variam de  $9,3 \times 10^{-8}$  a  $3,1 \times 10^{-15}$ , dependendo da área do cluster) (Tabela 1; Figura 5).

Um agrupamento de MAPK fosfatases foi induzido intensamente por RET/PTC3 e BRAF<sup>V600E</sup>. Os genes que codificam as duas fosfatases da ERK prototípicas (MKP-3 e DUSP5) foram marcadamente induzidos pelas duas oncoproteínas (Anexo 2).

Dentre as categorias funcionais reguladas preferencialmente por BRAF<sup>V600E</sup>, as metaloproteinases foram fortemente representadas. Genes que codificam MMP13, MMP9 e MMP3 foram fortemente induzidas pela expressão do oncogene *BRAF* (Tabela 2). Outros genes envolvidos na remodelação da matriz extra celular demonstraram padrão similar de expressão. Como invasividade é reconhecidamente um achado em PTCs com mutação no *BRAF* e em camundongos transgênicos que hiperexpressam BRAF<sup>V600E</sup> na tireóide, nós detivemos maior foco nesta família de enzimas que degradam a matriz, como será descrito posteriormente.

TABELA 1 - GENES ASSOCIADOS À RESPOSTA IMUNOLÓGICA COM ESTÍMULO MAIOR QUE 4 VEZES NO DIA 4 DO TRATAMENTO COM DOXACICLINA COMPARADOS COM CONTROLES

GENES	PTC3-5	PC-BRAF <sup>V600E</sup>	PTC3-BRAF <sup>RNAi</sup>
BRAF independente			
<i>CXCL11 (IP9)</i>	61.62	1.54	37.38
<i>Best 5</i>	36.33	2.74	34.14
<i>CD74</i>	26.62	3.89	6.7
<i>CCL4 (MIP1*)</i>	23.98	3.31	27.77
<i>SLAMF1 (IPO3)</i>	16.59	1.76	18.18
<i>IFIT4</i>	16.14	1.06	6.77
<i>GBP2</i>	15.91	2.05	8.46
<i>BF</i>	15.18	1.42	10.74
<i>Mx2</i>	13.55	1.45	10.72
<i>IFI27</i>	11.03	3.01	9.19
<i>CXCL10 (IP10)</i>	10.54	1.92	6.26
<i>MOB5</i>	9.66	1.79	4.71
<i>IFIT2</i>	7.84	1.45	3.89
<i>IRF7</i>	7.57	-1.43	4.26
<i>IGTP</i>	5.4	1.19	3.62
<i>RT1-Db</i>	5.35	1.37	3.81
<i>SOCS1</i>	4.31	-1.17	3.57
<i>IRF1</i>	4.03	1.91	2.87
BRAF dependente			
<i>CCL7 (MCP3)</i>	9.52	39.55	6.12
<i>CCL2 (MCP1)</i>	31.8	39.29	7.73
<i>GM-CSF</i>	1.28	12.11	2.17
<i>CCR1</i>	-1.03	5.77	-1.14

TABELA 2 - GENES ASSOCIADOS AS MMPs NO DIA 4 DE TRATAMENTO COM DOXACICLINA COMPARADOS COM CONTROLES

GENES	PTC3-5	PC-BRAF <sup>V600E</sup>	PTC3-BRAF <sup>RNAi</sup>
<i>MMP-3</i>	45.94	97.40	31.62
<i>MMP-13</i>	1.33	39.64	1.10
<i>MMP-9</i>	-1.14	4.41	1.08
<i>MMP-2</i>	-1.03	-1.59	-1.09
<i>MT-MMP 1</i>	-1.59	-1.84	-1.26
<i>TIMP-2</i>	-4.10	-2.63	-1.79
<i>TIMP-3</i>	-3.76	-2.46	-2.21
<i>Antígeno U-PAR-CD87</i>	16.14	11.16	7.11

## 5.2 COMPLEMENTAÇÃO MANUAL DOS AGRUPAMENTOS DE GENES NÃO SUPERVISIONADOS

Nós examinamos as listas de genes procurando por genes candidatos, tendo como base o conhecimento corrente sobre função de genes para enriquecer a informação obtida a partir da análise inicial.

A complementação manual de grupos de genes demonstrou uma regulação bastante complexa, através do BRAF, de genes que inibem ou estimulam a via da MAPK quinase. O gene do receptor da efrina (*ephA2*) e de seu ligante a efrina A1 foram induzidos em 4,4 e 1,9 vezes por BRAF, respectivamente. EphA2 é um receptor tirosino quinase que é ativado de forma transcricional pela via Ras/Raf/MAPK (MACRAE et al., 2005). Este estímulo promove uma inibição da ativação do Ras induzida por fatores de crescimento, criando desta forma uma retroalimentação negativa na atividade do RAS. A proteína induzida por mitose Mig-6 inibe a ativação da ERK2 induzida pela ativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e seu gene foi também induzido por BRAF (3,2 vezes) e por RET/PTC3 de maneira BRAF dependente. Assim como as fosfatases da via MAPK quinase MKP-3 e DUSP5, a ativação de EphA2 e Mig-6 poderia levar a uma inibição da ativação da ERK induzida pelo BRAF. Em contraste, o gene do fator de crescimento e transformação  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), um ligante do EGFR, foi induzido 3,4 vezes por BRAF.

Entre os genes que poderiam participar da resposta imunológica inata, *ccl15 (mip1 $\gamma$ )*, que codifica um fator quimiotático para células T e monócitos, não apareceu nesta categoria nos agrupamentos não supervisionados, porém também foi induzido por BRAF em 2,1 vezes.

Alguns genes associados a estrutura celular e adesão, que poderiam ter papel na remodelação da matriz e invasão, foram também induzidos por BRAF. *lipocalin 2* (8x), *sydecan 1* (7,3x), *nidogen 2* (3,1x), *integrina  $\alpha$ 3* (2,6x), *integrina  $\alpha$ 2* (3,5x), *colágeno  $\alpha$ 1 cadeia XII* (3,6x) e *catepsina D* (2,5x).

Como previsto e confirmando estudos prévios com cultura de células tireoidianas, tireoglobulina, deiodinase tipo 1 e o fator de transcrição *TTF-2* foram inibidos por RET/PTC3 e BRAF.

### 5.3 REGULAÇÃO PREFERENCIAL DAS MMPS POR BRAF<sup>V600E</sup>

O grupamento de genes não supervisionados envolvidos na remodelação da matriz extra celular ( $P = 2,03 \times 10^{-3}$  – obtido através do teste de Fisher e referente

a categoria funcional das MMPs) está presente na tabela 2. Nós confirmamos a indução dependente de BRAF do RNAm da MMP3, MMP9 e MMP13 por RT-PCR assim como inibição de MT1-MMP nas células PC-BRAF<sup>V600E</sup> e TIMP2 em ambas as células (Gráfico 1). O RNAm da MT1-MMP teve uma indução discreta nas células PTC3-5.

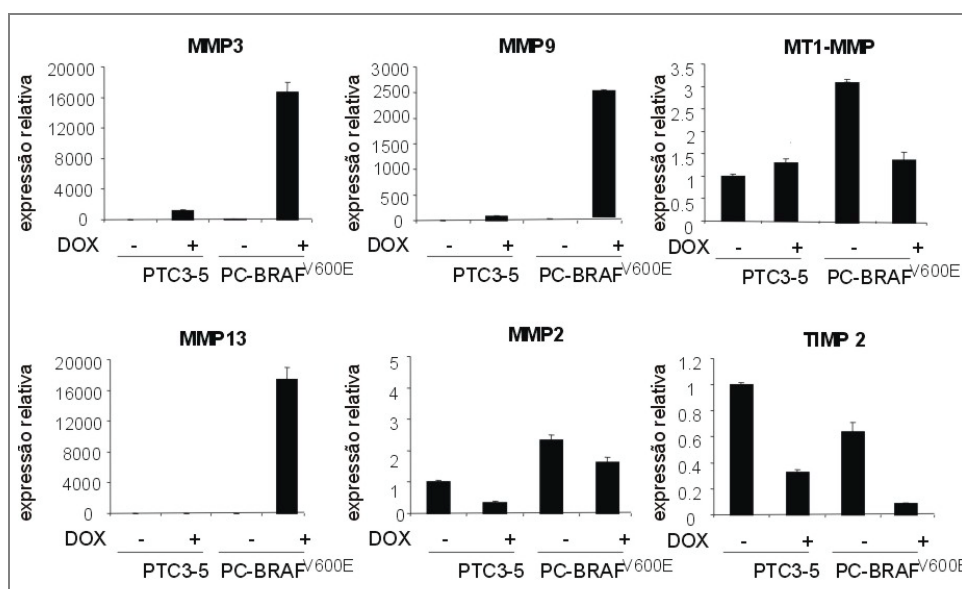


GRÁFICO 1 - EXPRESSÃO RELATIVA DOS RNAm DAS MMPs POR RT-PCR NAS CÉLULAS PTC 3-5 E PC-BRAF<sup>V600E</sup>

NOTA: As células indicadas foram cultivadas com ou sem doxaciiclina por 4 dias na ausência de TSH. As colunas representam a média da expressão relativa de RNAm dos respectivos genes (experimentos feitos em triplicata) e as barras o desvio padrão.

A Figura 6 demonstra a secreção das MMPs indicadas através da técnica de *western blotting*. Foram corridos 30µl do meio de cultura concentrado de células PTC3-5 e PC-BRAF<sup>V600E</sup> com ou sem doxaciiclina. Anticorpos específicos para as respectivas MMPs foram utilizados conforme descrito em Materiais e Métodos. Demonstramos a forte secreção de MMP9 e MMP13 exclusivamente em células PC-BRAF<sup>V600E</sup> após ativação com doxaciiclina. Em contraste com a expressão do RNAm da MMP2, que foi inibido em ambas as linhagens celulares pela ativação dos oncogenes *BRAF* e *RET/PTC3*, a secreção da proteína MMP2 foi marcadamente aumentada, principalmente em células PC-BRAF<sup>V600E</sup>, consistente com mecanismos pós-translacionais via BRAF (Figura 6).

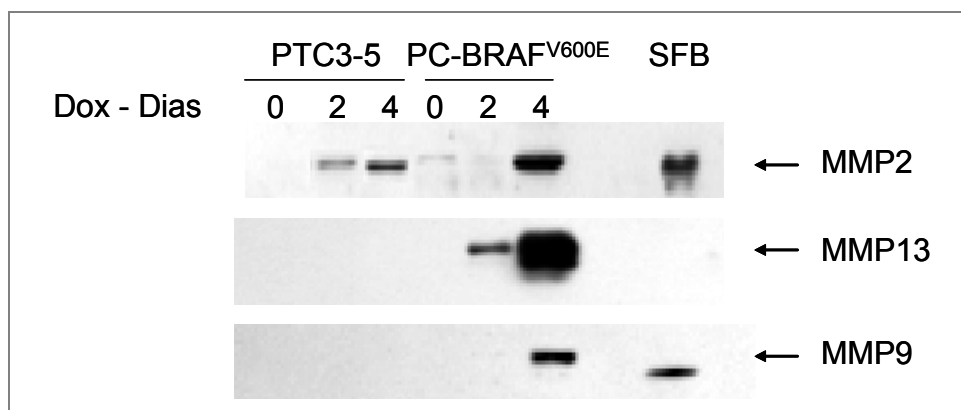


FIGURA 6 - WESTERN BLOTS DOS MEIOS DE CULTURA CONDICIONADOS DE CÉLULAS PTC3 E BRAF<sup>V600E</sup> NOS DIAS DE TRATAMENTO DE DOXACICLINA INDICADO, NA AUSÊNCIA DE TSH

NOTA: SFB – soro bovino fetal.

A técnica de zimógrafo consiste da co-polimerização do substrato das MMPs ao gel de poliacrilamida. As proteínas são separadas por peso molecular como no *western blotting*. Ocorre a degradação do substrato, que aparece como uma banda clara contra um fundo escuro correspondente ao peso molecular da respectiva MMP. O zimógrafo de gelatina com meio de cultura das células demonstrou uma indução preferencial tanto da MMP2 e pró MMP2 como da MMP9 enquanto o zimógrafo de caseína revelou a indução da MMP3 e pró-MMP3 mediada pelo BRAF (Figura 7).

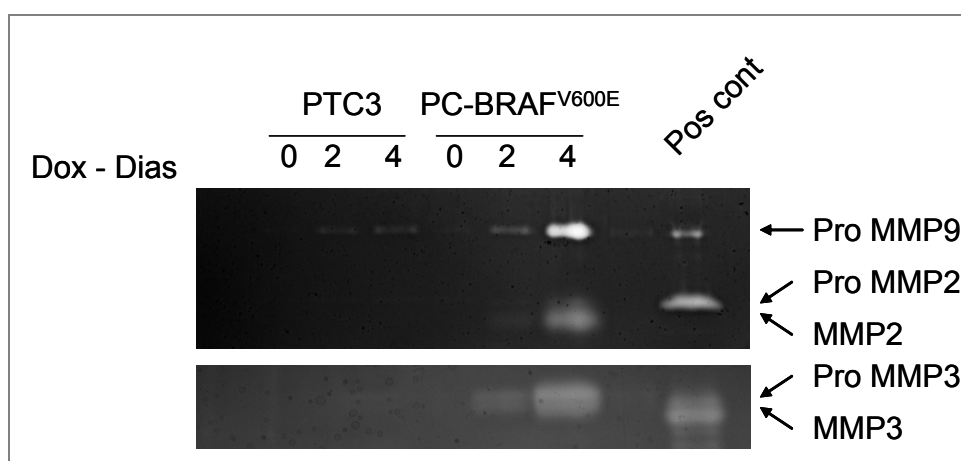


FIGURA 7 - ZIMÓGRAFOS DE GELATINA (ACIMA) E CASEÍNA (ABAIXO) DOS MEIOS DE CULTURA CONDICIONADOS DE CÉLULAR PTC3-5 E BRAF<sup>V600E</sup> NOS DIAS DE TRATAMENTO DE DOXACICLINA INDICADOS, NA AUSÊNCIA DE TSH

NOTA: Pos cont – controle positivo. As bandas são reconhecidas por peso molecular. Pró MMP9 92KDa, Pró MMP2 72KDa, MMP2 65KDa, Pró MMP3 57KDa e MMP3 53KDa.

#### 5.4 A MIGRAÇÃO CELULAR FOI INDUZIDA PELA EXPRESSÃO DAS DUAS ONCOPROTEÍNAS ENQUANTO A INVASÃO PELO MATRIGEL FOI PREFERENCIALMENTE ESTIMULADA PELA EXPRESSÃO DO BRAF<sup>V600E</sup> INDUZIDA PELA DOXACICLINA

Em seguida, nós realizamos ensaios funcionais para determinar as consequências da ativação de RET/PTC3 e BRAF<sup>V600E</sup> na migração e invasão celular. A motilidade celular foi testada contando o número de células que repovoaram um espaço obtido através de raspagem da camada de células após vários tempos de indução com doxaciclina. Ambas as oncoproteínas induziram taxas de repopulação similar após dois dias de ativação com a doxaciclina (Figura 8).

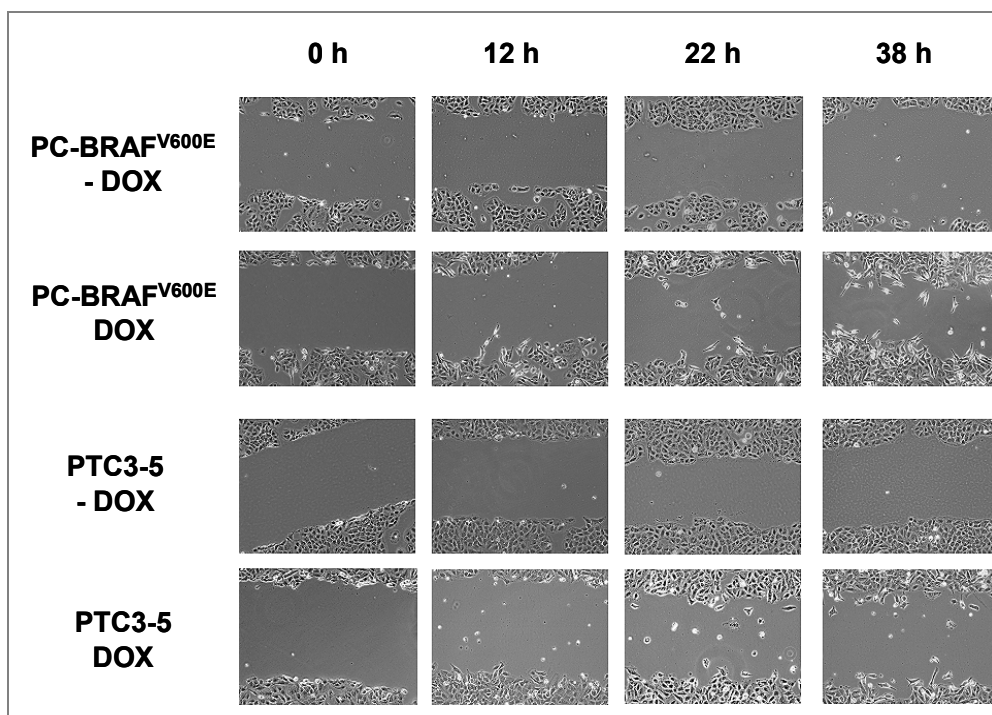


FIGURA 8 - RET/PTC3 E BRAF<sup>V600E</sup> INDUZEM NÍVEIS DE MIGRAÇÃO CELULAR SIMILARES EM CÉLULAS PCCL3 APÓS TRATAMENTO COM DOXACICLINA

A capacidade de invasão através do Matrigel foi examinada em células PTC 3-5 e PC-BRAF<sup>V600E</sup> após 4 dias de estímulo com doxaciclina, usando concentrações diferentes de SDF-1 como fator quimiotático. A expressão de BRAF<sup>V600E</sup> induziu invasão

através do Matrigel foi 35 vezes na ausência de SDF-1 ( $p=0,005$ ), enquanto RET/PTC3 apenas 3,7 vezes ( $p=0,07$ ; Gráfico 2). A diferença entre a indução de migração por RET/PTC3 e BRAF<sup>V600E</sup> foi significativa ( $p=0,01$ ), comparadas sem a presença de SDF-1 $\alpha$ . Na presença de SDF-1 $\alpha$ , os valores de  $p$  foram 0,03 e 0,07 respectivamente para comparações com 50ng/ml e 100ng/ml do quimioatraente (Gráfico 2).

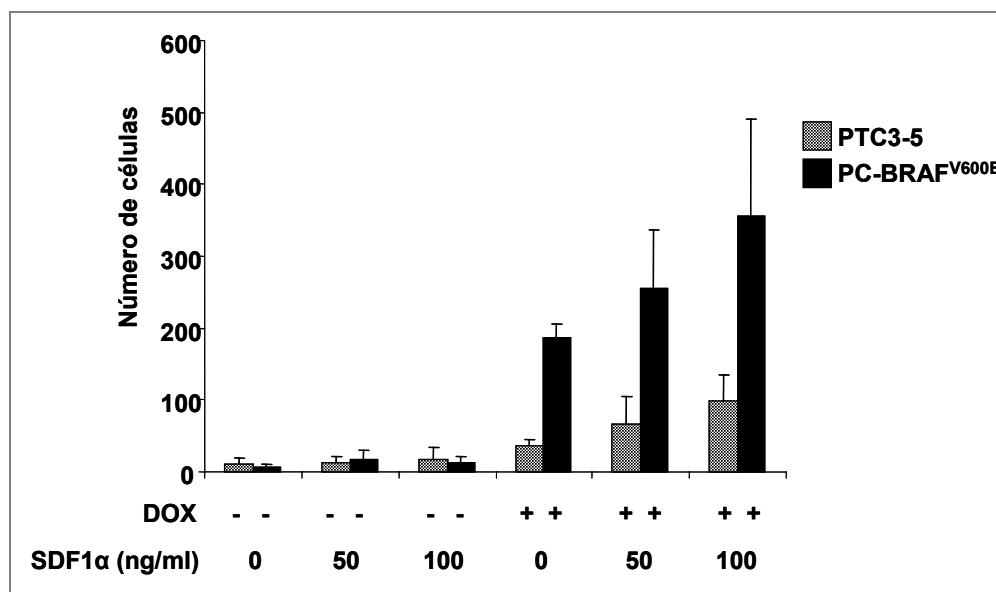


GRÁFICO 2 - INVASÃO PREFERENCIAL INDUZIDA POR DOXACICLINA EM CÉLULAS BRAF<sup>V600E</sup> COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO QUIMIOATRATIVO SDF 1A EM CÂMARAS DE CULTURA

A seguir procuramos saber se a invasão através do Matrigel em células PC-BRAF<sup>V600E</sup> era dependente da ativação das MMPs. Para tanto, realizamos o mesmo ensaio de invasão na presença ou ausência de inibidores das MMPs. A invasão através do Matrigel foi inibida pelo pan inibidor de MMPs GM6001 de forma concentração-dependente, enquanto o inibidor específico da MMP13 CL82918 não demonstrou efeito significativo (Gráfico 3).



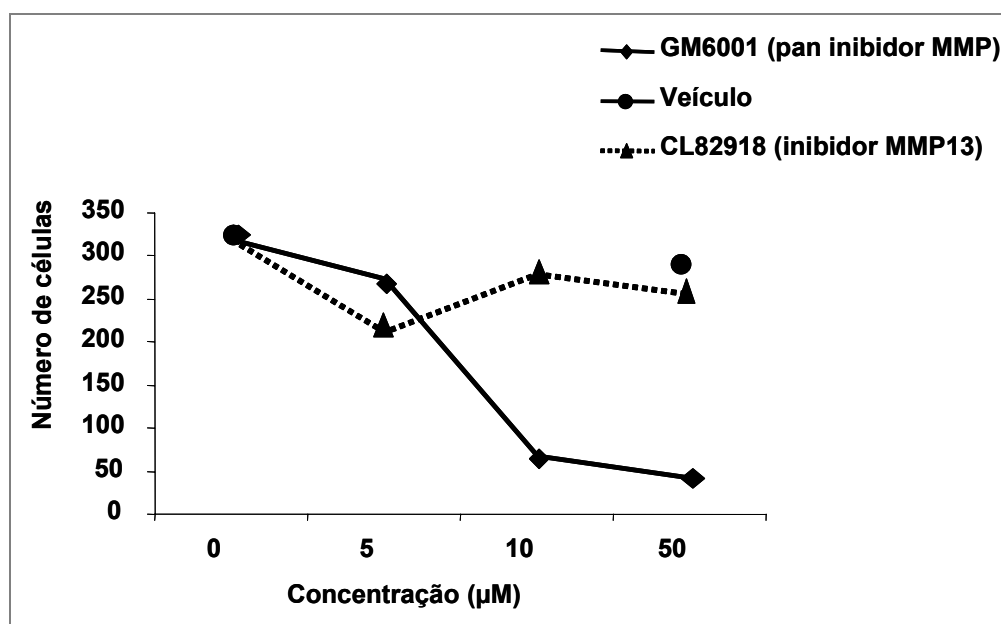


GRÁFICO 3 - INVASÃO INDUZIDA POR BRAF É INIBIDA POR UM PAN INIBIDOR DE MMPs MAS NÃO POR UM INIBIDOR ESPECÍFICO DE MMP13

NOTA – VEÍCULO: DMSO

## 6 DISCUSSÃO

CPTs estão associados a mutações mutualmente exclusivas em pelo menos seis genes diferentes que sinalizam através da via MAPK quinase. Existem fortes evidências de que pelo menos 3 destes oncogenes (as recombinações *RET/PTC* e as mutações do *BRAF* e *RAS*) são eventos iniciais na transformação da célula folicular tireoidiana. Nós realizamos o perfil de expressão gênica de células PCCL3 de tireóide de rato com expressão aguda de *RET/PTC3* e *BRAF*<sup>V600E</sup> para explorar as consequências iniciais da ativação destas oncoproteínas. Foi demonstrado previamente que a ativação de ERK mediada por *RET/PTC3* requer *BRAF* (MITSUTAKE et al., 2006) e por isto, para identificar de forma mais acurada os genes dependentes da via MAPK quinase, nós realizamos o perfil de expressão gênica após ativação do *RET/PTC3* com inativação do *BRAF* por RNAi.

O número de genes modulados por *RET/PTC3* foi mais que o dobro daqueles ativados por *BRAF*. Este achado era esperado, já que *RET/PTC* está acima da via e pode sinalizar através de muitos outros efetores além da via MAPK quinase. Aproximadamente 25% dos genes foram co-regulados por *RET/PTC3* e *BRAF*, demonstrando dependência da via da MAPK quinase. Quando foi aplicado um critério mais rigoroso (apenas genes não regulados por *RET/PTC3* na ausência de *BRAF*), apenas 14% dos genes mantiveram esta dependência. Melillo et al. (2005) realizaram um estudo de microarranjo em células PCCL3 expressando cronicamente *RET/PTC3*, os oncogenes *RAS* e *BRAF*, e *RET/PTC3* mutantes Y1062F e Y1015F (os últimos são incapazes de sinalizar via os respectivos resíduos de tirosinas da oncoproteína *RET/PTC3*). Os autores encontraram uma proporção maior de genes dependentes da via MAPK regulados por *RET/PTC3*. Nesse estudo, 48% dos genes ativados e 36% dos inibidos via *RET/PTC3* foram co-regulados por *BRAF* e 90% destes precisaram da integridade da Y1062 da molécula do RET. Os modelos experimentais diferem bastante. Os pesquisadores examinaram células PCCL3 com expressão crônica e estável das oncoproteínas citadas que não necessitavam de TSH para crescerem. A independência do TSH não é adquirida

diretamente pela expressão de RET/PTC (WANG et al., 2003) ou BRAF (MITSUTAKE et al., 2005), indicando que mudanças adicionais devem ter ocorrido no processo de seleção das células. Em contraste, os genes que foram identificados em nosso estudo foram ativados ou inibidos rapidamente após a expressão das oncoproteínas. A tirosina 1062 da molécula do RET é um local de contato para o Src e colágeno, sua substituição inativa de forma eficiente o recrutamento do RAS e ativação de RAF/MAPK. Entretanto, este mesmo resíduo interage com Enigma e FRS2 resultando em ruptura mais profunda da sinalização podendo impedir a regulação de genes dependentes da via MAPK assim como de outros dependentes de outras vias. Por outro lado, a inativação do BRAF, que resulta em uma supressão quase completa da fosforilação de ERK1/2 via RET/PTC, poderia ainda permitir expressão residual de BRAF devido inativação incompleta. Portanto, aqueles genes que preencheram os 3 critérios, isto é, regulados por RET/PTC3 e BRAF e ausentes nas células com a inativação do BRAF, são certamente dependentes da via MAPK e conferem bons dados para gerar hipóteses sobre as consequências da ativação constitutiva desta via em células tireoidianas.

A maior parte dos genes ativados que não necessitavam BRAF estão envolvidos na resposta imunológica adquirida e muitos deles pertencem a via do interferon (IFN). Estes achados confirmam estudo anterior onde foi realizado um microarranjo apenas com células PTC3-5 em um único tempo de ativação com doxaciiclina e 4273 genes conhecidos (PUXEDDU et al., 2005). Entretanto, nosso estudo demonstrou que a maior parte destes genes não precisam da via MAPK para sua expressão. Os prováveis mediadores deste grupamento de genes são os transdutores de sinal e ativadores da transcrição 1 (STAT1) e STAT3, baseado em dados preliminares não publicados de nosso grupo (ZHANG et al., não publicado).

A inibição discreta dos genes do complexo I da MRC é incerta e estudos diferentes relatam efeitos conflitantes na sobrevivência celular. Desta forma, retenona, um inibidor seletivo deste complexo e do fator de necrose tumoral induziu aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, liberação de citocromo C e apoptose em células de leucemia ML-1 (HIGUSHI; PROSKE; YEH, 1998). Em contraste, a maior

parte da literatura, refere que a inibição do complexo I da MRC protege a célula da apoptose (CHAUVIN et al., 2001). Mutações nestes genes foram recentemente descritas em carcinoma medular de tireóide (ABU-AMERO et al., 2006), porém o seu significado permanece incerto.

Apesar de a maior parte dos genes associados a resposta imunológica adaptativa não serem dependentes de BRAF, um pequeno grupo destes genes, envolvidos na resposta inata, foram marcadamente regulados via BRAF. Entre eles estão os fatores quimiotáticos para macrófagos e monócitos MCP1, MCP3, GM-CSF e CCL15. Russell et al. (2003) demonstraram que a expressão de MCP1 e GM-CSF em células PCCL3 era ativada através de RET/PTC3 e necessitava da integridade do domínio tirosino quinase do RET. Macrófagos infiltrando CPTs humanos são encontrados em até 70% dos casos (FIUMARA et al., 1997). A infiltração de macrófagos também foi descrita em tireóide de camundongos transgênicos com hiperexpressão de RET/PTC (RUSSELL; ENGILES; ROTHSTEIN, 2004) e BRAF (KNAUF et al., 2005) na tireóide. No último estudo a presença de macrófagos foi encontrada em até 90% dos camundongos Tg-BRAF. O papel da ativação crônica da resposta inata no desenvolvimento de neoplasias tem sido estudado extensivamente. Devido a habilidade destes fatores quimiotáticos produzirem, quimocinas, MMPs, radicais livres e outros mediadores esses podem ser moléculas importantes na progressão do câncer (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006). Este efeito poderia ocorrer por ação direta na célula neoplásica promovendo dano ao DNA ou por produção parácrina de fatores de crescimento. Macrófagos que estão associados a tumores podem promover remodelação da matriz extracelular e angiogênese. Macrófagos CD11b<sup>+</sup> estão associados a linfangiogênese em condições patológicas especificamente em um modelo experimental de inflamação de córnea (MARUYAMA et al., 2005). Como CPTs com mutação em *BRAF* apresentam prevalência elevada de metástases para linfonodos, é possível que o recrutamento de macrófagos/monócitos mediado por BRAF possa contribuir para a disseminação linfática. Recentemente foi evidenciada uma associação entre infiltração de macrófagos em tumores de tireóide e fatores de pior prognóstico e redução

de sobrevida, principalmente em carcinomas pouco diferenciados, confirmando esta hipótese (RYDER et al., 2008).

As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco que degradam componentes da matriz extracelular e membrana basal. MMPs são sintetizadas em uma forma latente, os zimogênios. A produção da enzima ativa requer uma remoção proteolítica de uma parte da molécula, o pró-domínio. Elas são subdivididas em collagenases, estromelinas, gelatinases e MMP ligada a membrana plasmática (MT-MMP) baseado no substrato de preferência. A habilidade das células neoplásicas de degradar a matriz extracelular ao seu redor, é fundamental para a invasão de tecidos subjacentes, para entrar e sair de vasos sanguíneos e linfáticos e de enviar metástases para outros tecidos. As MMPs são moléculas candidatas para esta tarefa já que podem degradar qualquer componente da matriz e sua expressão está aumentada em virtualmente todos os tipos de câncer e em muitas linhagens celulares de câncer. A hiperexpressão de MMPs está associada a invasão celular e prognóstico desfavorável em câncer (COUSSENS; FINGLETON; MATRISIAN, 2002). A expressão de MMPs tem sido estudada em câncer de tireóide de humanos, cultura de células e no soro de pacientes com câncer de tireóide. A expressão de MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 estava aumentada em CPTs comparada com tecido normal (NAKAMURA et al., 1999; MAETA; OHGI; TERADA, 2001). Em contraste, em cultura de células de câncer de tireóide, foi encontrado um perfil mais amplo de hiperexpressão de MMPs, com elevação de MMP1, MMP2, MMP9, MMP11e MMP13 em comparação com cultura de células de tireóide normal (BALDINI et al., 2004). Aumento de MMP2 (KOMOROWSKI et al., 2002) e MMP9 (LIN; WANG; SHEU, 2003) no soro de pacientes com CPT também foi reportado. Entretanto, associação com mutações presentes em CPTs humanos não foi investigada. Neste estudo nós demonstramos a indução preferencial de MMP3 e MMP9 e exclusiva de MMP13 por  $BRAF^{V600E}$  em comparação a RET/PTC3 em células PCCL3. Estes efeitos do oncogene *BRAF* se manifestaram através de uma maior invasão comparadas às células que expressam RET/PTC3 e foram suprimidos quando introduzido um inibidor de MMPs de amplo espectro. Isto poderia explicar, em parte,

a maior predisposição de CPTs com a mutação *BRAF* em invadir tecidos subjacentes. Estas observações precisam ser testadas apropriadamente em tecidos de câncer de tireóide humano devidamente genotipados. Como a indução de MMP13 ocorreu exclusivamente em células *BRAF*, nós examinamos a contribuição da invasão através do Matrigel induzida por *BRAF* em células PCCL3 associada a adição de um inibidor específico da MMP13 (CL82198) e não encontramos contribuição desta MMP para invasividade neste modelo experimental. A presença da MMP13 é fundamental para a ossificação endocondral (INADA et al., 2004) e poderíamos especular que a expressão desta protease facilitaria a colonização óssea por metástases de câncer de tireóide.

A expressão das MMPs é regulada de forma transcricional por citocinas e fatores de crescimento. *MMP1*, *MMP3*, *MMP7*, *MMP9*, *MMP10*, *MMP12* e *MMP13* contém sítios de ligação para a proteína ativadora AP-1 em suas respectivas regiões promotoras (OVERALL; LOPEZ-OTIN, 2002). Ambos, *BRAF* e *RET/PTC* sinalizam através da via MAPK, que termina com a fosforilação de ERK e ativação de vários fatores de transcrição, entre eles AP-1. Isto poderia explicar a habilidade destas oncoproteínas em induzir MMPs. O motivo da diferença da expressão das MMPs entre *RET/PTC3* e *BRAF* é incerto, porém pode estar associado a intensidade da ativação da ERK, a qual é muito maior após a ativação do oncogene *BRAF* comparada ao *RET/PTC3* em nosso modelo experimental (dados não demonstrados). Vários outros fatores de transcrição têm papel importante na modulação da expressão das MMPs, incluindo ETS, NF- $\kappa$ B e STATs, entre outros (OVERALL; LOPEZ-OTIN, 2002). A ativação da STAT1 mediada pelo INF- $\gamma$  inibe a expressão de MMP13 em queratinócitos humanos transformados (BALDINI et al., 2004). *RET/PTC3* marcadamente induz a fosforilação de STAT 1 e STAT3 (HWANG et al., 2004, HWANG et al., 2003), enquanto *BRAF*<sup>V600E</sup> não o faz, o que poderia contribuir para o achado da hiperexpressão de MMP13 apenas em células *BRAF*. Em células de câncer humano WRO e NPA com indução de *BRAF*<sup>V600E</sup> por doxaciclina houve aumento da expressão das MMPs e invasão através do matrigel mediada pela ativação da via de sinalização do NF- $\kappa$ B, demonstrando outra maneira pelo qual *BRAF* induz a expressão das MMPs (PALONA et al. 2006).

Os níveis de RNAm de MMP2 e MT1-MMP não foram induzidos por BRAF nem por RET/PTC, o que é consistente com o fato de que nenhuma delas apresenta sítios para AP-1 em suas regiões promotoras. No entanto, nós demonstramos o aumento da secreção e ativação da pró-MMP2 após a expressão das oncoproteínas. A ativação da MMP2 requer a presença de TIMP2 e MT1-MMP, os quais formam um complexo ternário na superfície celular que ativa a MMP2 por clivagem (BUTLER et al., 1998). Este processo é dependente da concentração de MT1-MMP, entretanto o papel do TIMP2 é muito mais complexo. TIMP2 é necessário, porém altas concentrações podem bloquear a ativação de MMP2 (BUTLER et al., 1998). Nós encontramos uma modesta inibição de MT1-MMP e TIMP2 em células PC-BRAF<sup>V600E</sup> e PTC 3-5 confirmados por RT-PCR. A inibição de TIMP2 poderia explicar, em parte, a ativação da MMP2 em nosso sistema. O aumento da secreção de MMP2 na ausência de regulação transcricional, poderia também ser um fenômeno dependente da via MAPK, já que a secreção da MMP2 é um processo dependente da PKC e ERK, ao menos em células de músculo ciliar humano (HUSAIN; JAFRI; CROSSON, 2005).

Apesar da grande quantidade de dados pré clínicos implicando a expressão das MMPs na progressão do câncer, os ensaios clínicos utilizando inibidores das MMPs em pacientes com câncer foram desapontadores. O estágio clínico dos tumores e a falta de marcadores para confirmar a atividade inibitória das MMPs são alguns dos pontos fracos destes estudos. Além disto, os substratos das MMPs são complexos e diversos, e sua degradação podem levar a efeitos independentes da degradação em si, incluindo estimulação da proliferação celular ou indução de apoptose (COUSSENS; FINGLETON; MATRISIAN, 2002). Portanto, é prematuro rejeitar a significância da hiperexpressão das MMPs em neoplasias baseado na falência dos ensaios clínicos.

Apesar do foco de nosso estudo ter sido o papel das oncoproteínas na sinalização via MAPK e expressão gênica, é importante acrescentar que a alteração da sinalização da via fosfatidilinositol – 3 – fosfato (PI3K) tem um papel proeminente na patogênese do câncer de tireóide. A perda da expressão do *PTEN* (FRISK et al., 2002) e mutações ativadoras do *RAS* resultam na ativação do AKT, principalmente

em neoplasias foliculares. Além disto, mutações somáticas da *PIK3CA* (GARCIA-ROSTAN et al., 2005), gene que codifica a unidade catalítica da PI3K, foram encontradas em 23% dos carcinomas anaplásicos e a ativação da AKT tem sido associada a invasividade do câncer de tireóide (VASKO et al., 2004).



## 7 CONCLUSÕES

1. Nosso estudo demonstrou diferença significativa entre algumas das categorias funcionais de genes ativados por *RET/PTC3* e *BRAF* em células tireoidianas PCCL3 de rato. *RET/PTC3* modulou uma quantidade maior de genes que  $BRAF^{V600E}$ . Aproximadamente 25% dos genes induzidos ou inibidos por *RET/PTC3* necessitaram *BRAF* para sua expressão.
2. A maior parte dos genes induzidos por *RET/PTC3* que codificam componentes da via do IFN e resposta imune não dependem de *BRAF*. Genes que codificam enzimas da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons foram inibidos de forma dependente de *BRAF*. A indução e/ou ativação de metaloproteinases é dependente de *BRAF*. Células PCCL3 que expressam  $BRAF^{V600E}$  demonstraram maior indução e ou ativação das MMPs.
3. Os dados foram validados por RT-PCR, *western blotting*, zimografos e estudos funcionais. A indução preferencial de MMPs por *BRAF* se traduziu em maior invasão através do matrigel demonstrando maior agressividade deste oncogene no modelo experimental utilizado.

## REFERÊNCIAS

- ABU-AMERO, K. K. et al. Association of mitochondrial DNA transversion mutations with familial medullary thyroid carcinoma/multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome. **Oncogene**, v.25, p.677-684, 2006.
- BALDINI, E. et al. Expression of matrix metalloproteinases and their specific inhibitors in normal and different human thyroid tumor cell lines. **Thyroid**, v.14, p.881-888, 2004.
- BEGUN, S. et al. BRAF mutations in anaplastic thyroid carcinoma: implications for tumor origin, diagnosis and treatment. **Mod Pathol**, v.17, p.1359-1363, 2004.
- BUTLER, G. S. et al. The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. **J Biol Chem**, v.273, p.871-880, 1998.
- CASTELLONE, M. D. et al. Rasmediated apoptosis of PCCL 3 rat thyroid cells induced by RET/PTC oncogenes. **Oncogene**, v.22, p.246-255, 2003.
- CASTELLONE, M. D. et al. Functional expression of the CXCR4 chemokine receptor is induced by RET/PTC oncogenes and is a common event in human papillary thyroid carcinomas. **Oncogene**, v.23, p.5958-5967, 2004.
- CASTRO, P. et al. PAX8-PPAR $\gamma$  rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, v.91, p.213-220, 2006.
- CHAUVIN, C. et al. Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. **J Biol Chem**, v.276, p.41394-41398, 2001.
- CHEN, A.Y.; JEMAL, A.; WARD, E.M. Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988-2005. **Cancer**, v.115, p.3801-3807, 2009.
- CIAMPI, R. et al. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. **J Clin Invest**, v.115, p.94-101, 2005.
- COUSSENS, L. M.; FINGLETON, B.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. **Science**, v.295, p.2387-2392, 2002.
- DAVIES, L.; WELCH, H. G. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. **JAMA**, v.295, p.2164-2167, 2006.
- DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nat Rev Cancer**, v.6, p.24-37, 2006.
- DUDOIT, S.; FRIDLAND, J. A prediction-based resampling method for estimating the number of clusters in a dataset. **Genome Biol**, v.3, RESEARCH0036, 2002.
- DURANTE, C. et al. Long term outcome of 444 patients with distant metastasis from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. **J Clin Endocrinol Metab**, v.91, n.8, p.2892-2899, 2006.

ELISEI, R. et al. BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. **J Clin Endocrinol Metab**, v.93, p.3943-3949, 2008.

ESZLINGER, M. et al. Perspectives and Limitations of Microarray-Based Gene Expression Profiling of Thyroid Tumors. **Endocr Rev**, v.28, p.322-338, 2007.

FAGIN, J. A. How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy. **J of Endocrinol**, v.183, p249-253, 2004.

FIORE, A.P.Z.P; FUZIWARA, C.S.; KIMURA, E.T. High iodine concentrate attenuates RET/PTC3 oncogene activation in thyroid follicular cells. **Thyroid**, v.19, p1249-1256, 2009.

FIUMARA, A. et al. In situ evidence of neoplastic cell phagocytosis by macrophages in papillary thyroid cancer. **J Clin Endocrinol Metab**, v.82, p.1615-1620, 1997.

FRATTINI, M. et al. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. **Oncogene**, v.23, p.7436-7440, 2004.

FRISK, T. et al. Silencing of the PTEN tumor-suppressor gene in anaplastic thyroid cancer. **Genes Chromosomes Cancer**, v.35, p.74-80, 2002.

FUSCO, A.; SANTORO, M. 20 years of RET/PTC in thyroid cancer: clinico-pathological correlations. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.51, p.731-735, 2007.

GARCIA-ROSTAN, G. et al. Ras mutation is associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. **J Clin Oncol**, v.21, p.3226-3235, 2003.

GARCIA-ROSTAN, G. et al. Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. **Cancer Res**, v.65, p.10199-10207, 2005.

GIORDANO, T. J. et al. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. **Oncogene**, v.24, p.6646-6656, 2005.

GRIECO, M. 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**, v.60, p.557-563, 1990.

HIGUSHI, M.; PROSKE, R. J.; YEH, E. T. Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. **Oncogene**, v.17, p.2515-2524, 1998.

HOSACK, D. A. et al. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. **Genome Biol**, v.4, R70, 2003.

HUSAIN, S.; JAFRI, F.; CROSSON, C. E. Acute effects of PGF2alpha on MMP-2 secretion from human ciliary muscle cells: a PKC- and ERK-dependent process. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v.46, p.1706-1713, 2005.

HWANG, E. S. et al. Regulation of STAT1 and STAT1-dependent genes by RET/PTC (rearranged in transformation/papillary thyroid carcinoma) oncogenic tyrosine kinases. **Mol Endocrinol**, v.18, p.2672-2684, 2004.

HWANG, J. H. et al. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 by oncogenic RET/PTC (rearranged in transformation/papillary thyroid carcinoma) tyrosine kinase: roles in specific gene regulation and cellular transformation. **Mol Endocrinol**, v.17, p.1155-1166, 2003.

INADA, M. et al. Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.101, p.17192-17197, 2004.

ITO, T. et al. In vitro irradiation is able to cause RET oncogene rearrangement. **Cancer Res**, v.53, p.2940-2943, 1993.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2007. **CA Cancer J Clin**, v.57, n.1, p.43-66, 2007.

JHIANG, S. M. et al. Targeted expression of the ret/PTC1 oncogene induces papillary thyroid carcinomas. **Endocrinology**, v.137, p.375-378, 1996.

KIMURA E. T. et al. 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**, v.63, p.1454-1457, 2003.

KNAUF, J. A. et al. RET/PTC-induced dedifferentiation of thyroid cells is mediated through Y1062 signaling through SHC-RAS-MAP kinase. **Oncogene**, v.22, p.4406-4412, 2003.

KNAUF, J. A. et al. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. **Cancer Res**, v.65, p.4238-4245, 2005.

KNAUF, J. A.; FAGIN, J. A. Role of MAPK pathway oncoproteins in thyroid cancer pathogenesis and as drug targets. **Curr Opin Cell Biol**, v.21, p.296-303, 2009.

KOMOROWSKI, J. et al. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases and angiogenic cytokines in peripheral blood of patients with thyroid cancer. **Thyroid**, v.12, p.655-662, 2002.

LEBOUEF, R. et al. BRAFV600E mutation is associated with preferential sensitivity to mitogen-activated protein kinase kinase inhibition in thyroid cancer cell lines. **J Clin Endocrinol Metab**, v.93, p.2194-2201, 2008.

LIN, S. Y.; WANG, Y. Y.; SHEU, W. H. Preoperative plasma concentrations of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9 are associated with stage progression in papillary thyroid cancer. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v.58, p.513-518, 2003.

MACRAE, M. et al. A conditional feedback loop regulates Ras activity through EphA2. **Cancer Cell**, v.8, p.111-118, 2005.

MAETA, H.; OHGI, S.; TERADA, T. Protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in papillary thyroid carcinomas. **Virchows Arch**, v.438, p.121-128, 2001.

MARUYAMA, K. et al. Inflammation induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. **J Clin Invest**, v.115, p.2363-2372, 2005.

- MELILLO, R. M. et al. The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. **J Clin Invest**, v.115, p.1068-1081, 2005.
- MITSUTAKE, N. et al. Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. **Cancer Res**, v.65, p.2465-2473, 2005.
- MITSUTAKE, N. et al. BRAF mediates RET/PTC-induced MAPK activation in thyroid cells: functional support for requirement of the RET/PTC-RAS-BRAF pathway in papillary thyroid carcinogenesis. **Endocrinology**, v.147, p.1014-1019, 2006.
- MULLER, P.Y. et al. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. **Biotechniques**, v.32, p.1372-1379, 2002.
- NAKAMURA, H. et al. Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human papillary thyroid carcinomas. **Cancer Res**, v.59, p.467-473, 1999.
- NAMBA, H. et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. **J Clin Endocrinol Metab**, v.88, p.4393-4397, 2003.
- NIKIFOROVA, M. N. et al. Prevalence of RET/PTC rearrangements in Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinomas. **Int J Surg Pathol**, v.10, p.15-22, 2002.
- NIKIFOROVA, M. N. et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. **J Clin Endocrinol Metab**, v.88, p.5399-5404, 2003.
- OLER, G.; CERUTTI, J. M. High prevalence of BRAF mutation in a brazilian cohort of patients with sporadic papillary thyroid carcinomas correlation with more aggressive phenotype and decreased expression of iodide-metabolizing genes. **Cancer**, v.115, p.972-980, 2009.
- OUYANG, B. et al. Inhibitors of Raf kinase activity block growth of thyroid cancer cells with RET/PTC or BRAF mutations in vitro and in vivo. **Clin Cancer Res**, v.12, p.1785-1793, 2006.
- OVERALL, C. M., LOPEZ-OTIN, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. **Nat Rev Cancer**, v.2, p.657-672, 2002.
- PACINI, F. et al. Recombinant human thyrotropin-stimulated serum thyroglobulin combined with neck ultrasonography has the highest sensitivity in monitoring differentiated thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, v.88, p. 3668-3673, 2003.
- PALONA, I. et al. BRAF<sup>V600E</sup> promotes invasiveness of thyroid cancer cells through nuclear factor κB activation. **Endocrinology**, v.147, p.5699-5707, 2006.
- POWELL, D. J. J. et al. The RET/PTC3 oncogene: metastatic solid-type papillary carcinomas in murine thyroids. **Cancer Res**, v.58, p.5523-5528, 1998.
- PUXEDDU, E. et al. RET/PTC-induced gene expression in thyroid PCCL3 cells reveals early activation of genes involved in regulation of the immune response. **Endocr Relat Cancer**, v.12, p.319-334, 2005.

QUIROS, R. M. et al. Evidence of one subset of anaplastic thyroid carcinoma are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations. **Cancer**, v.103, p.2261-2268, 2005.

REINER, A.; YEKUTIELI, D.; BEIJAMINI, Y. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. **Bioinformatics**, v.19, p.368-375, 2003.

RIESCO-EIZAGUIRRE, G.; SANTISTEBAN, P. New insights in thyroid follicular cell biology and its impact in thyroid cancer therapy. **Endocr Relat Cancer**, v.14, p.957-977, 2007.

ROUXEL, A. et al. Prognostic factors associated with the survival of patients developing loco-regional recurrences of differentiated thyroid carcinomas. **J Clin Endocrinol Metab**, v.89, n.11, p.5362-5368, 2004.

RUSSELL, J. P. et al. Tyrosine kinase oncoprotein, RET/PTC3, induces the secretion of myeloid growth and chemotactic factors. **Oncogene**, v.22, p.4569-4577, 2003.

RUSSELL, J. P.; ENGILES, J. B.; ROTHSTEIN, J. L. Proinflammatory mediators and genetic background in oncogene mediated tumor progression. **J Immunol**, v.172, p.4059-4067, 2004.

RYDER, M. et al. Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. **Endocr Relat Cancer**, v.15, p.1069-1074, 2008.

SAAVEDRA, H.I. et al. The RAS oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the MAPK pathway. **Oncogene**, v.19, p.3948-3954, 2000.

SANTORO, M. et al. Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of ret proto-oncogene in human thyroid papillary carcinoma. **Oncogene**, v.9, p.509-516, 1994.

SANTORO, M. et al. Development of thyroid papillary carcinomas secondary to tissue-specific expression of the RET/PTC1 oncogene in transgenic mice. **Oncogene**, v.12, p.1821-1826, 1996.

SANTORO, M. et al. Molecular mechanisms of RET activation in human cancer. **Ann N Y Acad Sci**, v.963, p.116-121, 2002.

SHIROKAWA, J. M. et al. Conditional apoptosis induced by oncogenic ras in thyroid cells. **Mol Endocrinol**, v.14, p.1725-1738, 2000.

SOARES, P. et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. **Oncogene**, v.22, p.4578-4580, 2003.

SOARES, P. et al. BRAF mutation typical of papillary thyroid carcinoma are more frequently detected in undifferentiated than in insular and insular-like poorly differentiated carcinomas. **Virchows Archiv**, v.444, p.572-576, 2004.

SUGG, S. L. et al. Distinct multiple RET/PTC gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia. **J Clin Endocrinol Metab**, v.83, p.4116-4122, 1998.

VASKO, V. et al. Akt activation and localization correlate with tumor invasion and oncogene expression in thyroid cancer. **J Med Genet**, v.41, p.161-170, 2004.

VIGLIETTO, G. et al. RET/PTC oncogene activation is an early event in thyroid carcinogenesis. **Oncogene**, v.11, p.1207-1210, 1995.

VITAGLIANO, D. et al. Thyroid targeting of the N-ras (Gln61Lys) oncogene in transgenic mice results in follicular tumors that progress to poorly differentiated carcinomas. **Oncogene**, v.25, p.5467-5474, 2006.

WANG, J. 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**, v.7, p.1425-1436, 2003.

WOLFINGER, R. D. et al. Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models. **J Comput Biol**, v.8, p.625-637, 2001.

XING, M. BRAF mutation in thyroid cancer. **Endocr Relat Cancer**, v.12, p.245-262, 2005.

XING, M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. **Endocr Rev**, v.28, p.742-762, 2007.

XING, M. et al. BRAF T1796A transversion mutation in various thyroid neoplasms. **J Clin Endocrinol Metab**, v.89, p.1365-1368, 2004.

ZHU, Z. et al. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. **Am J Clin Pathol**, v.120, p.71-77, 2003.

ZHU, Z. et al. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of detection methods and genetic heterogeneity. **J Clin Endocrinol Metab**, v.91, p.3603-3610, 2006.

## **ANEXOS**



**ANEXO 1**

**GENES ASSOCIADOS À CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL (MRC)**

**COM REDUÇÃO SIGNIFICATIVA NO DIA 4 DE TRATAMENTO COM**

**DOXACICLINA COMPARADOS COM CONTROLES.**

GENES	PTC3-5	PC-BRAF <sup>V600E</sup>	PTC3-BRAF <sup>RNAI</sup>
<i>ATP SINTASE CADEIA B</i>	1.01	-1.77	-1.17
<i>ATP SINTASE CADEIA E</i>	-1.69	-2.43	-1.36
<i>ATP SINTASE PROTEÍNA LIGADORA DE LIPÍDEO</i>	-1.76	-2.73	-1.31
<i>ATP SINTASE OLIGOMYCIN SENSITIVITY CONFERRAL PROTEIN</i>	-1.65	-1.72	-1.13
<i>CITOCROMO C OXIDASE POLIPEPTÍDEO VB</i>	-1.21	-1.69	-1.19
<i>CITOCROMO C OXIDASE POLIPEPTÍDEO VIA-HEPÁTICA</i>	-1.26	-1.63	-1.03
<i>CITOCROMO C OXIDASE POLIPEPTÍDEO VIC-1</i>	-1.13	-1.61	-1.07
<b><i>NADH-UBIQUINONA OXIDOREDUTASE SUBUNIDADE 9.6 KDA</i></b>	-1.17	-1.32	1.00
<i>ATP SINTASE CADEIA D</i>	-1.14	-1.61	-1.19
<i>ATP SINTASE CADEIA F</i>	-1.46	1.68	-1.24
<b><i>NADH-UBIQUINONA OXIDOREDUTASE SUBUNIDADE 15 KDA</i></b>	-1.25	-1.57	-1.15
<b><i>NADH-UBIQUINONA OXIDOREDUTASE SUBUNIDADE 20 KDA</i></b>	-1.35	-1.79	-1.23
<b><i>NADH-UBIQUINONA OXIDOREDUTASE SUBUNIDADE 30 KDA</i></b>	-1.49	-2.08	-1.52
<b><i>NADH-UBIQUINONA OXIDOREDUTASE SUBUNIDADE ASHI</i></b>	-1.70	-2.08	-1.41
<b><i>NADH-UBIQUINONA OXIDOREDUTASE SUBUNIDADE B15</i></b>	-1.59	-1.87	-1.33
<b><i>NADH-UBIQUINONA OXIDOREDUTASE SUBUNIDADE B16.6</i></b>	-1.22	-2.46	-1.02
<b><i>NADH-UBIQUINONA OXIDOREDUTASE SUBUNIDADE B17</i></b>	-1.36	-1.88	-1.22
<b><i>NADH-UBIQUINONA OXIDOREDUTASE SUBUNIDADE B22</i></b>	-1.36	-1.67	-1.25
<b><i>NADH-UBIQUINONA OXIDOREDUTASE SUBUNIDADE B9</i></b>	-1.60	-1.51	-1.29
<b><i>NADH-UBIQUINONA OXIDOREDUTASE SUBUNIDADE SGDH</i></b>	-1.29	-1.87	-1.30
<b><i>NADH-UBIQUINONA OXIDOREDUTASE SUBUNIDADE B14.5B</i></b>	-1.23	-2.58	-1.19
<b><i>NADH-UBIQUINONA OXIDOREDUTASE SUBUNIDADE B17.2</i></b>	-1.41	-1.77	-1.20
<i>COMPLEXO III SUBUNIDADE VI</i>	-1.20	-1.80	-1.03
<i>RECEPTOR DA SULFONILUREIA 1</i>	-1.40	-2.09	-1.06

NOTA: Em negrito estão representados os genes associados ao complexo I da MRC.

## ANEXO 2

## GENES DE FOSFATASES ASSOCIADAS A VIA DA MAPK NO DIA 4 DE TRATAMENTO COM DOXACICLINA COMPARADOS COM CONTROLE

GENES	PTC3-5	PC-BRAF <sup>V600E</sup>	PTC3-BRAF <sup>RNAI</sup>
<b>DUSP 5</b>	<b>7.45</b>	<b>23.22</b>	<b>5.52</b>
<b>DUSP 6 (MKP3)</b>	<b>14.67</b>	<b>14</b>	<b>14.49</b>
DUSP 7 (MKPx)	NS	NS	NS
DUSP1 (MKP1)	-1.87	NS	-1.46
DUSP4 (MKP2)	NS	NS	1.81

NOTA: NS – não significativo. Em negrito as duas fosfatases específicas da via da MAPK.