



# INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DO miR-148a-5p NO PROCESSO METASTÁTICO DO CÂNCER DE TIREOIDE

Palavras-Chave: miRNA-148a-5p; câncer de tireoide; nódulos da tireoide

Autores(as):

Pedro Henrique Rodrigues Lopez, FCM – UNICAMP

Karina Colombero Peres (coorientadora), FCM - UNICAMP

Profa. Dra. Laura Sterian Ward (orientadora), FCM - UNICAMP

## INTRODUÇÃO:

A incidência do câncer de tireoide (CT) vem crescendo no mundo, e um dos desafios enfrentados por médicos hoje é diferenciar casos mais agressivos que merecem intervenções terapêuticas mais complexas em contraste com a maioria dos casos que, por sua evolução indolente, podem ser submetidos apenas a vigilância ativa (1,2).

Muitos estudos vêm demonstrando a desregulação de microRNAs em amostras de tecido de tumores tireoidianos, reforçando a sua importância na regulação de genes sabidamente associados à carcinogênese tireoidiana (3-6). Em trabalho prévio de nosso grupo demonstramos, usando ferramentas de bioinformática e dados disponíveis em bancos de dados como o TCGA e GEO, que o miR-148a-5p está desregulado no CT na presença de metástase linfonodal (MLN). Este miRNA já foi associado a pior prognóstico em outros tipos de câncer (7,8), mas seu papel na progressão dos tumores de tireoide ainda é pouco explorado.

Dessa forma, investigamos a participação de hsa-miR-148a-5p na migração da célula tireoidiana cancerígena derivada de tumores papilíferos com mutação de BRAF (BCPAP) e rearranjo RET/PTC (TPC-1). Especificamente, buscamos:

1. Avaliar a participação do miR-148a-5p no processo de migração celular em cultura celular utilizando ensaio de Lesão de Monocamada;
2. Avaliar a participação do miR-148a-5p no processo de migração e invasão celular em cultura celular utilizando ensaio Câmara de Boyden.

## METODOLOGIA:

### Cultura celular

Duas linhagens celulares mantidas em nosso laboratório foram utilizadas para avaliar a atividade do miR-148a-5p na migração das células tireoidianas. As linhagens derivadas de carcinoma papilífero humano TPC-1 e BCPAP possuem o rearranjo cromossômico RET/PTC1 e a mutação BRAFT1799A, respectivamente. As linhagens foram mantidas em meio DMEM suplementadas com 5% e 10% de soro fetal bovino, respectivamente, em estufa sob condições de 95 % de ar e 5 % de CO<sub>2</sub>, a 37°C, na presença de solução antibiótica e antifúngica.

### Transfecção do mimético hsa-miR-148a-5p

Para a superexpressão do miRNAs utilizamos o sistema mirVana™ (Thermo Fisher). As linhagens celulares foram plaqueadas em triplicatas e após 24 horas o meio de cultura substituído por meio apropriado na ausência de SFB. Para a padronização, o mimético (Thermo Fisher) foi transfectado em duas concentrações diferentes, 10 e 25 nM, utilizando Lipofectamine 2000® (Thermo), segundo instruções do fabricante.

## Migração celular

### 1. Ensaio de Lesão em monocamada

Nas linhagens submetidas à transfecção, com o auxílio de uma ponteira estéril, realizamos uma lesão em linha vertical na monocamada celular no centro de cada poço. O processo de cicatrização foi registrado com câmera acoplada ao computador logo após a realização da lesão nos tempos 0, 16 e 24 h. As imagens obtidas de cada poço foram analisadas com o auxílio do ImageJ® para cálculo das medidas da distância das lesões nos diferentes tempos. Cada imagem foi medida em três diferentes pontos, e os valores da distância em pixels coletados para aplicação estatística.

### 2. Ensaio em Câmara de Boyden modificada

Este ensaio permite a avaliação de migração e invasão celular. Para avaliar a migração foi utilizada a câmara de Boyden modificada contendo insertos de membrana com poros de 8,0µm. Após a transfecção com mimético, as células foram ressuspensas em meio contendo soro fetal bovino e plaqueadas no compartimento superior da câmara. O compartimento inferior foi preenchido com meio contendo 10% de soro fetal bovino. Após 12 h, o meio de cultura foi removido e a câmara foi lavada com PBS. As células do compartimento superior foram removidas e as células no compartimento inferior fixadas, coradas com 0,5% Violeta Cristal e fotografadas em microscópio Nikon Eclipse E600.

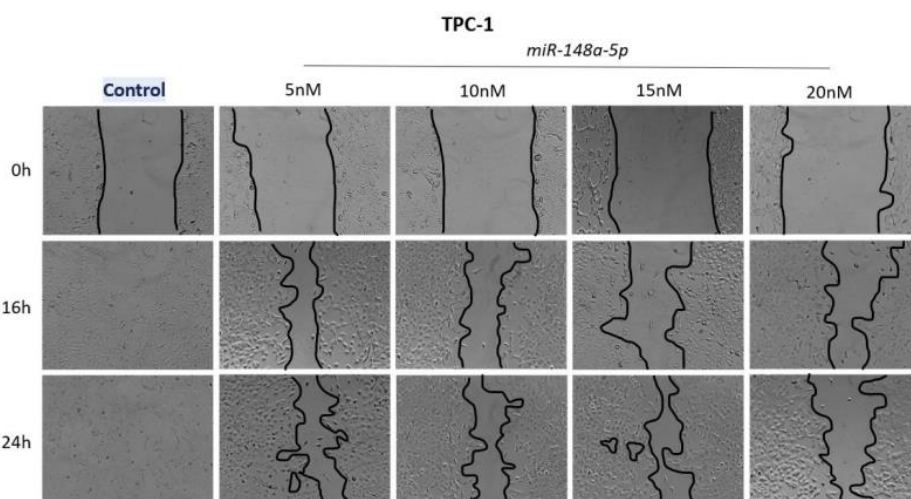
Para os ensaios de invasão celular, foi utilizada matriz extracelular (ECM Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma – liquid, BioReagent), diluída em DMEM. Foram plaqueados 30µL da matriz diluída na parte superior de cada inserto. Após o plaqueamento da matriz, a placa contendo os insertos foi colocada em estufa a 37°C durante duas horas para solidificação. Posteriormente a preparação dos insertos, seguiu-se o mesmo protocolo de plaqueamento, coleta das amostras e fotografia do ensaio de migração.

## Análise dos resultados

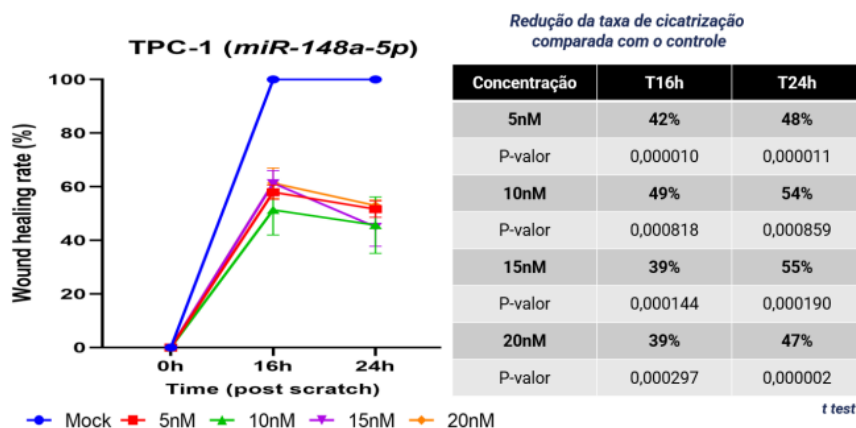
A análise estatística e construção dos gráficos foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism versão 9.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

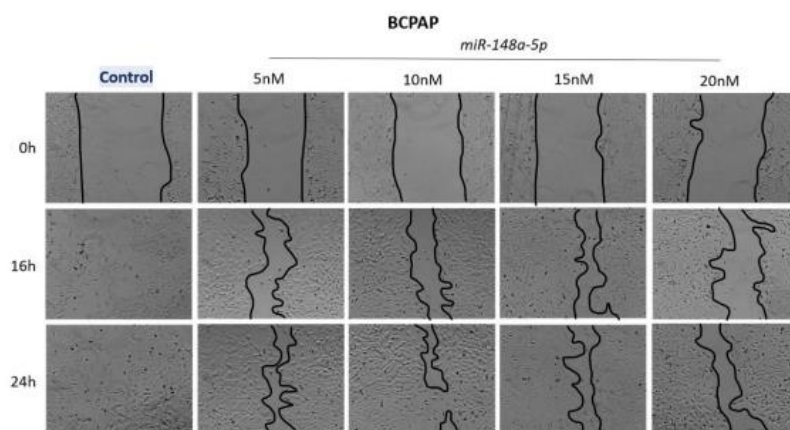
Através do ensaio de lesão em monocamada, observamos que a restauração do miR-148a-5p produziu redução na migração celular, tanto na linhagem de células TPC-1 (Figuras 1 e 2) quanto com as células BCPAP (Figuras 3 e 4). Comparado ao controle, na linhagem TPC-1 todas as concentrações provocaram uma redução na taxa de migração celular das células neoplásicas da tireoide de pelo menos 39% e no máximo 55% (Figura 2). Já com a linhagem BCPAP, todas as concentrações provocaram uma redução de no mínimo 33% e no máximo 65% (Figura 4).



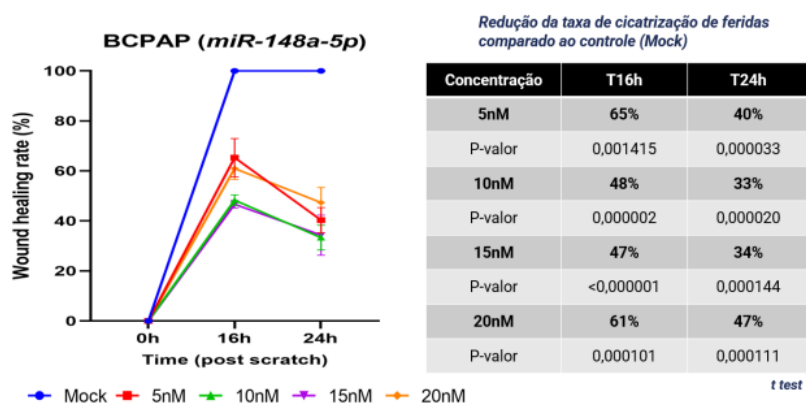
**Figura 1.** Células TPC-1 transfectadas (5-20nM) ou não (controle) com o mimético miR-148a-5p em ensaio de lesão de monocamada. Imagens feitas em aumento de 40x em 0, 16 e 24 horas



**Figura 2.** Taxa de cicatrização das feridas em ensaio de lesão de monocamada em células TPC-1 transfetadas (5-20nM) ou não (controle) com o mimético miR-148a-5p

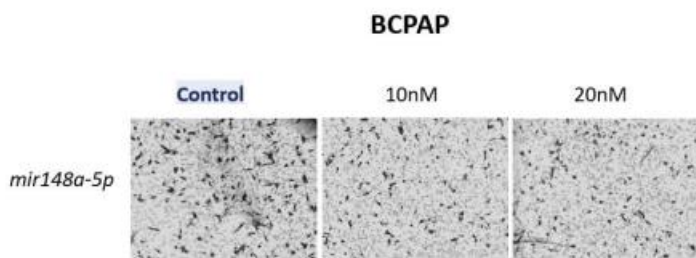


**Figura 3.** Células BCPAP transfetadas (5-20nM) ou não (controle) com o mimético miR-148a-5p em ensaio de lesão de monocamada. Imagens feitas em aumento de 40x em 0, 16 e 24 horas

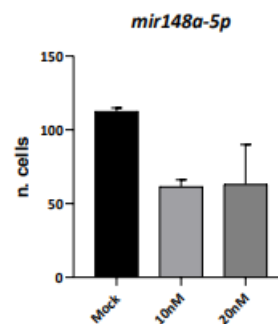


**Figura 4.** Taxa de cicatrização das feridas em ensaio de lesão de monocamada em células BCPAP transfetadas (5-20nM) ou não (controle) com o mimético miR-148a-5p

Em relação ao ensaio de migração em câmara de Boyden modificada, a restauração dos níveis do miR-148a-5p nas células BCPAP diminuiu a migração celular em relação ao grupo controle (Figuras 5 e 6).

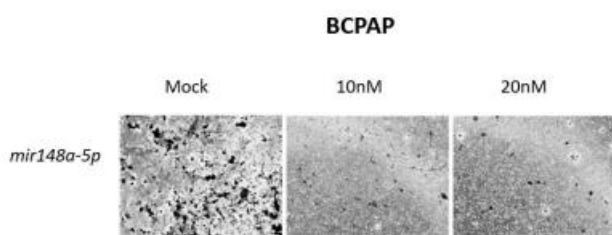


**Figura 5.** Avaliação da taxa de migração através do ensaio de câmara de Boyden modificada. Feito em células BCPAP transfetadas (10-20nM) ou não (controle) com o mimético miR-148a-5p.

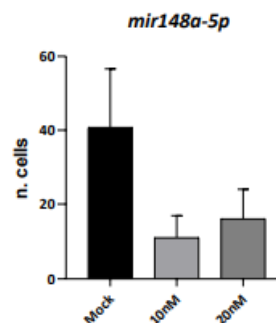


**Figura 6.** Gráfico do número de células que migraram no grupo controle (mock) e nos grupos transfetados (10nM-20nM), em ensaio de câmara de Boyden modificada.

Por fim, no estudo de invasão celular em câmara de Boyden modificada, essa restauração reduziu a invasão em relação ao grupo controle (Figura 7 e 8).



**Figura 7.** Avaliação da taxa de invasão através do ensaio de câmara de Boyden modificada. Feito em células BCPAP transfetadas (10-20nM) ou não (controle) com o mimético miR-148a-5p.



**Figura 8.** Gráfico do número de células que invadiram no grupo controle (mock) e nos grupos transfetados (10nM-20nM), em ensaio de câmara de Boyden modificada.

Logo, os resultados de migração e invasão celular do miR-148a-5p estão de acordo com a hipótese inicial, que teve como base a estreita relação desse miRNA com piora no prognóstico de alguns tipos de câncer, além de dados preliminares do nosso grupo. Portanto, os dados apresentados indicam que sua desregulação negativa está relacionada com a migração e invasão celular, de modo a corroborar a ideia de que participa do processo metastático do câncer de tireoide e ainda pode ser utilizado como marcador de prognóstico e/ou no seguimento dos pacientes com tumores de tireoide. Em estudos anteriores, o miRNA 148a-5p foi relacionado a um pior prognóstico no câncer gástrico (7) e adenocarcinoma ductal pancreático (8), assim como é descrita a relação desse miRNA com diversos genes relacionados a agressividade tumoral como *THBS2*, *P4HA3*, *SERPINH1*, *CDH11*, *BCAT1* e *KCNG3*.

## CONCLUSÕES

Nossos resultados confirmam a participação do miR-148a-5p na migração celular das células de linhagens de carcinoma papilífero humano abrindo perspectivas para novas possibilidades no diagnóstico e no manejo desse tumor.

## BIBLIOGRAFIA

1. Carling T, Udelsman R. **Thyroid cancer**. Annu Rev Med. 2014;65:125-37
2. Ochoa J, Pitt SC. **Less-Intensive Management Options for Low-Risk Thyroid Cancer**. Endocrinol Metab Clin North Am. 2022 Jun;51(2):351-366.
3. Santos MTD, Buzolin AL, Gama RR, Silva E, Dufloth RM, Figueiredo DLA, et al. **Molecular Classification of Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology: Development and Validation of a Highly Sensitive and Specific New miRNA-Based Classifier Test Using Fine-Needle Aspiration Smear Slides**. Thyroid : official journal of the American Thyroid Association. 2018
4. Zhang J, Zhou W, Liu Y, Liu T, Li C and Wang L: **Oncogenic role of microRNA-532-5p in human colorectal cancer via targeting of the 5'UTR of RUNX3**. Oncol Lett 15: 7215-7220, 2018
5. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR and Golub TR: **MicroRNA expression profiles classify human cancers**. Nature 435: 834- 838,2005.
6. Zhang B, Pan X, Cobb GP and Anderson TA: **microRNAs as oncogenes and tumor suppressors**. Dev Biol 302: 1-12, 2007
7. Kawagoe K, Wada M, Idichi T, Okada R, Yamada Y, Moriya S, et al. **Regulation of aberrantly expressed SERPINH1 by antitumor miR-148a-5p inhibits cancer cell aggressiveness in gastric cancer**. J Hum Genet [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2022 Feb 16];65(8):647–56.
8. Idichi T, Seki N, Kurahara H, Fukuhisa H, Toda H, Shimonosono M, et al. **Molecular pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma: Impact of passenger strand of pre-miR-148a on gene regulation**. Cancer Sci [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2021 Apr 26];109(6):2