

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

**Expressão da Desiodase Tipo 3 no Carcinoma
Papilar de Tireóide**

Dissertação de Mestrado

Nadja Zennig

Orientadora: Profa. Dra. Ana Luiza Maia

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós- Graduação em Ciências
Médicas: Endocrinologia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Endocrinologia

Porto Alegre, dezembro de 2010.

AGRADECIMENTOS

Agradeço *a todos* que estiveram ao meu lado nesta longa jornada de aprendizado.

O formato da dissertação segue o modelo recomendado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da UFRGS, sendo apresentada na forma de uma breve introdução sobre o tema, seguido de um artigo original contendo os resultados finais.

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Lista de abreviaturas..... | 5 |
| Resumo..... | 7 |
| Capítulo 1. Introdução: O papel das iodotironinas nas neoplasias humanas..... | 9 |
| 1.1. Hormônios Tireoidianos..... | 10 |
| 1.2. Desiodases..... | 12 |
| 1.3. Hormônios tireoidianos, desiodases e tumorigênese | 15 |
| 1.4. Referências bibliográficas da introdução..... | 26 |
| Capítulo 2. Artigo Original: <i>Increased type 3 deiodinase expression in Human Papillary Thyroid Cancer</i>..... | 36 |

Lista de abreviaturas

- **BMN** - Bócio Multinodular de tireóide
- **cDNA** - Ácido Desoxiribonucléico complementar
- **CPT** - Carcinoma Papilar de Tireóide
- **DBT** - Dibutiril
- **DNA** - Ácido Desoxiribonucléico
- **DTT** - Dietiltreitol
- **D1** - Iodotironina Desiodase tipo I
- **D2** - Iodotironina Desiodase tipo II
- **D3** - Iodotironina Desiodase tipo III
- **FIPE** - Fundo de incentivo à pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
- **FTC** - Follicular thyroid cancer
- **GDNF** - *glial cell line derived neurotrophic factor*
- **GH** - Growth Hormone
- **HCPA** - Hospital de Clínicas de Porto Alegre
- **HEK-293** - Human Embryonic Kidney Cells
- **HT** - Hormônio tireoidiano
- **iRNA** - Ácido ribonucléico de interferência
- **kDa** - kilo Dalton
- **MNG** - Multinodular Goiter
- **mRNA** - Ácido ribonucléico mensageiro
- **N/A** - Não avaliado
- **PCR** - Reação em cadeia da polimerase
- **PTU** - Propiltiouracil
- **RET** - *REarrangement during Transfection*
- **RNA** - Ácido Ribonucléico
- **RT-PCR** - Reação em cadeia da polimerase – Transcriptase reversa
- **R-TSH** - Receptor do Hormônio estimulante da tireóide

- **rT3** - T3 reverso
- **Tg** - Tireoglobulina
- **TH** - Thyroid Hormone
- **TR** - Receptor de TSH
- **TRE** - Elementos responsivos ao T3
- **TSH** - Hormônio estimulante da tireóide
- **T2** - Diiidotironina
- **T3** - 3,5,3'-triiodo-L-tironina
- **T4** - 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tiroxina
- **UV** - Ultra-violeta
- **WHO** - World Health Organization

Resumo

Introdução. A ação dos hormônios tireoidianos é regulada pela atividade das desidases. As três iodotironinas desidases constituem uma família de selenoenzimas que catalisam a remoção do iodo do anel externo ou interno dos hormônios tireoidianos. As desidases tipo 1 (D1) e tipo 2 (D2) ativam o pró-hormônio tiroxina (T4), o principal produto das células foliculares da glândula tireóide, através da sua conversão para o hormônio biologicamente ativo 3,5,5'- triiodotironina (T3). De maneira inversa, a desidase tipo 3 (D3) age através da inativação do T3 para suas formas inativas diiodotironina (T2) e triiodotironina reversa (rT3) inativando os hormônios tireoidianos. A transformação neoplásica benigna ou maligna dos tireócitos promove mudanças na expressão destas enzimas, sugerindo que tanto a D1 como a D2 podem estar envolvidos no processo de tumorigênese. A expressão da D3 está elevada em órgãos embrionários, e no período pós-natal sua expressão se restringe à poucos tecidos, como sistema nervoso central e pele. Estudos prévios demonstram que a expressão da D3 pode ser reativada em tecidos durante condições patológicas como doença crítica e desdiferenciação tumoral. De fato, a presença da D3 tem sido demonstrada em linhagens celulares malignas e em vários tumores humanos incluindo astrocitomas, oligodendromas, gliossarcomas, glioblastoma multiforme e carcinomas basocelulares de pele. Pouco se conhece sobre a expressão da D3 em tecidos tumorais tireoidianos.

Objetivos. Avaliar a expressão e atividade da D3 em amostras de carcinoma papilar de tireóide (CPT) e correlacionar com a apresentação clínica e características oncológicas destes tumores.

Material e Métodos. Amostras de tecido tireoidiano humano foram coletados consecutivamente de 18 pacientes não selecionados submetidos à tireoidectomia total no Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre 2005 e 2009. Foram coletadas 18 amostras de CPT e tecido normal subjacente. A atividade de D3 foi aferida pela técnica de cromatografia em papel e os níveis de mRNA pela técnica de *real-time* PCR. Para o

estudo da regulação gênica foram utilizadas as linhagens celulares de carcinoma papilar de tireóide (linhagem K-1).

Resultados. Do total de 18 pacientes, 7 (38,9%) apresentavam doença restrita à glândula, 7 (38,9%) tinham metástases linfonodais enquanto 4 (11%) apresentavam metástases à distância. A mediana do tamanho tumoral foi de 2,3 cm (0,8 a 8 cm). Transcritos de mRNA da enzima D3 foram detectados em todas as amostras de tecido normal e CPT analisadas, estando significativamente aumentada no tecido neoplásico (~5 vezes, $P=0,001$). Embora atividade da D3 não tenha sido detectada no tecido tireoidiano normal, todas as amostras de CPT apresentaram níveis elevados de atividade enzimática (0.79 ± 0.51 fmol/mg.prot.min). De modo interessante, o aumento da atividade da D3 foi associado ao tamanho e estágio tumoral ($P=0.002$ e $P=0.003$, respectivamente). Análises adicionais realizadas na linhagem celular de CPT demonstraram que a adição de T3 ou AMPc ao meio de cultura induziu aumento da atividade da D3 enquanto o hipotireoidismo inibiu a expressão enzimática, sugerindo que a regulação da D3 encontra-se preservada.

Conclusão. Esses resultados indicam que a transformação maligna da celular folicular tireoidiana induz a expressão da D3 por mecanismos pré-transcricionais. A associação entre os níveis aumentados da atividade da D3 e doença avançada corrobora para o papel da concentração intracelular de T3 na proliferação e/ou dediferenciação celular tireoidiana.

Capítulo 1

Introdução:

*O papel das iodotironinas nas neoplasias
humanas*

1.1. Hormônios tireoidianos

Os hormônios tireoidianos (HT) são compostos iodados produzidos pelas células foliculares da glândula tireóide na forma de um precursor inativo chamado tiroxina (3,5,3',5'-tetraiodo-L-tiroxina, T4) e em menor grau, como o hormônio biologicamente ativo triiodotironina (3,5,3'-triiodo-L-tironina, T3). São pequenas moléculas ligantes hidrofóbicas que necessitam da ligação com outras proteínas para serem distribuídas até os tecidos alvo e transportadas através do interstício e compartimentos celulares. Os hormônios tireoidianos influenciam a expressão gênica em virtualmente todos os tecidos de animais vertebrados, onde estimulam a diferenciação e proliferação celular e controlam o crescimento, o desenvolvimento e o metabolismo intermediário energético e estrutural desses organismos (1).

A sinalização hormonal tireoidiana resulta de uma interação do ligante T3 com receptores nucleares da família c-erbA (TRs), localizados em seqüências específicas conhecidas como elementos responsivos ao hormônio tireoidiano (TREs) na região promotora dos genes-alvo e que atuam como fatores de transcrição modulados por ligantes (TR α 1, TR β 1 e TR β 2), como fatores de transcrição independentes de ligante (TR α 2 ou rev-erbA) ou através da formação de heterodímeros com receptores retinóides (RXRs ou RARs). A formação do complexo hormônio-receptor causa alterações na composição do complexo transcricional que então pode estimular ou reprimir a transcrição e expressão dos genes alvo (1,2).

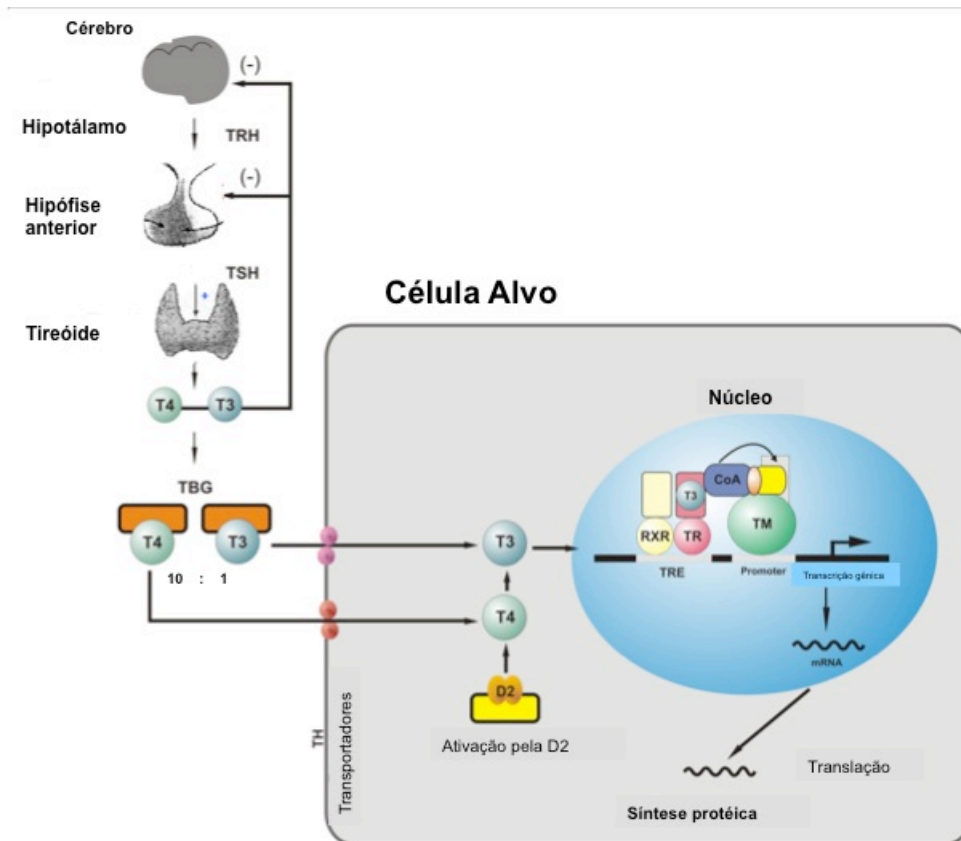


Figura 1: Diagrama esquemático ilustrando a regulação da síntese e secreção dos hormônios tireoidianos e as ações mediadas pelo receptor de hormônio tireoidiano. (A) Eixo tireoidiano central que regula a homeostase dos hormônios tireoidianos. O hormônio liberador de tireotropina (TRH), secretado pelo hipotálamo, estimula a síntese e secreção do hormônio estimulador da tireóide (TSH) pelos tireotrófos na hipófise anterior. O TSH age então na glândula tireóide estimulando a síntese e secreção dos hormônios tireoidianos. A liberação de TRH e TSH é regulada pelos níveis circulantes de hormônios tireoidianos através de mecanismo negativo de retroalimentação. (B) Após a entrada na célula através de transportadores transmembrana, o precursor T4 é principalmente convertido à T3 pela desidase tipo 2 (D2) localizada no retículo endoplasmático. No núcleo, o T3 se liga ao receptor de hormônio tireoidiano (RXR-TR heterodímero) leva à dissociação de correpressores e ligação de coativadores (CoA) induzindo a transcrição. Adaptada de Wagner *et al*, 2009 (3).

A atividade desta via sinalizadora depende da oferta dos ligantes e da sensibilidade às mudanças de suas concentrações séricas que podem resultar de anormalidades da secreção glandular ou do metabolismo periférico das iodotironinas circulantes. Paralelamente à modulação de sua atividade sistêmica, a sinalização dos hormônios tireoidianos é também controlada localmente no microambiente tecidual pela sua ativação e inativação mediada pelas desidases (4).

1.2. Desiodases

A maior parte do T3 circulante (aproximadamente 80%) resulta da desiodação do anel externo da molécula de T4 nos tecidos periféricos, através da ação de enzimas denominadas iodotironinas desiodases (5).

A desiodação do T4, T3 e de outras iodotironinas é uma atividade imprescindível para a homeostase hormonal tireoidiana. Catalisada por três selenoenzimas distintas codificadas por genes diferentes e com distribuição diversa, a desiodação é definida como sendo a retirada de um átomo de iodo da posição 5- ou 5` - do anel tirosínico ou fenólico da molécula de iodotironina, permitindo sua ativação e inativação, respectivamente (6).

As iodotironinas desiodases do tipo 1, 2 e 3 (D1, D2 e D3) são proteínas integrais de membrana que contêm tioredoxina e o aminoácido selênio. Este último, raramente encontrado incorporado à proteínas, confere atividade óxido-redutase estrita e muito eficaz, conferindo a regulação precisa da geração e inativação de T3 características das desiodases (5,7).

Embora as três desiodases apresentem em comum certas características estruturais importantes, diferem entre si em outros aspectos como no padrão de expressão tecidual, localização celular, papel fisiológico, preferência pelo substrato, sensibilidade a inibidores e na forma como são reguladas pelos hormônios tireoidianos. A tabela 1 sumariza as principais características das três desiodases humanas.

Tabela 1: Principais características das iodotironinas desiodases. PTU: Propiltiouracil; IOP: ácido iopanóico

| CARACTERÍSTICAS | Desiodase tipo 1 | Desiodase tipo 2 | Desiodase tipo 3 |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| | (5'-desiodase tipo I) | (5'-desiodase tipo II) | (5-desiodase tipo III) |
| | D1 | D2 | D3 |
| Localização do gene | Cromossomo 1p32-p33 | Cromossomo 14q24.3 | Cromossomo 14q32 |
| Peso molecular (kDa) | 27 | 30 | 31 |
| Km aparente | 10^{-7} , 10^{-6} | 10^{-9} | 10^{-9} |
| Localização subcelular | Membrana plasmática | Reticulo endoplasmático | Membrana plasmática |
| Meia-vida | Horas | 20 minutos | Horas |
| Homodimerização | Sim | Sim | Sim |
| Susceptibilidade ao PTU | Alta | Muito baixa (resistente) | Muito baixa (resistente) |
| Susceptibilidade ao IOP | Sim | Sim | Sim |
| Sítio de desiodação | Anel interno e externo | Anel externo | Anel interno |
| Preferência por substrato | rT3 (5') >> T4 > T3 (5) | T4 > rT3 | T3 > T4 |
| Expressão tecidual fisiológica | Fígado, rim, tireóide, hipófise, coração, tecido adiposo marrom | Hipófise, cérebro, tecido adiposo marrom, tireóide, pele, placenta, timo, glândula pineal e musculatura cardíaca e esquelética | Útero, Placenta, tecidos fetais, pele, cérebro e hipófise |
| Função | Fornecimento de T3 para o plasma > meio intracelular, degradação de rT3 e iodotironinas sulfatadas | Fornecimento de T3 para o meio intracelular e em menor proporção para o plasma | Inativação de T3 e T4 |
| Resposta ao hormônio tireoidiano | | | |
| Transcricional | Aumentada | Diminuída | Aumentada |
| Pós-transcricional | Diminuída (oxidação do centro ativo) | Muito diminuída (ubiquitinação) | Desconhecida |

A atividade das desiodases é regulada por um processo complexo, no qual vários fatores e/ou situações fisiopatológicas podem alterar a desiodação em um determinado tecido (5). O status hormonal tireoidiano é de fundamental importância regulatória e sua alteração determina mudanças significativas na atividade das desiodases. Fisiologicamente, estas mudanças parecem estar coordenadas visando à manutenção dos níveis circulantes e intracelulares de T3 próximos ao normal (8).

As desiodases tipo 1 e 2 são responsáveis pela geração de T₃ a partir do T₄, enquanto a desiodase do tipo 3, e em menor grau, a do tipo 1, catalisam a desiodação do anel interno das moléculas de T₄ e T₃, formando os metabólitos inativos rT₃ e T₂, respectivamente (8). Tanto a D1 como a D2 encontram-se amplamente expressas na tireóide normal, especialmente na célula folicular. Aproximadamente 30 a 50% do T₃ secretado diretamente pela tireóide deriva da desiodação intra-tireoidiana do T₄ (9,10).

A D1 fornece uma significativa fração do T₃ plasmático em humanos e seus níveis mais elevados de expressão são encontrados no fígado, rim, tireóide e hipófise anterior (5). Entre as desidases, a D1 é a única com poder de catalisar a desidatação tanto do anel fenólico quanto do anel tirosínico das diversas iodotironinas, resultando, respectivamente, na ativação e inativação dos hormônios tireoidianos. A atividade da D1, particularmente da D1 hepática, é considerada uma importante fonte de T₃ plasmático no estado eutireóideo em mamíferos (5). Em humanos, entretanto, sua contribuição mais significativa parece ocorrer nos pacientes com hipertireoidismo (11). Além de atuar na ativação do T₄, a D1 também participa no rápido clearance do rT₃ e na inativação das iodotironinas sulfatadas (12). A expressão da D1 é regulada ao nível transcricional pelo hormônio tireoidiano. Vários estudos demonstraram que o T₃ estimula a síntese da D1 através de um efeito direto sobre a taxa de transcrição gênica da enzima, induzindo aumentos nos níveis do RNA mensageiro e, conseqüentemente, da proteína (13).

A D2 é uma enzima que catalisa exclusivamente a desidatação do anel externo das iodotironinas desempenhando um papel crítico na ativação do T₄ em diferentes tecidos. Em humanos, a expressão da D2 parece ser mais ampla que a da D1, com grande quantidade de transcritos encontrados na glândula tireóide, cérebro, medula espinhal, placenta, nos músculos cardíaco e esquelético (8). Embora o principal papel fisiológico atribuído à D2 seja a produção intracelular de T₃, estudos recentes sugerem que a D2 presente no músculo esquelético contribui com uma parcela significativa da produção do T₃ plasmático em humanos (11). A atividade da D2, de maneira geral, apresenta uma correlação inversa com os níveis séricos dos hormônios tireoidianos, estando aumentada no hipotireoidismo e diminuída no hipertireoidismo (14). Mecanismos pré e pós-transcricionais estão envolvidos na regulação da expressão da D2 pelos hormônios tireoidianos com papéis distintos para o T₃, T₄ e rT₃. O T₃ atua principalmente no nível transcricional diminuindo os níveis de RNA mensageiro da D2, enquanto o T₄ e o rT₃ rapidamente reduzem a atividade enzimática no nível pós-transcricional, aumentando a taxa de ubiquitinação e posterior degradação da enzima via proteossomas (15,16). Vários fatores parecem capazes de modular a taxa de transcrição do gene da D2, como o AMPc, os fatores de transcrição TTF-1 e PAX-8, a proteína ativadora 1 (AP1) e agentes adrenérgicos (17). Na tireóide, a expressão da D2 está relacionada ao grau de estímulo

tecidual via TSH/AMPC, com aumento da expressão encontrado na Doença de Graves e nos adenomas hiperfuncionantes (9).

A D3 catalisa unicamente a desiodação do anel interno das moléculas de T4 e T3, resultando na formação dos metabólitos inativos rT3 e T2, respectivamente. A expressão da D3 em humanos é elevada durante o período embrionário em tecidos fetais que incluem fígado, córtex cerebral e em estruturas epiteliais dos pulmões, intestino, pele e trato geniturinário, assim como também na unidade uteroplacentária, que inclui a placenta, camadas sinciotrofoblástica e citotrofoblástica, e no endotélio das vilosidades coriônicas (18). Essa distribuição da desiodase tipo 3 propicia a regulação da transferência de hormônios tireoidianos maternos e contribui para reduzir as concentrações séricas de T3. Após o nascimento, a atividade da D3 no fígado e no sistema nervoso central diminui rapidamente, permitindo que em poucas semanas de vida pós-natal as concentrações de iodotironinas circulantes se equiparem às encontradas em adultos, o que sugere a completa maturação deste sistema enzimático. Em adultos humanos, os tecidos normais com maiores atividades de D3 são o útero e a placenta, seguidos pelo tecido cerebral, pele, hipófise e adrenal (8,19). No cérebro e pele de diferentes espécies, a atividade e os níveis de mRNA da D3 estão aumentados no hipertireoidismo e diminuídos no hipotireoidismo, entretanto os mecanismos envolvidos nesta regulação ainda não foram determinados (20). Ainda não existem dados na literatura sobre a expressão da D3 em tumores tireoidianos.

1.3. Hormônios tireoidianos, desiodases e tumorigênese

Como é típico de outros sistemas hormonais, as ações dos hormônios tireoidianos diferem entre os tecidos de um organismo dependendo de diversas variáveis. Assim como a variabilidade de expressão de receptores e transportadores hormonais, diferentes padrões de metabolização dos HT promovem ações individualizadas nas células dependendo da necessidade do organismo. As iodotironina desiodases participam da homeostase hormonal tireoidiana ao agirem a nível pré-receptor nuclear influenciando nos níveis e na ação dos hormônios tireoidianos tanto no meio intra- como no meio extracelular (6).

Muito já se conhece sobre a participação dos hormônios tireoidianos e das desidases em processos patológicos, como será descrito adiante nessa introdução, mas muito ainda se deve buscar visando elucidar questões importantes acerca da tumorigênese e das medidas terapêuticas que poderão surgir desses dados.

Como previamente descrito, os hormônios tireoidianos participam efetivamente dos processos de diferenciação e proliferação celular. Alguns estudos indicam que, ao menos *in vitro*, os hormônios tireoidianos desempenham algum papel na transformação neoplásica induzida pela radiação ou por substâncias carcinogênicas (21,22). Outros estudos têm associado o status tireoidiano à tumorigênese e ao crescimento de tumores sólidos (23,24). Uma das ações do T3 na proliferação de células neoplásicas foi documentada através do estudo em que Garcia-Silva e cols. demonstraram que concentrações fisiológicas de T3 bloqueiam a resposta transcricional sinalizada pela via RAS nas células de neuroblastoma (25). A repressão pelo T3 dos níveis de ciclina D1, proteína envolvida na progressão do ciclo celular, parece ser um importante componente do mecanismo que bloqueia a proliferação celular RAS-dependente. O T3 consegue inibir a resposta oncogênica das 3 isoformas RAS (N-, K- e H-RAS) e ambos os receptores do hormônio tireoidiano (TR α e TR β) parecem mediar esta ação (25).

O envolvimento do T3 na gênese tumoral também foi demonstrado em estudos com camundongos transgênicos, nos quais uma mutação na isoforma do receptor do hormônio tireoidiano TR β induziu a formação espontânea do carcinoma folicular da tireóide (26). Nesses animais, uma mutação no éxon 10 em que ocorre uma inserção C no códon 448 produzindo um frameshift de 14 aminoácidos da cadeia carboxi-terminal do TR β impede a ligação do T3 ao seu receptor e age como um fator de transcrição dominante negativo nos elementos responsivos ao T3 (TREs). Essa mutação poderia alterar a transcrição de vários genes regulados por esse hormônio e que podem estar envolvidos na proliferação e diferenciação celular. Com base nessas observações, o gene do TR β é questionado como um possível gene supressor tumoral. É interessante observar que alguns estudos prévios demonstraram anormalidades na expressão dos TRs, tanto ao nível do RNA mensageiro quanto da proteína, sendo que mutações somáticas no TR α e no TR β foram identificadas em vários tumores humanos, tais como fígado, rim e tireóide (27-30).

Nas neoplasias tireoidianas, as desidases têm sido questionadas como possíveis

marcadores de diferenciação celular (31,32). No entanto, os dados disponíveis indicam que é necessário um suprimento adequado de T3 intra-tecidual combinado à sinalização mediada pelos TRs para a manutenção das características diferenciadas das células, a apoptose e a prevenção do crescimento de clones tumorais (33).

Diversos estudos buscaram avaliar o papel das desidases em neoplasias tireoidianas e não-tireoidianas. Alguns deles avaliaram a expressão da D1 nas neoplasias tireoidianas. Köhrle e cols. (31) demonstraram haver grande variabilidade nos níveis de expressão da D1 em 10 amostras não-pareadas de carcinoma papilar de tireóide (CPT), sendo observados desde níveis indetectáveis até níveis elevados de sua expressão. Outro autor, entretanto, observou baixa detecção da proteína de 27 kDa com propriedades da D1 em 4 de 5 casos de carcinoma papilar (34). Já em um estudo realizado pelo nosso grupo, Souza Meyer e cols. observaram redução significativa nos níveis de RNA mensageiro e atividade da D1 em todas as 14 amostras de CPT analisadas (35). Essas alterações foram observadas em todos os subtipos histológicos de CPT, que incluíam desde a forma clássica, variante folicular, variante esclerosante difusa até microcarcinomas, como também nos diferentes estágios clínicos. Já nos adenomas e carcinomas foliculares da tireóide, os níveis da D1 mostram-se aumentados em relação ao tecido normal, o mesmo sendo detectado em amostra de carcinoma de células de Hürthle. Esses resultados parecem indicar que a desdiferenciação celular da tireóide promove alterações na expressão gênica da D1 através de mecanismos pré-transcricionais, um evento específico na progressão para o carcinoma papilar (35). Atividade da D1 também foi descrita no carcinoma anaplásico. Estudos prévios (31,36) relataram níveis muito baixos ou indetectáveis nesse tipo de carcinoma, com resultados similares em linhagens celulares correspondentes. No entanto, Souza Meyer e cols. demonstraram níveis elevados de atividade em 1 amostra de carcinoma anaplásico misto (35). Talvez esses achados, aparentemente conflitantes, de expressão da D1 nos carcinomas papilares e foliculares possam sugerir o tipo histológico a partir do qual ocorreu a desdiferenciação tumoral.

Alterações na regulação da D1 também foram documentadas em linhagem celulares de células tireoidianas neoplásicas. Nos estudos realizados em linhagens de células humanas de carcinoma folicular de tireóide (linhagens FTC 133 e FTC 238), observou-se

que a D1 perde a resposta ao estímulo fisiológico do TSH e do T3, mas mantém-se sensível ao ácido retinóico, um metabólito ativo da vitamina A que regula a taxa de crescimento e diferenciação de vários tipos celulares (36). Nessas células, o ácido retinóico estimula a atividade da D1 em 5 a 10 vezes. Nas linhagens humanas menos diferenciadas também ocorre uma perda da resposta ao ácido retinóico (36).

No que se refere à expressão da desidase tipo 1 em outras neoplasias não-tireoidianas, foram descritos no carcinoma de células claras, o tipo mais freqüente de carcinoma renal, níveis indetectáveis de RNA mensageiro e atividade da D1 em todas as 10 amostras analisadas. Os autores especulam que a perda da expressão da D1 seja em consequência da transformação neoplásica ou que a célula-origem desse tumor seja tubular, que normalmente não expressa essa enzima (37). Recentemente foi detectada expressão de variantes anômalas da D1 no câncer renal humano (38). A redução na expressão da D1 também foi demonstrada em amostras de adenocarcinoma de fígado quando comparadas ao tecido normal (39), sendo que nas células derivadas de carcinoma hepatocelular humano (HepG2), um aumento de duas vezes na atividade da D1 foi descrito com o uso do ácido retinóico (36). A atividade da D1 também está significativamente reduzida no adenocarcinoma e carcinoma pulmonar de células escamosas (40). Achados semelhantes foram descritos no câncer de próstata (41).

Em relação a regulação da D1 em linhagens de células neoplásicas, foi demonstrado que nas células MCF-7, uma linhagem celular humana de carcinoma de mama ovariano-dependente, a D1 responde ao ácido retinóico, enquanto que está abolida a regulação pelo T3 e pelo agonista β -adrenérgico isoproterenol (42). Similarmente ao que ocorre em outras linhagens celulares neoplásicas, na linhagem menos diferenciada de carcinoma de mama (MDA-MB-231) não foi encontrada atividade da D1, tanto nas condições basais como durante o tratamento (42). Esses resultados reforçam a possibilidade de a D1 ser um marcador de desdiferenciação celular como sugerido em outros estudos (31,32).

Ao contrário do sistema nervoso central (SNC) de ratos, nenhuma atividade da D1 foi documentada no SNC de humanos (43). No entanto, alguns estudos demonstraram que a D1 está presente tanto na hipófise normal quanto nos adenomas hipofisários humanos (44, 45). Níveis muito baixos de RNA mensageiro da D1, quase próximos ao

limite da detecção do método, foram descritos em 50% das amostras de pituitária normal e tumoral. Outro estudo detectou atividade da D1 tanto na hipófise normal quanto nos adenomas hipofisários, sendo que níveis elevados de atividade da D1 foram descritos em algumas amostras de tecido normal e de tumores não-funcionantes ou produtores de prolactina (45). A tabela 2 sumariza os principais achados sobre a expressão da D1 nas neoplasias humanas.

Tabela 2: Expressão das desidases nas neoplasias tireoidianas e em outros tecidos neoplásicos. N/A: não avaliado.

| TIPO TUMORAL | D1 | | D2 | | D3 | |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------|------------|------------------|------------|
| | RNA _m | Atividade | RNA _m | Atividade | RNA _m | Atividade |
| Bócio multinodular de tireóide | Normal ou aumentado | Aumentada | Normal ou aumentado | Aumentada | N/A | N/A |
| Carcinoma papilar de tireóide | Diminuído | Diminuída | Diminuído | Diminuída | N/A | N/A |
| Carcinoma folicular de tireóide | Normal ou aumentado | Aumentada | Normal ou aumentado | Aumentada | N/A | N/A |
| Carcinoma medular de tireóide | N/A | N/A | Diminuída | Normal | N/A | N/A |
| Carcinoma anaplásico de tireóide | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Carcinoma renal de células claras | Diminuído ou indetectável | Diminuída ou indetectável | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Adenocarcinoma de fígado | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Adenocarcinoma e Carcinoma de células escamosas de pulmão | N/A | Diminuída | N/A | Inalterada | N/A | N/A |
| Carcinoma de próstata | | Diminuição da 5'-desiodação | | | N/A | N/A |
| Carcinoma de mama | N/A | Diminuída | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Adenoma de hipófise | Diminuído | Diminuída | Aumentado | Aumentada | Aumentado | Inalterada |
| Coriocarcinoma | N/A | N/A | Aumentado | Aumentada | | |
| Mesotelioma | N/A | N/A | Aumentado | Aumentada | N/A | N/A |
| Osteossarcoma | N/A | N/A | Diminuído | Diminuída | N/A | N/A |
| Hemangioma | N/A | N/A | N/A | N/A | Aumentado | Aumentada |
| Hemangioendotelioma | N/A | N/A | N/A | N/A | Aumentado | Aumentada |
| Carcinoma basocelular | N/A | N/A | N/A | N/A | Aumentado | Aumentada |
| Gliossarcomas | N/A | N/A | Aumentada | Aumentada | Aumentada | Aumentada |
| Astrocitomas | N/A | N/A | Aumentado | Aumentada | Diminuído | Diminuída |

Atividade enzimática da D2 foi descrita no carcinoma papilar da tireóide como reduzida o que, segundo os autores, pode ser secundário à transformação neoplásica (46). Um dado interessante é que nas variantes foliculares dessa neoplasia, não se observa uma redução significativa nos níveis de expressão da enzima em relação ao tecido tireoidiano normal (47). Semelhante ao que foi observado na expressão da D1 nas lesões foliculares,

os níveis de RNA mensageiro da D2 nos adenomas e carcinomas foliculares são similares ao tecido não-neoplásico (47), enquanto que nos adenomas foliculares hiperfuncionantes é observada uma alta expressão da D2 (9,48). Entretanto, é interessante notar que em metástases de carcinoma folicular foram descritos altos níveis de atividade da D2 que determinavam um persistente aumento da relação sérica de T3/T4 nos pacientes (35,49,50). Em consequência do aumento da atividade da D2 no tumor, pacientes com grandes e/ou múltiplas metástases de carcinoma folicular podem apresentar um quadro clínico de T3-tireotoxicose devido ao aumento da conversão do T4 exógeno pelo tecido tumoral (50).

Em estudo recentemente publicado pelo nosso grupo, Souza Meyer e cols. puderam demonstrar a expressão da D2 no carcinoma medular de tireóide, um tumor originado de células parafoliculares tireoidianas, embriologicamente distintas das células foliculares (51).

A D2 está normalmente expressa no tecido cerebral humano, sendo que em neoplasias cerebrais foram identificados receptores dos hormônios tireoidianos, indicando um possível envolvimento desses hormônios na proliferação celular desse tipo tumoral (43,52,53). A atividade da D2 foi identificada em astrocitomas, glioblastomas e oligodendrogliomas, apresentando forte correlação com os níveis de RNA mensageiro, sugerindo uma regulação pré-transcricional da expressão dessa enzima nos tumores cerebrais (46). Os maiores níveis de atividade foram encontrados nos gliossarcomas (54). Por outro lado, nenhuma atividade de desidatação do T4 foi detectada nos meningiomas, que são derivados de células da aracnóide, em contraste aos gliomas que se originam das células gliais, provavelmente devido à origem embriológica distinta desses tumores (55).

Além do seu papel na regulação da secreção de TSH através do feedback negativo, os hormônios tireoidianos parecem estar envolvidos na regulação do crescimento e diferenciação da célula hipofisária (56,57). Com exceção dos tumores hipofisários secretores de ACTH e GH, os demais tumores hipofisários apresentam um aumento significativo nos níveis de RNA mensageiro e na atividade da D2 quando comparados com a pituitária normal (44). A maior atividade da D2 parece ocorrer nos subtipos produtores de TSH e prolactina, quando comparados aos tumores não-funcionantes, aos produtores de GH e ACTH (45). Segundo os autores, esses resultados demonstram que

apesar da transformação tumoral, a D2 permanece ativa, mantendo o seu papel na função e regulação da hipófise anterior humana.

Várias linhagens celulares tumorais humanas apresentam atividade da D2. As células JEG3, uma linhagem de coriocarcinoma humano, mantêm a expressão da D2 apesar da transformação tumoral e sua responsividade ao tratamento com AMPc (58). Células MSTO-211H, uma linhagem de mesotelioma humano, expressam o gene da D2, apresentando níveis de RNA mensageiro 40 vezes mais elevados do que as células mesoteliais normais (59,60). Foi encontrada uma atividade aumentada da D2 nessas células tumorais, aproximadamente 40% maior do que a encontrada em tecidos de pacientes com Doença de Graves (60). A D2 também foi identificada em células de osteossarcoma humano (SaOS-2), embora com expressão reduzida quando comparada às células osteoblásticas normais (NH0st) (61). Nessas células tumorais, tanto os níveis de RNA mensageiro quanto a atividade enzimática aumentam rapidamente sob o estímulo do TSH. Além disso, as três isoformas de receptores do T3 foram encontradas, sugerindo um possível papel do T3 gerado localmente pela D2 na maturação e remodelamento do osso normal. A presença da D2 também foi descrita em carcinomas de pulmão, similares ao tecido circunjacente (40). A tabela 2 sumariza os principais achados sobre a expressão da D2 nas neoplasias humanas.

A relação direta entre D3 e a proliferação celular foi inicialmente definida em estudos com retinas de um anfíbio anuro africano chamado *Xenopus laevis*, nas quais a expressão de D3 na zona marginal ciliar dorsal inibe a proliferação hormônio tireoidiano-dependente e facilita o crescimento assimétrico retiniano necessário para a visão binocular normal. Para demonstrar a relevância funcional da D3, esse evento morfogênico é interrompido em larvas de anfíbios aquáticos tratados com ácido iopanóico, um inibidor competitivo da atividade catalítica da D3 (62). A expressão da D3 também tem sido associada com alterações na proliferação de células mamíferas indiferenciadas, ilustrada pelo relato de que precursores isolados de células adiposas marrons expressam níveis elevados de mRNA e atividade da D3 durante proliferação (63).

Apesar da expressão da desidase tipo 3 mostrar-se elevada nos tecidos embrionários, sua atividade decresce após o nascimento. Com exceção do sistema

nervoso central e de outros poucos tecidos que compartilham a rápida proliferação de células progenitoras como células endometriais uterinas (18) e folículos da pele (64), a atividade de D3 é indetectável na maioria dos tecidos maduros, incluindo o fígado (65).

No entanto, dados recentes têm documentado a reativação da D3 após o nascimento em tecidos normais durante enfermidades críticas (19,66) e em alguns estados patológicos, que incluem infarto do miocárdico em ratos (67), insuficiência cardíaca hipertrófica por doença hipóxico-isquêmica (68,69), inflamação crônica (70,71) e lesão neural (72).

Achados interessantes acerca do papel da desidrase tipo 3 na regeneração tecidual recentemente demonstraram que as conseqüências da expressão dessa enzima vão além da resposta à injúria, com potencial implicação na cicatrização de tecidos. No estudo de Kester e cols. foi demonstrada indução marcante da atividade da D3 em hepatectomia parcial, que constitui um modelo clássico de regeneração tecidual. Esse procedimento leva à uma redução expressiva das concentrações séricas e teciduais dos hormônios tireoidianos, demonstrando a habilidade da enzima em controlar tanto o status sistêmico como local desses hormônios. A atividade da D3 está relacionada com a incorporação pelo hepatócito de bromodeoxiuridina, proporcionando uma nova evidência quantitativa que sustenta a hipótese de que D3 promove a proliferação tecidual (73).

No que se refere à tumorigênese, diversos autores têm demonstrado o papel da D3 na proliferação celular tumoral em diversos tecidos. A existência de atividade da D3 no cérebro humano adulto parece ser responsável pela inativação dos hormônios tireoidianos no sistema nervoso central (43,55). Nauman e cols. (54) determinaram a concentração celular de T4 e T3 e a atividade enzimática em tecidos de gliomas humanos com vários graus de malignidade e em tecidos cerebrais normais. A atividade da D3 estava aumentada em todos os casos de gliossarcoma, em 9 de 10 casos de glioblastoma multiforme, mas diminuída em astrocitoma grau II e grau III. Os autores sugerem que essas alterações podem estar relacionadas com a progressão maligna.

Estudos prévios não identificaram a expressão da D3 em linhagem celular derivada da hipófise anterior humana (74). No entanto, a análise de adenomas hipofisários demonstrou níveis de RNA mensageiro aproximadamente 7 vezes mais elevados do que no tecido hipofisário normal. Maior expressão foi encontrada nos tumores secretores de

TSH (13 vezes), seguidos pelos produtores de ACTH (7 vezes), não-funcionantes (7 vezes) e pelos produtores de GH (6 vezes). Mesmo assim, a atividade enzimática foi detectada somente em 3 de 16 tumores (18%), todos não-funcionantes (44).

A presença da D3 é freqüentemente relatada em anormalidades vasculares (20,75,76). O RNA mensageiro e a atividade da D3 foram identificados em hemangiomas infantis em níveis aproximadamente sete vezes maiores do que na placenta, um órgão que normalmente expressa uma grande quantidade dessa enzima. Como a D3 inativa os hormônios tireoidianos, o crescimento tumoral ou a presença de grandes hemangiomas pode provocar hipotireoidismo severo e de difícil tratamento (75). O primeiro caso relatado foi de uma criança de 3 meses de idade com vários hemangiomas hepáticos e hipotireoidismo primário refratário à altas doses de L-tiroxina para restabelecimento do eutireoidismo e da secreção normal de tireotrofina (TSH). Os altos níveis de atividade da D3 no tumor determinam uma maior degradação dos hormônios tireoidianos, sendo que o hipotireoidismo resolve com a ressecção ou involução do tumor (75). Recentemente foram descritos níveis elevados de atividade da D3 em um caso de recorrência de hemangioma hepático com hipotireoidismo consumptivo, de uma criança do sexo feminino que aos quatro meses de idade apresentava hemangiomas hepáticos difusos em tratamento para hipotireoidismo congênito, com níveis séricos de rT3 elevados. Houve melhora do hipotireoidismo com a involução dos hemangiomas propiciada pelo tratamento farmacológico com prednisona e interferon- α . Aos 20 meses de vida, 7 meses após a descontinuação das medicações, houve recorrência local de um hemangioma hepático, cirurgicamente removido. Amostras analisadas deste hemangioma ressecado apresentaram expressão e atividade da D3 elevadas, quando comparadas com tecido placentário (77).

Os hemangiomas cutâneos também podem expressar níveis elevados de D3 (19). Nos adultos, a atividade aumentada de D3 em hemangiomas pode ser causa de hipotireoidismo subclínico (76). Dessa forma, uma alta suspeição para hipotireoidismo deve-se ter em crianças e adultos com grandes tumores vasculares.

Uma nova conexão entre a D3 e a proliferação de células tumorais foi revelada pelo estudo com carcinomas basocelulares, no qual D3 mostrou promover a proliferação de queratinócitos malignos através da inibição da ação dos hormônios tireoidianos

circulantes. Os queratinócitos que expressavam D3 tiveram níveis mais elevados de proliferação mensuradas pela expressão de ciclina D1 e consumo de timidina. Esse achado foi confirmado *in vivo* pelo uso de modelo com camundongos sem pêlos ao demonstrar que naqueles cujo carcinoma basocelular possuía depleção endógena de D3 os tumores cresciam muito mais devagar (64).

Na busca de um maior entendimento do papel da D3 na regulação dos hormônios tireoidianos, alguns estudos têm avaliado a expressão dessa enzima em diferentes linhagens celulares humanas. A atividade e o RNA mensageiro da D3 estão presentes e fortemente correlacionados nas células de carcinoma de endométrio (ECC-1), carcinoma de mama (MCF-7) e de neuroblastoma (SH-SY5Y) (20). A presença da atividade da D3 nas células MCF-7, segundo os autores, pode indicar que essa enzima pode estar expressa no tecido mamário somente em certas situações fisiológicas, tais como no período de lactação. Os estudos regulatórios demonstraram que o estradiol aumentou a atividade da D3 somente nas células ECC-1, sugerindo uma contribuição desse hormônio na indução da D3 no útero gravídico. Além disso, a incubação com ácido retinóico determinou o aumento em 2 a 3 vezes na atividade da D3 nos tipos ECC-1 e MCF-7, mas redução nas células SH-SY5Y, demonstrando com esses resultados uma regulação específica conforme o tipo celular. A expressão da D3 não foi afetada pelos hormônios tireoidianos ou pelo AMPc em nenhum tipo celular (20). Esses resultados caracterizam a perda do estímulo fisiológico dos hormônios tireoidianos em decorrência do processo neoplásico. A tabela 2 sumariza os principais achados sobre a expressão da D3 nas neoplasias humanas.

Resumindo o papel das desidases na tumorigênese até o momento, nos tumores humanos de origem epitelial provenientes de tecidos que normalmente expressam a D1 ocorre geralmente uma redução na expressão dessa enzima no tecido neoplásico. No entanto, a expressão da D2 encontra-se inalterada ou mesmo aumentada, com exceção do carcinoma papilar da tireóide. Uma possível explicação, embora especulativa, é que a redução da expressão da D1 nos tumores possa decorrer da perda da resposta fisiológica ao T3. Já o mecanismo para as alterações na expressão da D2 parece ser mais complexo, em função de essa enzima apresentar regulação pré e pós-transcricional. De qualquer modo, é necessário determinar se as anormalidades na expressão das desidases,

principalmente da D2, são simplesmente uma consequência da transformação celular ou parte do processo de patogênese tumoral. Futuros estudos funcionais dessas enzimas em células tumorais auxiliarão no entendimento dessa questão. Até o momento, as repercussões da expressão anormal das desidases nos tumores humanos são evidentes em metástases de carcinoma folicular da tireóide e em tumores de origem vascular, e no que diz respeito ao comportamento das desidases do carcinoma papilar de tireóide e de formas benignas da doença tireoidiana nodular, a atividade a desidase do tipo 3 parece estar presente e ativa como descrito no artigo original desta dissertação de mestrado.

1.4. Referências bibliográficas da introdução

1. **Köhrle, J** 2000 The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell Mol. Life Sci* 57:1853-1863
2. **Wu Y, Koenig RJ** 2000 Gene regulation by thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab* 11:207-11
3. **Wagner M, Wajner SM, Maia AL** 2009 Is there a role for thyroid Hormone on spermatogenesis? *Microsc. Res. Tech.* 72:796-808
4. **Geberen B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, Zeold A, Bianco AC** 2008 Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev* 29:898-938
5. **Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR** 2002 Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23:38-89
6. **St. Germain, DL, Galton VA, Hernandez A** 2009 Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: Current concepts and challenges. *Endocrinology* 150:1097-1107
7. **Kuiper GGJM, Kester MHA, Peeters RP, Visser TJ** 2005 Biochemical mechanisms of thyroid hormone deiodination. *Thyroid* 15(8):787-798
8. **Geberen B, Zeoeld A, Dentice M, Salvatore D, Bianco AC** 2008 Activation and Inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. *Cell Mol. Life Sci.* 65:570-590
9. **Salvatore D, Tu H, Harney JW, Larsen PR** 1996 Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in human thyroid. *J Clin Invest* 98:962-8
10. **Ishii H, Inada M, Tanaka K, Mashio Y, Naito K, Nishikawa M, et al.** 1981 Triiodothyronine generation from thyroxine in human thyroid: enhanced

- conversion in Graves' thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 52:1211-7
11. **Maia AL, Kim BW, Huang SA, Harney JW, Larsen PR** 2005 Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. *J Clin Invest* 115:2524-33
 12. **Visser TJ** 1994 Role of sulfation in thyroid hormone metabolism. *Chem Biol Interact* 92:293-303
 13. **Maia AL, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR** 1995 Effect of 3,5,3'-tri-iodothyronine (T3) administration on *dio1* gene expression and T3 metabolism in normal and type 1 deiodinase-deficient mice. *Endocrinology* 136:4842-9
 14. **Silva JE, Larsen PR** 1982 Comparison of iodothyronine 5'-deiodinase and other thyroid-hormone-dependent enzyme activities in the cerebral cortex of hypothyroid neonatal rat. Evidence for adaptation to hypothyroidism. *J Clin Invest* 70:1110-23
 15. **Burmeister LA, Pachucki J, St. Germain DL** 1997 Thyroid hormones inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by both pre- and post-translational mechanisms. *Endocrinology* 138:5231-7
 16. **Wagner MS, Wajner SM, Maia AL** 2008 The role of thyroid hormone in testicular development and function. *J Endocrinol* 199:351-365
 17. **Gereben B, Salvatore D** 2005 Pretranslational regulation of type 2 deiodinase. *Thyroid* 15:855-64
 18. **Huang SA, Dorfman DM, Genest DR, Salvatore D, Larsen PR** 2003 Type 3 iodothyronine deiodinase is highly expressed in the human uteroplacental unit and in fetal epithelium. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1384-1388
 19. **Huang SA** 2005 Physiology and pathophysiology of type 3 deiodinase in Humans. *Thyroid* 15(8):875-881
 20. **Kester MHA, Kuiper GGJM, Versteeg R, Visser T** 2006 Regulation of type III

- iodothyronine deiodinase expression in human cell lines. *Endocrinology* 147:5845-54
21. **Borek C, Guernsey DL, Ong A, Edelman IS** 1983 Critical role played by thyroid hormone in induction of neoplastic transformation by chemical carcinogens in tissue culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:5749-52
 22. **Guernsey DL, Borek C, Edelman IS** 1981 Crucial role of thyroid hormone in X-ray-induced neoplastic transformation in cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:5708-11
 23. **Lemaire M, Bayens W, de Saint-Georges L, Baugnet-Mahieu L** 1981 Thyroid hormone influence on the growth of hepatoma HW-165 in Wistar rats. *Biomedicine* 34:133-9
 24. **Leuthauser SWC, Guernsey DL** 1987 Thyroid hormone affects the expression of neoplastic transformation induced by DNA-transfection. *Cancer Lett* 35:321-6
 25. **Garcia-Silva S, Aranda A** 2004 The thyroid hormone receptor is a suppressor of ras-mediated transcription, proliferation and transformation. *Mol Cell Biol* 24:7514-23
 26. **Kato Y, Ying H, Willingham MC, Cheng S-Y** 2004 A tumor suppressor role for thyroid hormone β receptor in a mouse model of thyroid carcinogenesis. *Endocrinology* 145:4430-8
 27. **Lin KH, Shieh HY, Chen SL, Hsu HC** 1999 Expression of mutant thyroid hormone nuclear receptors in human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Carcinog* 26:53-61
 28. **Kamiya Y, Puzianowska-Kuznicka M, McPhie P, Nauman J, Cheng SY, Nauman A** 2002 Expression of mutant thyroid hormone nuclear receptors is associated with renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 23:25-33
 29. **Puzianowska-Kuznicka M, Krystyniak A, Madej A, Cheng SY, Nauman J**

- 2002 Functionally impaired TR mutants are present in thyroid papillary cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1120-8
30. Cheng SY 2003 Thyroid hormone receptor mutations in cancer. *Mol Cell Endocrinol* 213:23-30
 31. Köhrle J, Oertel M, Hoang-Vu C, Schnieders F, Brabant G 1993 Type I 5'-deiodinase — a marker for differentiated thyroid carcinoma? *Exp Clin Endocrinol* 101:60-72
 32. Köhrle J 1997 Thyroid carcinoma: interrelationships between local thyroid metabolism by the type I 5'-deiodinase and the expression of thyroid hormone receptors and other thyroid specific (de)differentiation markers. *Curr Top Pathol* 91:83-116
 33. Köhrle J 2004 Guard your master: thyroid hormones receptors protect their gland of origin from thyroid cancer. *Endocrinology* 145:4427-9
 34. Toyoda N, Nishikawa M, Mori Y, Yoshimura M, Masaki H, Gondou A, et al. 1992 Identification of a 27-kilodalton protein with the properties of type I iodothyronine 5'-deiodinase in human thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab* 74:533-8
 35. Souza Meyer EL, Dora JM, Wagner MS, Maia AL 2005 Decreased type 1 iodothyronine deiodinase expression might be an early and discrete event in thyroid cell dedifferentiation towards papillary carcinoma. *Clin Endocrinol* 62:672-8
 36. Schrek R, Schnieders F, Schmutzler C, Köhrle J 1994 Retinoids stimulate type I iodothyronine 5'-deiodinase activity in human follicular thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 79:791-8
 37. Pachucki J, Ambroziak M, Tanski J, Luczak J, Nauman J, Nauman A 2001 Type I 5'-iodothyronine deiodinase activity and mRNA are remarkably reduced in renal clear cell carcinoma. *J Endocrinol Invest* 24: 253-61

38. **Piekielko-Witkowska A, Master A, Wojcicka A, Boguslawska J, Brozda I, Tanski Z, Nauman A** 2009 Disturbed expression of type 1 iodothyronine deiodinase splice variants in human renal cancer. *Thyroid* 19(10):1105-13
39. **Sabatino L, Iervasi G, Ferrazzi P, Francesconi D, Chopra IJ** 2000 A study of iodothyronine 5'-monodeiodinase activities in normal and pathological tissues in man and their comparison with activities in rat tissues. *Life Sci* 68:191-202
40. **Wawrzynska L, Sakowicz A, Rudzinski P, Langfort R, Kurzyna M** 2003 The conversion of thyroxine to triiodothyronine in the lung: comparison of activity of type I iodothyronine 5' deiodinase in lung cancer with peripheral lung tissues. *Monaldi Arch Chest Dis* 59:140-5
41. **Dutkiewicz S, Witeska A, Nauman A** 1995 The deiodination of thyroxine to triiodothyronine in the testes of patients with prostate cancer. *Int Urol Nephrol* 27:81-5
42. **García-Solís P, Aceves C** 2003 5' deiodinase in two breast cancer cell lines: effect of triiodothyronine, isoproterenol and retinoids. *Mol Cell Endocrinol* 201:25-31
43. **Campos-Barros A, Hoell T, Musa A, Sampaolo S, Stoltenburg G, Pinna G, et al.** 1996 Phenolic and tyrosil ring iodothyronine deiodination and thyroid hormone concentrations in the human central nervous system. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2179-85
44. **Tannahill LA, Visser TJ, McCabe CJ, Kachilele S, Boelaert K, Sheppard Mc, et al.** 2002 Dysregulation of iodothyronine deiodinase enzyme expression and function in human pituitary tumors. *Clin Endocrinol* 56:735-43
45. **Baur A, Buchfelder M, Kohrle J** 2002 Expression of 5'-deiodinase enzymes in normal pituitaries and in various human pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 147:263-8

46. **Murakami M, Araki O, Hosoi Y, Kamiya Y, Morimura T, Ogiwara T, et al.** 2001 Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in human thyroid gland. *Endocrinology* 142:2961-7
47. **Arnaldi LAT, Borra RC, Maciel RMB, Cerutti JM** 2005 Gene expression profiles reveal that DCN, DIO1, and DIO2 are underexpressed in benign and malignant thyroid tumors. *Thyroid* 15:210-21
48. **Zagrodzki P, Nicol F, Arthur JR, Slowiaczek M, Walas S, Mrowiec H, Wietecha-Posluszny R** 2010 Selenoenzymes, laboratory parameters, and trace elements in different types of thyroid tumor. *Biol Trace Elem Res* 134(1):25-40
49. **Kim BW, Daniels GH, Harrison BJ, Price A, Harney JW, Larsen PR, et al.** 2003 Overexpression of type 2 iodothyronine deiodinase in follicular carcinoma as cause of low circulating free thyroxine levels. *J Clin Endocrinol Metab* 88:594-8
50. **Takano T, Miyauchi A, Ito Y, Amino N** 2006 Thyroxine to triiodothyronine hyperconversion thyrotoxicosis in patients with large metastases of follicular thyroid carcinoma. *Thyroid* 16:615-8
51. **Souza Meyer EL, Goemann IM, Dora JM, Wagner MS, Maia AL** 2008 Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in medullary thyroid carcinoma. *Molecular and Cellular Endocrinology* 289:16-22
52. **Magrassi L, Butti G, Silini E, Bono F, Paoletti P, Milanese G** 1993 The expression of genes of the steroid-thyroid hormone receptor superfamily in central nervous system tumors. *Anticancer Res* 13:859-66
53. **Toms SA, Hercbergs A, Liu J, Kondo S, Barnett GH, Casey G, et al.** 1998 Thyroid hormone depletion inhibits astrocytoma proliferation via a p53-independent induction of p21 (WAF/1CIP1). *Anticancer Res* 18:289-94
54. **Nauman P, Bonicki W, Michalik R, Warzecha A, Czernicki Z** 2004 The concentration of thyroid hormones and activities of iodothyronine deiodinases are

- altered in human brain gliomas. *Folia Neuropathol* 42:67-73
55. **Mori K, Yoshida K, Kayama T, Kaise N, Fukazama H, Kiso Y, et al.** 1993 Thyroxine 5-deiodinase in human brain tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1198-202
 56. **Barrera-Hernandez G, Park KS, Dace A, Zhan Q, Cheng SY** 1999 Thyroid hormone-induced cell proliferation in GC cells is mediated by changes in G1 cyclin/cyclin-dependent kinase levels and activity. *Endocrinology* 140:5267-74
 57. **Stahl JH, Kendall SK, Brinkmeier ML, Greco TL, Watkins-Chow DE, Campos-Barros A, et al.** 1999 Thyroid hormone is essential for pituitary somatotropes and lactotropes. *Endocrinology* 140:1884-92
 58. **Canettieri G, Franchi A, Sibilla R, Guzman E, Centanni M** 2004 Functional characterization of the CRE/TATA box unit of type 2 deiodinase gene promoter in a human choriocarcinoma cell line. *J Mol Endocrinol* 33:51-8
 59. **Rihn B, Mohr S, McDowell SA, Binet S, Loubinoux J, Galateau F, et al.** 2000 Differential gene expression in mesothelioma. *FEBS Lett* 480:95-100
 60. **Curcio C, Baqui MM, Salvatore D, Rihn BH, Mohr S, Harney JW, et al.** 2001 The human type 2 iodothyronine deiodinase is a selenoprotein highly expressed in a mesothelioma cell line. *J Biol Biochem* 276:30183-7
 61. **Morimura T, Tsunekawa K, Kasahara T, Seki K, Ogiwara T, Mori M, et al.** 2005 Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in human osteoblast is stimulated by thyrotropin. *Endocrinology* 146:2077-84
 62. **Marsh-Armstrong N, Huang H, Remo BF, Liu TT, Brown DD** 1999 Asymmetric growth and development of the *Xenopus laevis* retina during metamorphosis is controlled by type III deiodinase. *Neuron* 24:871– 878
 63. **Hernandez A, Garcia B, Obregon MJ** 2007 Gene expression from the imprinted Dio3 locus is associated with cell proliferation of cultured brown

- adipocytes. *Endocrinology* 148:3968–3976
64. Dentice M, Luongo C, Huang S, Ambrosio R, Elefante A, Mirebeau-Prunier D, Zavacki AM, Fenzi G, Grachtchouk M, Hutchin M, Dlugosz AA, Bianco AC, Missero C, Larsen PR, Salvatore D 2007 Sonic hedgehog-induced type 3 deiodinase blocks thyroid hormone action enhancing proliferation of normal and malignant keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14466–14471
 65. Richard K, Hume R, Kaptein E, Sanders JP, van Toor H, De Herder WW, den Hollander JC, Krenning EP, Visser TJ 1998 Ontogeny of iodothyronine deiodinases in human liver. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2868–2874
 66. Huang SA, Bianco AC 2008 Reawakened interest in type III iodothyronine deiodinase in critical illness and injury. *Nat Clin Pract* 4:148–155
 67. Olivares EL, Marassi MP, Fortunato RS, da Silva AC, Costa-e-Sousa RH, Araujo IG, Mattos EC, Masuda MO, Mulcahey MA, Huang SA, Bianco AC, Carvalho DP 2007 Thyroid function disturbance and type 3 iodothyronine deiodinase induction after myocardial infarction in rats a time course study. *Endocrinology* 148:4786–4792
 68. Simonides WS, Mulcahey MA, Redout EM, Muller A, Zuidwijk MJ, Visser TJ, Wassen FW, Crescenzi A, da-Silva WS, Harney J, Engel FB, Obregon MJ, Larsen PR, Bianco AC, Huang SA 2008 Hypoxia-inducible factor induces local thyroid hormone inactivation during hypoxic-ischemic disease in rats. *J Clin Invest* 118:975–983
 69. Wassen FW, Schiel AE, Kuiper GG, Kaptein E, Bakker O, Visser TJ, Simonides WS 2002 Induction of thyroid hormone-degrading deiodinase in cardiac hypertrophy and failure. *Endocrinology* 143:2812–2815
 70. Boelen A, Kwakkel J, Alkemade A, Renckens R, Kaptein E, Kuiper G, Wiersinga WM, Visser TJ 2005 Induction of type 3 deiodinase activity in

- inflammatory cells of mice with chronic local inflammation. *Endocrinology* 146:5128–5134
71. Boelen A, Boorsma J, Kwakkel J, Wieland CW, Renckens R, Visser TJ, Fliers E, Wiersinga WM 2008 Type 3 deiodinase is highly expressed in infiltrating neutrophilic granulocytes in response to acute bacterial infection. *Thyroid* 18:1095–1103
 72. Li WW, Le Goascogne C, Ramage M, Schumacher M, Pierre M, Courtin F 2001 Induction of type 3 iodothyronine deiodinase by nerve injury in the rat peripheral nervous system. *Endocrinology* 142:5190–5197
 73. Kester MHA, Toussaint MJM, Punt CA, Matondo R, Aarnio AM, Darras VM, Everts ME, de Bruin A, Visser TJ 2009 Large induction of type III deiodinase expression after partial hepatectomy in the regenerating mouse and rat liver. *Endocrinology* 150:541–546
 74. Baur A, Kohrle J 1999 Type 1 deiodinase is stimulated by iodothyronines and involved in thyroid hormone metabolism in human somatomammotroph GX cells. *Eur J Endocrinol* 140:367-70
 75. Huang SA, Tu HM, Harney JW, Venihaki M, Butte AJ, Kozakewich HPW, et al. 2000 Severe hypothyroidism caused by type 3 iodothyronine deiodinase in infantile hemangiomas. *N Eng J Med* 343:185-9
 76. Huang SA, Fish SA, Dorfman DM, Salvatore D, Kozakewich HP, Mandel SJ, et al. 2002 A 21-year-old Woman with consumptive hypothyroidism due to a vascular tumor expressing type 3 iodothyronine deiodinase. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4457-46
 77. Bessho K; Etani Y; Ichimori H; Miyoshi Y; Namba N; Yoneda A; Ooue T; Chihara T; Morii E; Aoki T; Murakami M; Mushiake S; Ozono K 2010 Increased type 3 iodothyronine deiodinase activity in a regrown hepatic

hemangioma with consumptive hypothyroidism. *Eur J Pediatr* 169(2): 215-21

Capítulo 2

Artigo Original:

*Increased type 3 deiodinase expression in
Human Papillary Thyroid Cancer*

Increased type 3 deiodinase expression in Human Papillary Thyroid Cancer

Nadja Zennig, Simone Magagnin Wajner, Miriam Romitti, Iuri Martin Goemann, Ana Laura Bueno, Erika L Souza Meyer and Ana Luiza Maia

Thyroid Section, Endocrine Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Keywords: Type 3 deiodinase, papillary thyroid cancer, gene expression

Grant support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Fundo de incentivo à pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE), Brazil.

Address for Correspondence and print request:

Prof. Dr. Ana Luiza Maia
Serviço de Endocrinologia, Setor de Tireóide
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350, Prédio 12, 4º andar
90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.
Phone: + 55 51 33310207
E-mail: almaia@ufrgs.br

Abstract:

Introduction: Deiodinase type 3 (D3) overexpression has been described in malignant cell lines and human tumors. Few data is available on D3 expression in thyroid neoplasias.

Objective: To evaluate D3 expression in papillary thyroid carcinoma (PTC) and correlate with pathological and oncological data.

Methods: Tumoral and corresponding normal thyroid tissues were evaluated from 18 unselected patients. D3 mRNA levels were measured by Real-Time PCR and its activity was determined by paper descendent chromatography measuring T2 released after incubation with ¹²⁵I-T3. Functional studies of D3 were done in K1 cells, a human PTC cell line.

Results: D3 mRNA expression was present in all tissues (18 paired tumor/normal tissues) and significantly increased in PTC compared with adjacent normal thyroid tissues (~5 fold, P=0.001). A higher level of D3 activity was detectable in PTC (0.79±0.51 fmol/min/mg.prot) whereas no activity was found in corresponding normal thyroid tissues. D3 activity was significantly associated with tumor size and tumor stage (P=0.002 and P=0.003, respectively). Additional analysis in K1 cells showed that D3 activity was down regulated by hypothyroidism and enhanced by T3 and cAMP.

Conclusion: These results indicate that the malignant transformation of thyroid follicular cell induces D3 expression by pre-transcriptional mechanisms. The association between increased levels of D3 activity and advanced disease further supports a role for intracellular T3 concentration in the thyroid cell proliferation or/and dedifferentiation.

Thyroid hormone influences a wide variety of biological events that includes the balance between proliferation and differentiation. Thyroid hormone signaling results from the interaction of T3 with nuclear receptors that, in concert with other transcription factors, stimulate or repress the expression of target genes, some of which are involved in the control of cellular proliferation (Yen PM, 2006). In addition to factors that impact thyroid status systemically, thyroid hormone signaling is also modulated locally in the tissue microenvironment by ligand activation and inactivation (Bianco AC, 2005). Type 1 (D1) and type 2 (D2) iodothyronine deiodinases catalyzes the activation of the T4 pro-hormone into T3 via outer-ring deiodination. In contrast, type 3 iodothyronine deiodinase (D3) catalyzes the inactivation of both T4 and T3 via inner-ring deiodination. D2 plays a critical role in providing local T3 to regulate intracellular T3 concentration and also seems to be an important source for circulating T3 in euthyroid and hypothyroidism, while D1 responds for the majority of T3 production in hyperthyroidism (Maia, 2005). D3 is the major inactivating pathway typically expressed in developing tissues.

Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy and accounts for approximately 1% of all human cancers. Follicular cell-derived thyroid cancers are classified into papillary thyroid cancer (PTC), follicular thyroid cancer (FTC) and anaplastic thyroid cancer. Both PTC and FTC constitute a group of differentiated thyroid cancers that exhibit evidence of follicular epithelial cell differentiation, such as iodine uptake and organification, and are usually treated successfully by primary surgical excision, radioiodine therapy and levothyroxine suppression (Maia AL, 2007; Cooper DS, 2006). PTC is the most common histotype of DTC and accounts for 85-90% of all thyroid malignancies (Franceschi S, 1993). The majority of patients with DTC have a favorable outcome, especially in those younger than 45 years at the time of diagnosis, with an overall 10-year relative survival rate over 90% (Tsang RW, 1998). However, up to 35% of patients experienced tumor recurrence during a 40-year follow-up and 35,000 patients worldwide die from thyroid cancer each year (Dohan O, 2001).

The majority of PTCs present constitutive activation of oncogene signaling pathways such as RET/PTC gene rearrangement, NTRK1 rearrangement and/or BRAF^{V600E}, a serine/threonine kinase mutation (Kimura ET, 2003; Xing M, 2005; Frattini

M, 2004). Among these abnormalities, BRAF^{V600E} is the most common genetic alteration, occurring in ~50% of PTCs, particularly in the more aggressive subtypes such as tall-cell PTC (Kimura ET, 2003; Nikiporova, 2003). Various degrees of abnormalities have already been demonstrated in the expression of major proteins involved in the complex machinery of thyroid hormone synthesis, such as thyroglobulin, thyroperoxidase, TSH receptor and Na⁽⁺⁾/I⁽⁻⁾ Symporter (Brabant, 1991; Otha, 1991; Lazar, 1999). Previous studies focusing on deiodinase type 1 (*DIO1*) and type 2 (*DIO2*) gene expression in benign and malignant thyroid tumors have demonstrated that D1 and D2 expression are diminished in tumoral tissue suggesting these proteins as markers of follicular cell dedifferentiation (Souza Meyer, 2008; Souza Meyer, 2005; Arnaldi, 2005; Murakami, 2001; Huang, 2001). There are no data on *DIO3* expression in normal or neoplastic thyroid tissue.

A potential role of D3 enzyme in the control of thyroid hormone metabolism and action during tumorigenesis has been suggested. D3 expression have been identified in some malignant cell lines and in a number of human tumors, including hemangiomas, pituitary gland adenoma, brain tumors and basal cell carcinomas (Kester, 2006; Dentice, 2009; Huang, 2005). Since T3 induces differentiation, a local hypothyroidism state could favor tumoral cell growth and/or dedifferentiation. Indeed, recent studies in basal cell carcinoma indicated a functional correlation between D3 activity and cell proliferation (Dentice, 2007). Little is known about the thyroid hormone inactivation metabolism by D3 in normal and tumoral thyroid tissue.

Here we have investigated the expression of D3 in human thyroid neoplasias and were able to found high levels of D3 mRNA and its activity in all samples of PTC analyzed, as also in samples of multinodular goiter. In PTC patients, interestingly, the increased D3 activity was associated with tumor size and tumoral stage, supporting a role for intracellular hypothyroidism in tumor proliferation.

Patients and Methods

Patients and tissues

Patients attended at the Divisions Endocrine or the Head and Neck Surgery at Hospital de Clínicas de Porto Alegre who underwent total thyroidectomy, independently indicated by attending physicians, and have had the histopathological diagnosis of PTC, provided samples for analysis of thyroid tissue from both tumor and normal adjacent region. All tissues obtained from these thyroidectomies were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70° until analysis. Tumors were histological classified according to WHO recommendations (Hedinger, 1988). Clinical data were retrospectively reviewed in medical records. The clinical stage was determined by the Tumor/Node/Metastases (TMN) system (Greene and Sobin, 2002).

Real-time PCR

Total RNA was extracted from normal or neoplastic tissue using Trizol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) and cDNA was synthesized using SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). The generated cDNAs were used in a real-time PCR using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Samples were measured by relative quantification (change in expression in the experimental group versus control; untreated versus treated cells). The data generated by the ABI Prism 7500 system SDS software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were then transferred to an Excel spreadsheet and the experimental values corrected by that of the cyclophilin standard. Oligonucleotides for hD3: 5'-ACTTCCTGCTGGTCTACATTGATG-3' and 5'-CTTCCTGGTTCTGGTGCTTCTTC-3', hD2: 5'-ACTTCCTGCTGGTCTACATTGATG-3' and 5'-CTTCCTGGTTCTGGTGCTTCTTC-3' and for internal control cyclophilin A: 5'-GTCAACCCACCGTGTTCTTC-3' and 5'-ACTTGCCACCAGTGCCATTATG-3' were used.

Cell Culture

Human papillary thyroid carcinoma cell line K1 was purchased from HPA Culture Collections (UK) and grown in DMEM:Ham's F12:MCDB105 (2:1:1) plus glutamine (2mM) and 10% fetal bovine serum. Cells were maintained at 37°C in a

humidified atmosphere of CO₂ (5%) and air (95%), and the culture medium was changed three times a week.

To evaluate the D3 regulation we used the K1 cell line. Cells were cultured for 18–24h in DMEM 0.1% BSA. T3 (10-200 μ M), (Bu)₂cAMP (1mM), TGF β (10-40ng/ml), or iopanoic acid (20 μ M) were added to the medium at the times indicated. All reagents were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). K1 cells were incubated with medium + vehicle (2% DMSO, control), or medium containing the specified compound for ~16 h. Each experiment was performed with duplicate dishes for each condition. At the appropriate times, cells were harvested and processed for total RNA extraction or measurement of D3 activity.

Assay of D3 activity

D3 activity in cell sonicates was determined using paper chromatography as previously described (Hernandez A, 2006; Galton VA, 2009). Detailed protocol was kindly provided by Dr. Valerie Galton. Cells were harvested and sonicated with Tris-HCl (10mM), 0.25 sucrose pH 7.5 buffers. Tissue homogenates were incubated for an hour with 200,000cpm [¹²⁵I] labeled T3, T3 (2nM) and DTT (20mM). The reaction was stopped by adding ethanol 95% (200 μ l), NaOH 0.04N (50 μ l) and PTU (5mg).

Deiodination was determined based on the amount of [¹²⁵I]-3,3'-T2 produced after separation of reaction products by paper chromatography.

Results were presented as the mean values derived from at least 2 independent experiments.

D3 Immunohistochemistry

The rabbit polyclonal D3 antibody D3-718 was affinity-purified as described previously (Dentice, 2007). D3 antibody 676 (Boelen A, 2005) was kindly provided by Dr. Domenico Salvatore.

Immunohistochemistry was performed on 6 μ m sections of previously formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. Sections representing PTC or normal thyroid tissue were submitted to routine immunohistochemical technique, which comprises

deparaffination and rehydration, antigenic recovery, inactivation of endogenous peroxidase, and blockage of unspecific reactions. Primary antibodies were incubated overnight at a temperature of 4°C, at dilutions of 1:400 (the same antibody concentration was also used for control) followed by application of streptavidin horseradish peroxidase conjugate (LSAB; DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), and diaminobenzidine tetrahydrochloride (Kit DAB; DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA).

Placenta tissue was used as a positive control, whereas the negative control was obtained by omission of the primary antibody.

BRAF V600E Mutation Analysis

DNA was extracted from 6µm slides from PTC paraffin-embedded formalin-fixed tissue blocks using the Magnesil Genomic Fixed Tissue System (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The BRAF exon 15 was amplified by PCR using oligonucleotides for BRAF exon 15:5'-ACCTAAACTCTTCATAATGCTTGCT-3' and 3'-CTGATTTTTGTGAATACTGGGAACT-5'.

To PCR amplification we used 100–300 ng/ml of DNA in a 25 µl reaction mix containing pH 8.0, Tris–HCl (20 mM), KCl (50 mM), MgCl₂ (2 mM), 0.2mM dNTPs, 0.2 mM of each primer, and 1.25 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technology, NY, USA). V600E mutation genotyping was performed using direct sequencing.

For sequencing, PCR products were purified using the GFX PCR DNA purification kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and submitted to direct sequencing using the Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistical analysis

Data are expressed as median and interquartile interval (P25-P75) for clinical features unless otherwise indicated. D3 activity was expressed as media ± SD. The association between D3 activity and tumor size and tumor stage was obtained by Spearman coefficient correlation. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test, as appropriate, and P < 0.05 was considered significant.

Results

Patients

The clinical and oncological characteristics of the 18 patients with PTC included in this study are shown in Table 1. The mean age was 45.67 ± 14.9 years and 61.1% were female. A total of 38.9% (n=7) of the patients had linfonodal metastasis while 22.2% (n=4) presented distant metastases. The median size tumor was 2.3cm (0.8-8). At the time of the surgery, all patients presented normal serum TSH levels (0.4-4 UI/L). The clinical features of the 18 patients with multinodular goiter (MNG) also included in this study are shown in table 1. The mean age was 55 ± 15.17 years at the time of surgery and 66.7% were females. The median goiter weight was 32.5 (9-162) gr.

Type 3 deiodinase expression

D3 transcripts were detected in all samples analyzed. Surprisingly, D3 mRNA was higher in PTC samples when compared with normal surrounding tissue (~5 fold, $P=0.0001$, Figure 1B). Accordingly, D3 activity was readily present in PTC samples (0.79 ± 0.51 fmol/mg.prot.min) whereas nearly undetectable in the surrounding normal tissue (Figure 1D). Immunohistochemistry assay with D3 antibody showed a strong positive staining in the thyroid cancer cells but rarely in stromal cells or surrounding healthy thyroid tissue (Figure 2).

Since thyroid hormone inactivation could be involved in tumor proliferation, we speculate on a potential correlation between increased D3 activity and tumor behavior. Indeed, D3 mRNA and activity were strongly correlated with tumor size and tumor stage ($r=0.55$, $P=0.002$ and $r=0.68$, $P=0.003$, respectively) (Figure 3).

Next we investigated whether D3 expression would also be induced in benign thyroid neoplasias. Similarly to what was observed with PTC samples, D3 mRNA was detected in all multinodular goiter samples analyzed and was significantly increased in tumor (~2.5 fold when compared to normal surrounding tissue, $P=0.001$, Figure 1A). Augmented D3 mRNA in multinodular goiter was paralleled by increased D3 activity, whereas normal tissue showed nearly undetectable D3 activity (0.25 ± 0.2

fmol/mg.prot.min, $P < 0.001$, Figure 1C). There was no association between D3 activity and clinical features of goiter patients, such as gender, age or weigh of goiter ($P = 0.58$, $P = 0.89$, $P = 0.38$, respectively).

Association between BRAF^{V600E} mutation and type 3 deiodinase activity

Since BRAF mediates the signal transduction of the MAPK, and this pathway is known to regulate D3, we next sought to investigate whether BRAF^{V600E} mutation could interfere with D3 activity. Of the 14 PTC samples analyzed, 5 (35.7%) were positive for BRAF^{V600E} mutation. There were no differences in clinical features (sex, age, tumor size and local or distant metastases, $P = 0.5$, 0.9 , 0.5 , 0.49 and 1 , respectively) between the patients who presented the BRAF mutation and those who were negative. Interestingly, D3 activity was significantly increased in BRAF^{V600E} mutated PTC samples as compared with those who did not present the mutation (1.05 (0.56 - 1.38) vs. 0.33 (0.30 - 0.52) fmol/mg.prot.min, $P = 0.026$, Figure 5).

D3 expression in PTC cell line

To assess the regulation of *DIO3* gene in PTC, we evaluate D3 mRNA and activity levels in a papillary thyroid tumor cell line (K1 cells). This cell line has been recently established to be papillary thyroid cancer and presents the V600E BRAF mutation (Pilli, 2009). In agreement with the results observed in PTC samples, D3 mRNA and activity were readily detected in K1 cell sonicates. Incubation with SeO₄ (100nM), (Bu)₂cAMP (1mM) or T₃ (10nM) induces significant increase in D3 activity (1.9 ± 0.1 vs. 2.71 ± 0.25 vs. 5.97 ± 0.08 vs. 3.62 ± 0.12 fmol/mg.prot.min, respectively, $P < 0.001$), whereas D3 activity was abolished by iopanoic acid (20 μ M) or by high T₃ doses (200nM) (Figure 4A).

We next aimed to determine whether D3 activity in K1 cells respond to TGF β stimulation. An 8-h incubation with of TGF β (10ng/ml) promoted a ~ 3.7 fold induction in D3 mRNA whereas enzyme activity increased in a dose dependent way (2.01 ± 0.01 vs. 2.26 ± 0.05 vs. 4.06 ± 0.08 fmol/mg.prot.min respectively, $P < 0.0001$, Figure 4B).

Discussion

In the present study, we demonstrated that D3 enzyme is highly expressed in PTC tissues and associated with tumor stage and tumor size. Immunohistochemistry confirmed a strong staining for D3 in the primary tumor as well as in the metastatic tissue. The biochemical and molecular properties of D3 enzyme in K1 cells, a human PTC cell line, were preserved despite follicular cell derangement. Interestingly, the more elevated D3 activity levels were observed in those patients with BRAF^{V600E} mutation, leading to a previously unknown mechanism of tumoral cell signaling that can be implicated in increased malignancy in papillary thyroid cancer.

Although D3 is highly expressed in developing organs, it is undetectable in most mature tissues, including the liver (Richard K, 1998). In adults, D3 is predominantly expressed in brain and skin (Campos-Barros, 1996; Huang, 1985). In the past few years, some studies started to unravel an important role of D3 in both health and disease. While much has been described about the functions of D1 and D2, the D3 reactivation has now been documented in a number of pathological states, including tumorigenesis and critical illness (Huang SA, 2000; Huang SA, 2008; Peeters, 2003; Wassen, 2002; Olivares, 2007). Here we demonstrates that D3 overexpression is also observed in benign and malignant thyroid tissues in which D3 expression seems to be proportional to the degree of cellular dedifferentiation. Compared to normal follicular thyroid tissue, D3 was substantially augmented in PTC samples whereas MNG tissues showed an intermediate augment.

A very interesting point observed here is our finding of a strong correlation between tumor size and stage and the higher levels of D3. The role of reactivated D3 in cancer has not been fully elucidated. A recent connection established between D3 and tumor cell proliferation was revealed in basal cell carcinoma (BCC) where D3 was shown to promote the proliferation of malignant keratinocytes by inhibiting the action of circulating thyroid hormone (Dentice, 2007). In the same setting, D2 degradation was induced, contributing for reduction of thyroid hormone action in the microenvironment (Dentice, 2007). This phenomenon could represent a proliferative advantage for tumoral cells versus the corresponding normal tissue. In fact, the direct effect of thyroid hormone

in cell proliferation and differentiation was also demonstrated in experiments with hypothyroid nude mice, since tumors induced in these animals were more aggressive with a strong incidence of distant metastasis (Martinez-Iglesias, 2009). This seems to be the case also in PTC, since the higher levels of D3, leading to an intracellular hypothyroid ambient, correlates with tumor aggressiveness.

The BRAF^{V600E} mutation is the most frequent genetic event in thyroid cancer, particularly in PTC and has been associated with more aggressive forms of the tumor (Riesco-Eizaguirre G, 2009). BRAF is a serine-threonine kinase that mediates the signal transduction of the MAP/extracellular signal-regulated kinase (ERK) of the MAPK pathway. Since D3 is already known to be regulated through this same pathway, we then hypothesized that the BRAF gain-of-function mutation BRAF^{V600E}, which provides an aberrant activation of downstream effectors of the cascade, could also interfere in the D3 activity. In fact, we observed that the BRAF positive samples showed a ~3 fold higher D3 activity, which could act in synergism leading to a more aggressive tumoral behavior. In normal thyroid cells, TGFβ inhibits proliferation and induces apoptosis. In tumoral cells, however, overexpressed TGFβ loses its original properties and is implicated on dedifferentiation and tumor invasion. It has been recently demonstrated that the MAPK/ERK pathway is essential for cells to migrate and invade after BRAF activation, and that TGFβ has a strong cooperative effect in this process. Besides, there is a widespread activation of TGFβ in human PTC and this is associated with extrathyroidal extension, nodal metastasis and BRAF status.

Besides a well-known correlation between changes on D3 mRNA and D3 activity, little is known of the molecular mechanisms that control this. Additional analysis in the K1 cells, a human PTC cell line, demonstrated that D3 is highly induced by TGFβ in a dose-dependent manner. Recent studies have shown that the *Dio3* gene is transcriptionally induced by TGFβ via Smad and MAPK-dependent pathway (Huang, 2005). The various isoforms of TGFβ are growth-inhibiting cytokines for cells of epithelial origin. In the early stages, TGFβ acts to arrest the growth of many cell types, whereas later in cancer progression it contributes to tumor invasiveness by changing the cell differentiation program (Zavadil, 2005; Huang, 2005). TGFβ expression and the intracellular mechanisms that mediate its action are known to be overexpressed not only

in multinodular goiter, but also in PTC (Matsuo, 2010; Santarpia, 2010; Pisarev, 2009; Matoba, 1998). Likewise, it seems that this pathway is important for PTC invasion (Vasko, 2007). Here we have shown that D3, highly induced by TGF β in thyroid cancer cells, can determine a novel mechanism of tumor dedifferentiation and aggressiveness.

In conclusion, the present results indicate that the malignant transformation of thyroid follicular cell induces D3 expression by pre-transcriptional mechanisms. The association between increased levels of D3 activity and advanced disease further supports a role for intracellular T3 concentration in the thyroid cell proliferation or/and dedifferentiation.

References

- Arnaldi LAT, Borra RC, Maciel RMB, Cerutti JM** 2005 Gene expression profiles reveal that DCN, DIO1, and DIO2 are underexpressed in benign and malignant thyroid tumors. *Thyroid* 15: 210-21
- Bianco AC, Larsen PR** 2005 Cellular and structural biology of the deiodinases. *Thyroid* 15(8): 777-86
- Boelen A, Kwakkel J, Alkemade A, Renckens R, Kaptein E, Kuiper G, Wiersinga WM, Visser TJ** 2005 Induction of type 3 deiodinase activity in inflammatory cells of mice with chronic local inflammation. *Endocrinology* 146: 5128-34
- Brabant G, Maenhaut C, K6hrle J, Scheumann G, Dralle H, Hoang-VU C, Hesch RD, Von Zur Muhlen A, Vassart G and Dumont JE** 1991 Human thyrotropin receptor gene: expression in thyroid tumors and correlation to markers of thyroid differentiation and dedifferentiation. *Mol Endocrinol* 82: R7-R12
- Campos-Barros A, Hoell T, Musa A, Sampaolo S, Stoltenburg G, Pinna G, Eravci M, Meinhold H, Baumgartner A** 1996 Phenolic and tyrosyl ring iodothyronine deiodination and thyroid hormone concentrations in the human central nervous system. *J Clin Endocrinol Metab* 81(6): 2179-85
- Cooper DS et al.** 2006 Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 16(2): 109-42
- Dentice M, Luongo C, Huang S, Ambrosio R, Elefante A, Mirebeau-Prunier D, Zavacki AM, Fenzi G, Grachtchouk M, Hutchin M, Dlugosz AA, Bianco AC, Missero C, Larsen PR, Salvatore D** 2007 Sonic hedgehog-induced type 3 deiodinase blocks thyroid hormone action enhancing proliferation of normal and malignant keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 14466 –14471

- Dentice M, Ambrosio R, Salvatore D** 2009 Role of type 3 deiodinase in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 13(11): 1363-73
- Dohan O, Baloch Z, Banrevi Z, Livolsi V, Carrasco N** 2001 Rapid communication: predominant intracellular overexpression of the Na (+)/I (-) symporter (NIS) in a large sampling of thyroid cancer cases. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2697-700
- Franceschi S, Boyle P, Maisonneuve P, et al.** 1993 The epidemiology of thyroid carcinoma. *Crit Rev Oncog* 4: 25-52
- Frattini M, Ferrario C, Bressan P, Balestra D, De Cecco I, Mondellini P, et al.** 2004 Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene* 23: 7436-40
- Galton VA, Schneider MJ, Clark AS, St Germain DL** 2009 Life without thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine conversion: studies in mice devoid of the 5'-deiodinases. *Endocrinology* 150(6): 2957-63
- Greene FL, Sobin LH** 2002 The TNM system: our language for cancer care. *J Surg Oncol* 80(3): 119-20
- Hedinger CE, Williams ED, Sobin LH** 1988 Histological typing of thyroid tumours. The WHO's international histological classification of tumours, 2nd revised ed. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Hernandez A, Martinez ME, Fiering S, Galton VA, St Germain D** 2006 Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis. *J Clin Invest.* 116(2): 476-84
- Huang TS, Chopra IJ, Beredo A, Solomon DH, Chua Teco GN** 1985 Skin is an active site for the inner ring monodeiodination of thyroxine to 3,3',5'-triiodothyronine. *Endocrinology* 117(5): 2106-13
- Huang SA, Tu HM, Harney JW, Venihaki M, Butte AJ, Kozakewich HPW, et al.** 2000 Severe hypothyroidism caused by type 3 iodothyronine deiodinase in infantile hemangiomas. *N Eng J Med* 343: 185-9

- Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, Hampel H, Wright FA, Kornacker K, LiVolsi V, Frankel W, Kloos RT, Eng C, Pellegata NS, de la Chapelle A 2001 Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26): 15044-9
- Huang SA 2005 Physiology and pathophysiology of type 3 deiodinase in Humans. *Thyroid* 15(8): 875-881
- Huang SA, Bianco AC 2008 Reawakened interest in type III iodothyronine deiodinase in critical illness and injury. *Nat Clin Pract* 4: 148 –155
- Kester MHA, Kuiper GGJM, Versteeg R, Visser T 2006 Regulation of type III iodothyronine deiodinase expression in human cell lines. *Endocrinology* 147: 5845-54
- Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA 2003 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* 63: 1454-57
- Lazar V, Bidart JM, Caillou B, Mahé C, Lacroix L, Filetti S, Schlumberger M 1999 Expression of the Na⁺/I⁻ symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 84(9): 3228-34
- Maia AL, Kim BW, Huang SA, Harney JW, Larsen PR 2005 Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. *J Clin Invest* 115: 2524-33
- Maia AL et al. 2007 Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: Brazilian consensus. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 51(5): 867-93
- Martínez-Iglesias O, García-Silva S, Regadera J, Aranda A 2009 Hypothyroidism enhances tumor invasiveness and metastasis development. *PLoS One* 29; 4(7): e6428
- Matoba H, Sugano S, Yamaguchi N, Miyachi Y 1998 Expression of transforming growth factor-beta 1 and transforming growth factor-beta Type-II receptor mRNA in papillary thyroid carcinoma. *Horm Metab Res* 30(10): 624-8

- Matsuo SE, Fiore AP, Siguematu SM, Ebina KN, Friguglietti CU, Ferro MC, Kulcsar MA, Kimura ET** 2010 Expression of SMAD proteins, TGF-beta/activin signaling mediators, in human thyroid tissues. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 54(4): 406-12
- Murakami M, Araki O, Hosoi Y, Kamiya Y, Morimura T, Ogiwara T, et al.** 2001 Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in human thyroid gland. *Endocrinology* 142: 2961-7
- Nikiforova MN, et al.** 2003 BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 88(11): 5399-404
- Ohta K, Endo T and Onaya T** 1991 The mRNA levels of thyrotropin receptor, thyroglobulin and thyroid peroxidase in neoplastic human thyroid tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 174: 1148-53
- Olivares EL, Marassi MP, Fortunato RS, da Silva AC, Costa-e-Sousa RH, Araujo IG, Mattos EC, Masuda MO, Mulcahey MA, Huang SA, Bianco AC, Carvalho DP** 2007 Thyroid function disturbance and type 3 iodothyronine deiodinase induction after myocardial infarction in rats a time course study. *Endocrinology* 148: 4786 – 4792
- Peeters RP, Wouters PJ, Kaptein E, van Toor H, Visser TJ, Van den Berghe G** 2003 Reduced activation and increased inactivation of thyroid hormone in tissues of critically ill patients. *J Clin Endocrinol Metab* 88(7): 3202-11
- Pilli T, Prasad KV, Jayarama S, Pacini F, Prabhakar BS** 2009 Potential utility and limitations of thyroid cancer cell lines as models for studying thyroid cancer. *Thyroid* 19(12): 1333-42
- Pisarev MA, Thomasz L, Juvenal GJ** 2009 Role of transforming growth factor beta in the regulation of thyroid function and growth. *Thyroid* 19(8): 881-92

- Richard K, Hume R, Kaptein E, Sanders JP, van Toor H, De Herder WW, den Hollander JC, Krenning EP, Visser TJ** 1998 Ontogeny of iodothyronine deiodinases in human liver. *J Clin Endocrinol Metab* 83(8): 2868-74
- Riesco-Eizaguirre G, Rodríguez I, De la Vieja A, Costamagna E, Carrasco N, Nistal M, Santisteban P** 2009 The BRAF^{V600E} oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer Res* 1; 69(21): 8317-25
- Santarpia L, Myers JN, Sherman SI, Trimarchi F, Clayman GL, El-Naggar AK** 2010 Genetic alterations in the RAS/RAF/mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 15; 116 (12): 2974-83
- Souza Meyer EL, Dora JM, Wagner MS, Maia AL** 2005 Decreased type 1 iodothyronine deiodinase expression might be an early and discrete event in thyroid cell dedifferentiation towards papillary carcinoma. *Clin Endocrinol* 62: 672-8
- Souza Meyer EL, Goemann IM, Dora JM, Wagner MS, Maia AL** 2008 Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in medullary thyroid carcinoma. *Mol Cell Endocrinol* 289:16-22
- Tsang RW, Brierley JD, Simpson WJ, et al.** 1998 The effects of surgery, radioiodine, and external radiation therapy on the clinical outcome of patients with differentiated thyroid carcinoma. *Cancer* 82: 375-88
- Wassen FW, Schiel AE, Kuiper GG, Kaptein E, Bakker O, Visser TJ, Simonides WS** 2002 Induction of thyroid hormone-degrading deiodinase in cardiac hypertrophy and failure. *Endocrinology* 143: 2812–2815
- Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, He H, Auer H, Liyanarachchi S, Larin A, Savchenko V, Francis GL, de la Chapelle A, Saji M, Ringel MD** 2007 Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20; 104(8): 2803-8

Xing M 2005 BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 12:245-262

Yen PM, Ando S, Feng X, Liu Y, Maruvada P, Xia X 2006 Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol. Cel. Biol.* 246: 121–127

Zavadil J, Böttinger EP 2005 TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 29; 24(37): 5764-74

Table 1: Clinical and oncological/pathological characteristics of the patients with papillary thyroid carcinoma and multinodular goiter

| PTC Patients <i>Patient no./</i> | Sex | Age (years) | Tumor Size (cm) | Tumor Stage | Invaded organ |
|----------------------------------------|-----|----------------|-----------------------|----------------|-------------------------------|
| 1 | M | 54 | 1.5 | 1 | |
| 2 | M | 54 | 8.0 | 2 | Cervical lymph nodes |
| 3 | M | 73 | 7.5 | 3 | Cervical lymph nodes |
| 4 | M | 26 | 1.3 | 1 | |
| 5 | F | 56 | 2.5 | 2 | Cervical lymph nodes |
| 6 | F | 38 | 1.8 | 1 | Cervical lymph nodes |
| 7 | M | 51 | 0.9 | 1 | Cervical lymph nodes |
| 8 | F | 36 | 1.0 | 1 | |
| 9 | F | 64 | 8.0 | 2 | |
| 10 | F | 50 | 2.3 | 2 | |
| 11 | M | 64 | 1.5 | 1 | |
| 12 | F | 24 | 0.8 | 2 | Cervical lymph nodes |
| 13 | F | 36 | 2.5 | 1 | |
| 16 | F | 54 | 0.8 | 3 | Cervical lymph nodes |
| 15 | M | 23 | 2.3 | 2 | Lung and Cervical lymph nodes |
| 16 | F | 27 | 6.4 | 2 | Lung and Cervical lymph nodes |
| 17 | F | 50 | 2.5 | 4 | Lung and Cervical lymph nodes |
| 18 | F | 42 | 2.7 | 2 | Lung and Cervical lymph nodes |
| Goiter Patients <i>Patient no./</i> | Sex | Age (years) | Goiter Weight (gr) | | |
| 1 | M | 37 | 15 | | |
| 2 | M | 23 | 13,7 | | |
| 3 | F | 50 | 12,5 | | |
| 4 | F | 61 | 9 | | |
| 5 | F | 93 | 137 | | |
| 6 | F | 41 | 40 | | |
| 7 | F | 45 | 25 | | |
| 8 | F | 61 | 115 | | |
| 9 | F | 51 | 160 | | |
| 10 | F | 74 | 25 | | |
| 11 | F | 60 | 68,4 | | |
| 12 | F | 64 | 30 | | |
| 13 | F | 47 | 65 | | |
| 14 | F | 53 | 12 | | |
| 15 | F | 65 | 98 | | |
| 16 | F | 55 | 37 | | |
| 17 | F | 64 | 130 | | |
| 18 | F | 57 | 28 | | |

Figure Legends

Figure 1 D3 expression and activity in multinodular goiter and human papillary thyroid carcinoma (PTC). (A) D3 mRNA expression levels in normal tissue and multinodular goiter, (B) D3 mRNA expression levels in normal tissue and PTC. Individual data points for each sample are depicted in D3 activity in goiter tissue (C) and PTC (D).

Figure 2 Immunohistochemical detection of D3 in normal thyroid tissue (A), PTC tissue (B), and normal and PTC tissue of the same sample (C) (20 × magnification). D3 staining is shown in brown.

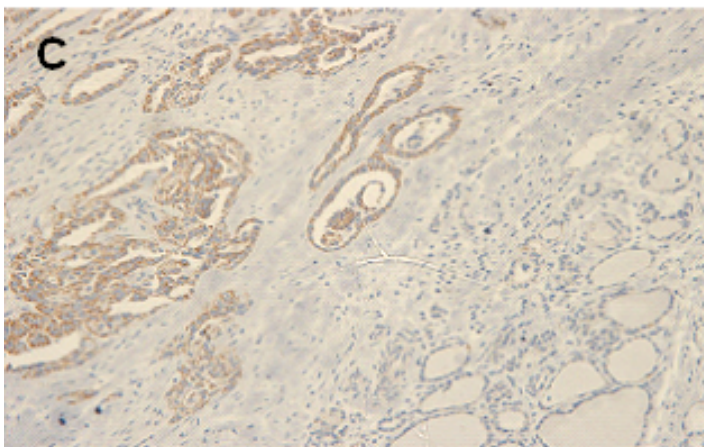
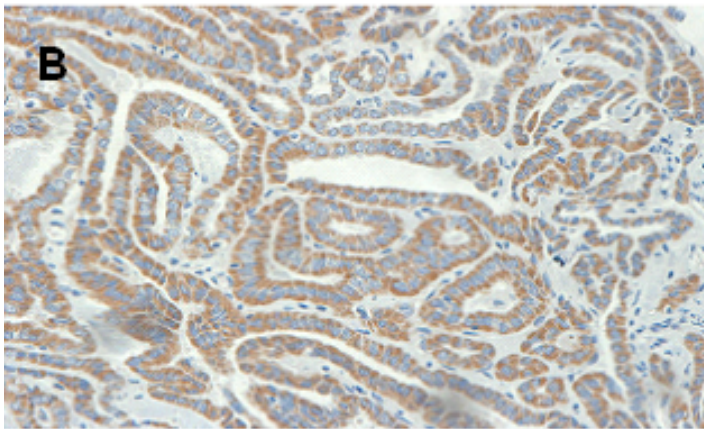
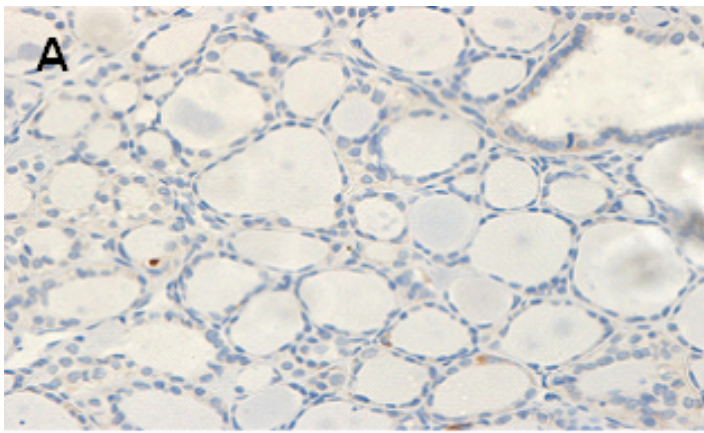
Figure 3 Association between tumor size (A), tumor stage (B) and D3 activity.

Figure 4 D3 expression and regulation in K1 cell line. (A) The effect of 100nM selenium (SeO₄), 1mM (Bu)₂cAMP, 10nM T₃, 200nM T₃ and 100uM Iopanoic Acid is indicated. (B) TGFβ induces D3 activity in a dose dependent way.

Figure 5 Association between the presence of BRAF^{V600E} mutation and augmented D3 activity.

P=0.003

Figure 2



- A** Normal Tissue
 - B** Tumoral Tissue
 - C** Normal vs. Tumoral Tissue
- 20x magnification

Figure 3

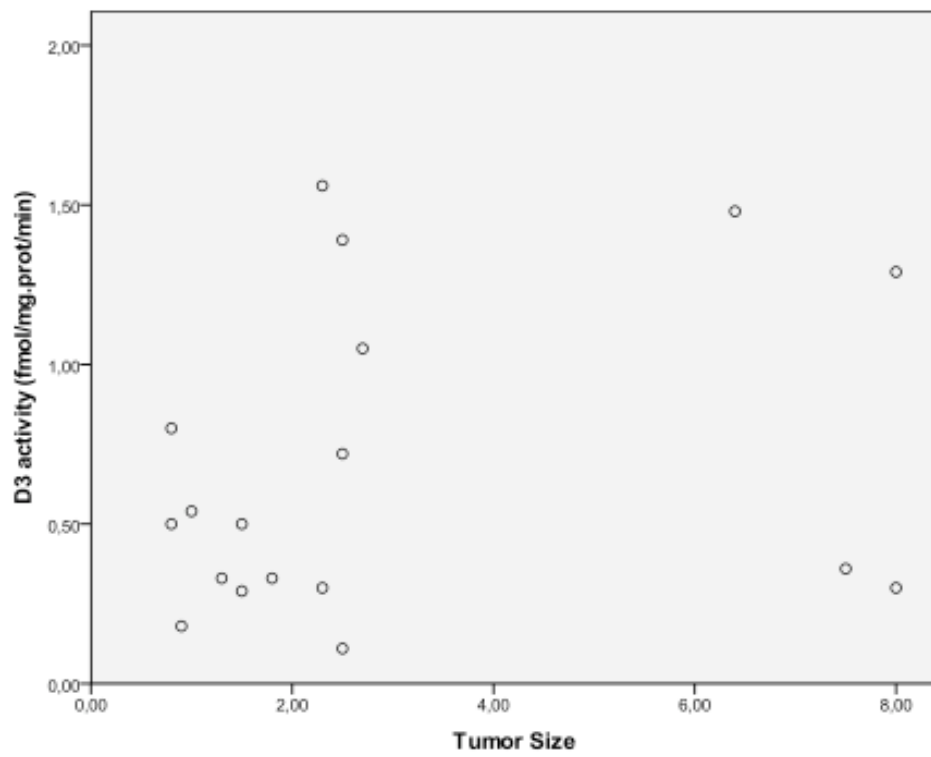
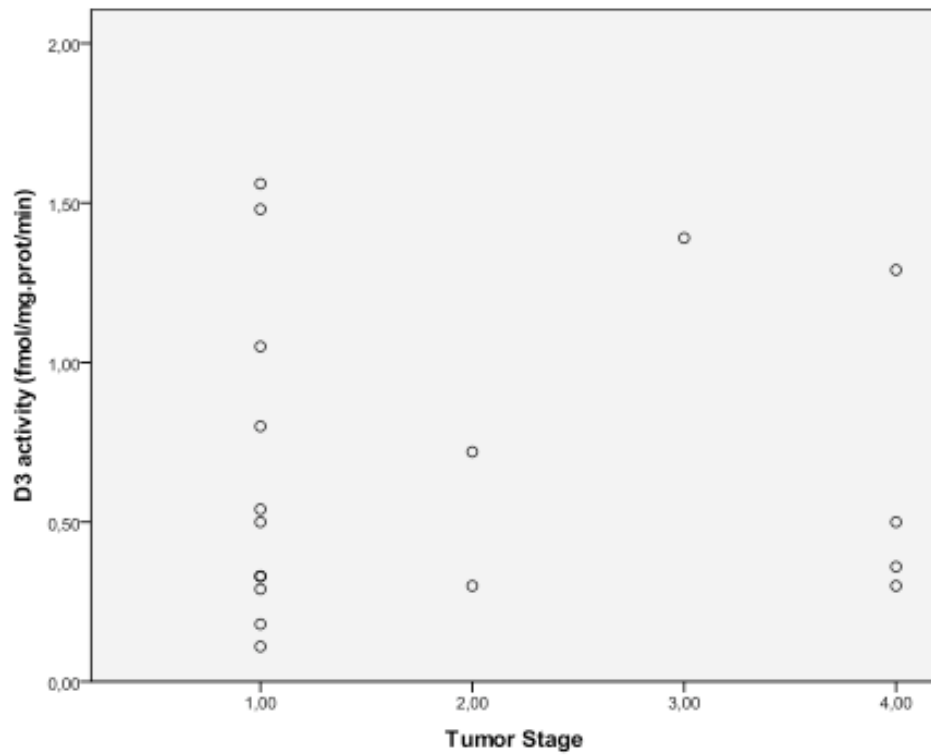


Figure 4

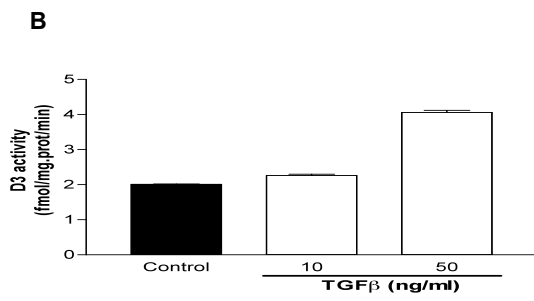
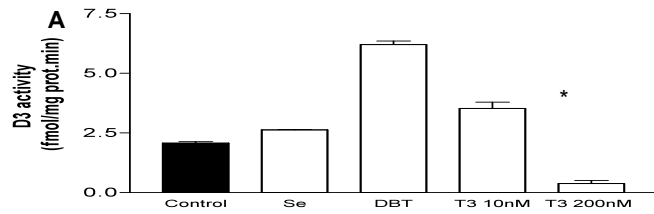
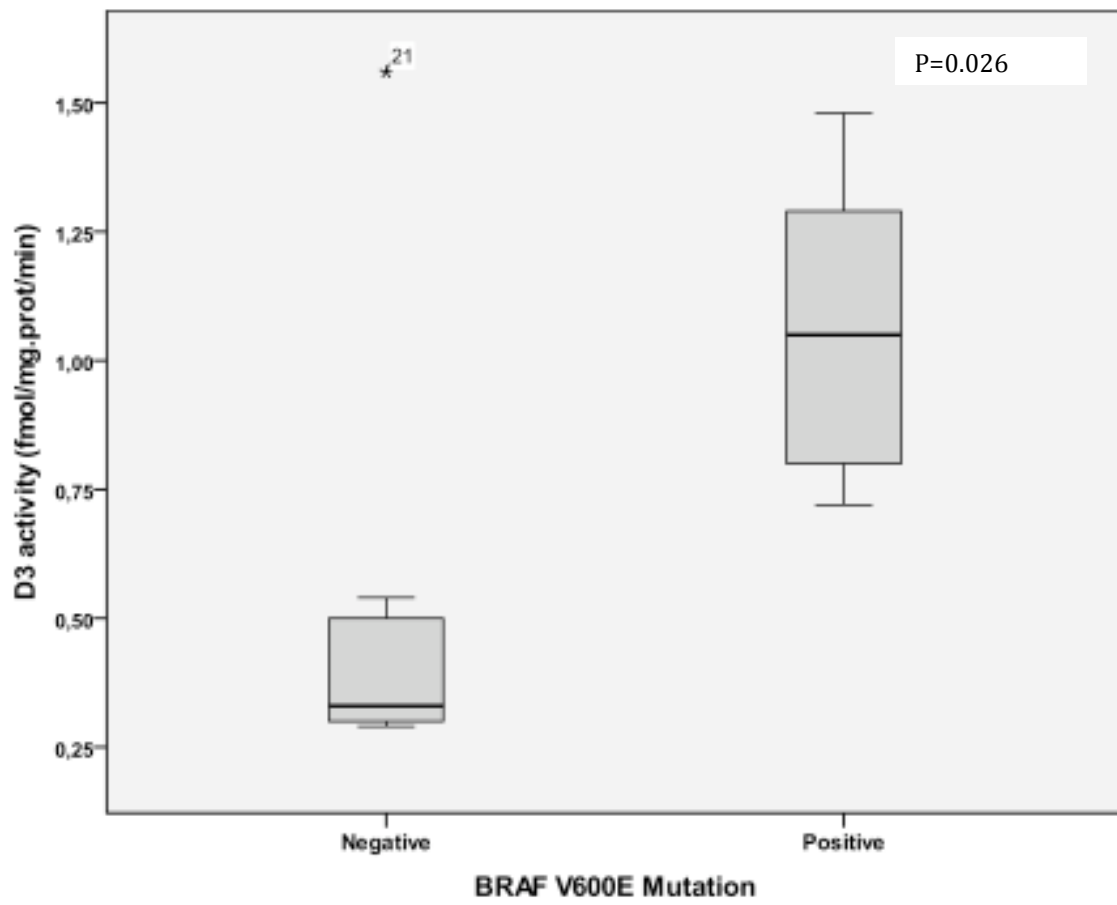


Figure 5



Z54e Zennig, Nadja

Expressão da desidase tipo 3 no carcinoma papilar de tireóide / Nadja Zennig ; orient. Ana Luiza Maia. – 2010.

63 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Carcinoma papilar 2. Neoplasias da glândula tireóide 3. Marcadores biológicos de tumor 4. Regulação enzimológica da expressão gênica I. Maia, Ana Luiza Silva II. Título.

NLM: WK 270

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA