

## MEG3 COMO UM REGULADOR TRANSCRICIONAL DA REGIÃO DLK1-DIO3 EM LINHAGENS CELULARES TUMORAIS TIREOIDEANAS HUMANAS

**Palavras-Chave:** RNA LONGO NÃO CODIFICANTE, NEOPLASIAS DA GLÂNDULA TIREÓIDE, CARCINOMA PAPILÍFERO DA TIREÓIDE.

**Autores:**

**ISABELLA BARBOSA CIPRIANO DA SILVA, IB – UNICAMP**

**Prof. Dr. MURILO VIEIRA GERALDO (orientador), IB - UNICAMP**

---

### INTRODUÇÃO:

#### 1.1 O câncer de tireoide

No Brasil, estudos epidemiológicos realizados pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), apontam que o número de casos novos de câncer de tireoide para cada ano entre 2023 e 2025 é de 16.660 casos, sendo 2.500 em homens e 14.160 em mulheres (representando a quinta maior incidência de câncer no sexo feminino), demonstrando um risco estimado de 7,68 por 100 mil habitantes. No contexto global, estima-se que 586.202 casos de câncer de tireoide foram relatados em 2020, tornando-se o 10º câncer mais frequente no mundo, sendo que, segundo estudos estatísticos, sua incidência e mortalidade deve aumentar em 29,9% e 67% respectivamente. O câncer de tireoide apresenta dois principais tipos determinados por suas características histológicas: tumores diferenciados e indiferenciados. Entre os subtipos de tumores diferenciados há o carcinoma papilífero (PTC- 80% dos casos) e carcinoma folicular da tireoide (FTC - 15% dos casos), mais comuns e derivados de células epiteliais foliculares. Por outro lado, os subtipos dos tumores indiferenciados são o carcinoma anaplásico da tireoide (ATC - 2% dos casos) e medulares da tireoide (MTC - 3% dos casos); sendo o anaplásico mais agressivos com uma taxa de sobrevida de aproximadamente seis meses após diagnóstico.

#### 1.2 Alterações genéticas no câncer de tireoide

Análises genômicas apontam o envolvimento da mutação de genes na regulação da via MAPK no PTC e da via PI3K no FTC. Nesse plano, as alterações genéticas ligadas a essas neoplasias podem se dividir em dois tipos principais: as pontuais, como as observadas nos genes *BRAF* e *RAS*; e as estruturais, como os rearranjos cromossônicos do tipo *RET/PTC* e *PAX8/PPARc*. Nesse sentido, a mutação T1799A no gene *BRAF* a mais prevalente no PTC, está associada a ativação persistente da via MAPK, uma cascata de ativação de proteínas quinases que regulam proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose. Assim, essa mutação acarreta o crescimento descontrolado e resistência à apoptose, contribuindo para o desenvolvimento de carcinomas.

Além destas alterações, estudos recentes direcionam outro gene como potencial influenciador no aparecimento e progressão de cânceres ao interferir no funcionamento correto da via MAPK: o gene *MEG3*. Situado na região DLK1-DIO3, *MEG3* dá origem a um RNA longo não codificante que interage com a via MAPK a depender do contexto celular, pesquisas recentes apontam seu potencial papel tanto como supressor tumoral, quanto associado à ativação excessiva da via, sendo até mesmo mencionado como agente efetor na proliferação e apoptose celular no câncer cervical ao regular *miR-21*. Ademais, estudos prévios de nosso grupo demonstraram a diminuição da expressão de diversos genes situados na região genômica DLK1-DIO3 no PTC.

#### 1.3 Região DLK1-DIO3 e o gene *MEG3*

A região DLK1-DIO3, localizada no braço longo cromossomo humano 14 (14q32), possui três genes

codificadores de proteínas (*DLK1*, *RTL* e *DIO3*), expressos a partir do alelo paterno, e genes não codificadores de proteínas (*MEG3*, *MEG8*, *snoRNAs* e dezenas de *miRNAs*), expressos a partir do alelo materno. A expressão dos genes desta região é controlada por mecanismos epigenéticos, a partir de regiões diferencialmente metiladas (IG-DMR e MEG3-DMR) e por modificações pós-traducionais em proteínas histonas. Esta região ganha destaque por apresentar diversos genes de *miRNAs* que já foram apontados na literatura, incluindo nosso grupo, como moduladores da progressão e agressividade tumoral.

O gene *MEG3* é responsável pela transcrição de um RNA longo não codificante (LncRNA). Apresenta expressão diminuída no PTC e outros tumores, com, com impacto significativo sobre a migração e invasão tumoral. No entanto, sua expressão por fibroblastos associados ao câncer (CAFs) está associada à metástase linfonodal no câncer de tireoide. Portanto, novos estudos são necessários para a elucidação do papel de *MEG3* no PTC. Sabe-se que RNAs longos não codificadores podem atuar como potentes moduladores da cromatina e, consequentemente, da expressão gênica. *MEG3* pode regular o *imprinting* em *cis* da região *DLK1-DIO3* durante a diferenciação de células tronco, fenômeno dependente de EZH2, induzindo metilação excessiva do DNA na IG-DMR na ausência desta proteína. Além disso, outros estudos indicam o envolvimento de *MEG3* em mecanismos epigenéticos no controle da expressão dos *miRNAs* desta região em diversos tipos de câncer. No PTC, a influência de *MEG3* sobre os mecanismos envolvidos na expressão aberrante dos genes da região *DLK1-DIO3* continuam pouco esclarecidos.

## OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto da super-expressão de *MEG3* sobre outros genes da região *DLK1-DIO3* em linhagens tumorais tiroideanas.

### 2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho constam com: 1-Clonagem do gene *MEG3* em plasmídeo pMSCV-puro para expressão em células de carcinoma papilífero humano; 2- Transfecção do plasmídeo pCI-MEG3 em linhagens de carcinoma tiroideano; 3- Avaliar o impacto da superexpressão de *MEG3* sobre outros genes da região *DLK1-DIO3* (*DLK1*, *RTL1*, *DIO3* e diferentes *miRNAs*).

## METODOLOGIA:

### 3.1 Linhagens, meio de cultivo e plasmídeos

Utilizaremos as linhagens derivadas de carcinoma papilífero humano TPC-1 e BCPAP, portadoras do rearranjo cromossômico *RET/PTC1* e da mutação *BRAFT1799A*, respectivamente, e linhagens de carcinoma anaplásico KTC-2 e 8305C, portadoras do oncogene *BRAFT1799A*. As linhagens celulares foram gentilmente cedidas pela Profa Dra Edna Teruko Kimura (Dep de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo). As linhagens TPC-1 e BCPAP serão mantidas em meio DMEM suplementadas com 5% e 10% de soro fetal bovino (SFB, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). As linhagens KTC-2 e 8305C serão mantidas em meio RPMI suplementadas com 10% de SFB, em estufa sob condições de 95 % de ar e 5 % de CO<sub>2</sub>, a 37°C, na presença de 1 X solução antibiótica e antifúngica (Antibiotic-Antimycotic, 100X, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL, e anfotericina B 25 µg/mL, Thermo Fisher, Grand Island, NY, USA).

### 3.2 Clonagem molecular de *MEG3* em plasmídeo pMSCV

Uma vez que o plasmídeo obtido comercialmente pCI-MEG3 (Addgene #44727) não apresenta gene de resistência para cultivo em células eucarióticas, o inserto será removido e subclonado em

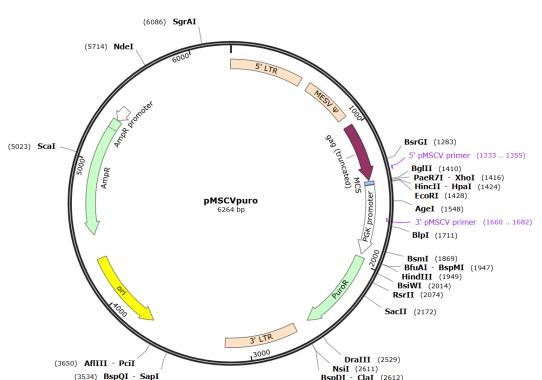


Figura 1. Backbone do plasmídeo pMSCV. Fonte: <https://www.addgene.org/68469/>.

pMSCV-puro, contendo gene de resistência à ampicilina. O inserto contendo *MEG3* será retirado do plasmídeo pCI-MEG3 por meio de digestão dupla utilizando tampão O (ThermoFisher), 20U *NotI*, 40U *Xhol* em 20 $\mu$ L de volume final. Após confirmação da digestão e purificação do inserto por eletroforese em gel de agarose, 37,5 ng de inserto serão ligados a 50 ng de pMSCV-puro previamente digerido com a enzimas *Xhol*, conforme descrito acima, em reação contendo tampão de ligação 1X T4 DNA Ligase Buffer (New England Biolabs) e 400 U de enzima T4 DNA Ligase, em volume final de 20 $\mu$ L. Para validação das digestões será realizada eletroforese em gel de agarose (Agarose, Bioreagent Sigma Aldrich) á 8% em tampão TAE (Tris-acetaato-EDTA) com condições de corrida de 80V por 1 hora. Os marcadores de peso molecular serão 1kb Plus DNA Ladder Invitrogen e 1 kb DNA Ladder (Sigma Aldrich).

### **3.3 Transformação do plasmídeo pCI-MSCV-MEG3 em células termo-competentes**

O plasmídeo recém construído será transformado em bactérias termo-competentes DH5alpha (ThermoFisher). A cepa será cultivada em meio LB (bacto-triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, cloreto de sódio 5g/L e 15g de glicose por litro de água destilada) seguindo o protocolo do fabricante; armazenada em freezer à -80°C. Colônias resistentes a ampicilina (200 µg/mL) serão expandidas para extração de DNA plasmidial. Para isso será utilizado o kit HP Plasmid Miniprep Kit (GenElute) seguindo as orientações do fabricante. Para validação da transformação será realizada eletroforese em gel de agarose (Agarose, Bioreagent Sigma Aldrich) á 8% em tampão TAE (Tris-acetaato-EDTA) com condições de corrida de 80V por 1 hora. Os marcadores de peso molecular serão 1kb Plus DNA Ladder Invitrogen e 1 kb DNA Ladder (Sigma Aldrich).

### **3.4 Transfecção do plasmídeo pCI-MEG3 para células de linhagem tumoral de tireoide**

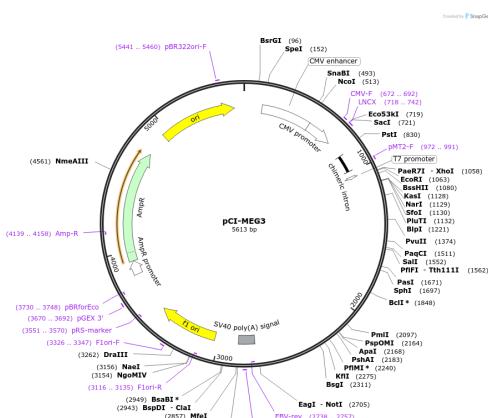
A transfecção do plasmídeo nas células tumorais será feita usando 2,5 $\mu$  g de plasmídeo (pCI-MEG3) conjugado a Lipotectamine 2000 (ThermoFisher) de acordo com as instruções do fabricante. Plasmídeo pMSCV-puro-Ø será transfetado para a constituição do grupo controle. Após a transfecção, as linhagens celulares serão mantidas em meio de cultura contendo 5  $\mu$ g/mL de puromicina. A superexpressão de MEG3 será confirmada por RT-qPCR.

### 3.5 Análises do impacto de MEG3 sob a expressão de genes da região DLK1-DIO3 por PCR quantitativo em tempo real

As análises da expressão gênica realizadas por RT-q-PCR, tanto a confirmação da super-expressão de mEG3 quanto a quantificação dos níveis de DLK1, RTL1 e DIO3 e de diferentes miRNAs já estudados por nosso grupo.

Extração de RNA total: O RNA total será extraído das linhagens TPC-1, BCPAP, KTC-2 e 8305C, transfetadas com pMSCV-puro-Ø ou pCI-MSCV-MEG3, conforme descrito por Chomczynski e Sacchi 1987. Para isso,  $5 \times 10^4$  células serão plaqueadas em placas de 60mm e coletadas em Trizol após 72h.

**Síntese de DNA complementar:** Para a síntese de cDNA de mRNA dos genes, 2 µg do RNA total serão adicionados a DTT (5 mM), inibidor de RNase (20 U), mix de dNTP 0,5 nM e 1 µL de transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. O gene *RPL19* será utilizado como controle endógeno. Para a análise da expressão de miRNAs será utilizado o kit miRNA Reverse Transcription® e primers específicos para cada miRNA (miR-665, PN: 002681; miR-495-3p, PN: 478136; miR-485-5p, PN: 001036; Applied Biosystems ThermoFisher). Dez nanogramas de RNA total serão usados para a síntese em 20 µL de solução final contendo de tampão 1X, mix de dNTP (5 mM), inibidor de RNases (4 U) e transcriptase reversa Multiscribe® e 3 µL de primer específico para cada miR-495, miR-485 e miR-665. A reação será realizada nas seguintes condições: 16°C por 30 min, 40°C por 30 min e 85°C por 5 min para inativação da transcriptase.



**Figura 2.** Backbone do plasmídeo pCI-MEG3. Fonte: <https://www.addgene.org/44727/>.

**qPCR:** A expressão dos genes *DLK1*, *RTL1* e *DIO3* será analizada utilizando o kit SYBR® Green Dye (Applied Biosystems) e a expressão dos miRNAs será analizada utilizando o kit TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (ThermoFisher), conforme instrução dos fabricantes. As reações serão realizadas em volume total de 20 µL, contendo 50 ou 10ng do cDNA, para mRNA ou miRNAs respectivamente, 5 µL de primers específicos e respectivo reagente Master Mix (SYBR® Green ou TaqMan Universal Master Mix II, no UNG). As corridas serão executadas no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A quantificação relativa da expressão será determinada pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Os primers específicos utilizados para os genes serão sintetizados utilizando o programa Primer3 (<https://www-primer3plus.com/>).

### 3.6 Análise estatística

Todas as análises estatísticas serão realizadas no programa GraphPad Prism versão 9.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Os ensaios funcionais e a análise de expressão serão submetidos ao teste Student's t-test para comparação entre dois grupos, comparações entre três ou mais grupos serão feitas por meio do teste One-Way ANOVA. Os resultados serão considerados significativos quando  $P<0,05$ . Graficamente, os resultados serão apresentados como média ± do desvio padrão (DP).

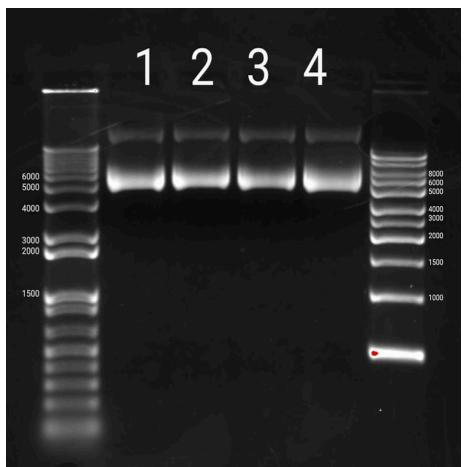


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose da extração de DNA plasmidial pCI-MEG3 de quatro colônias coletadas. 1- colônia 1; 2- colônia 2 ; 3- colônia 3; 4- colônia 4.

## RESULTADOS PRELIMINARES:

### 4.1 Expansão do plasmídeo pCI-MEG3 em bactérias termo-competentes

Foi realizada a expansão do plasmídeo pCI-MEG3 por meio da sua transformação em bactérias termo-competentes DH5alpha. Em seguida, foi realizada a extração do DNA plasmidial. Visto que pCI-MEG3 possui tamanho de 5613 bps, a validação da expansão foi realizada por meio da eletroforese da amostra de quatro colônias selecionadas em gel de agarose 8%. Nas extremidades da Fig. 3 foram adicionados os marcadores de peso molecular (1kb).

### 4.2 Clonagem molecular de MEG3 em plasmídeo pMSCV

A digestão com enzimas de restrição foi realizada para se obter o isolamento do gene *MEG3* provindo do pCI-MEG3 e se promover a abertura de pMSCV onde tal inserto será inserido posteriormente. Foram feitas duas digestões para o isolamento do gene, a primeira em tampão Anza com adição da enzima *Xhol* e saturação da enzima *NotI*; a segunda digestão foi realizada em tampão O com adição da enzima *NotI* e saturação da enzima *Xhol*. A digestão para abertura e consequente linearização do

plasmídeo pMSCV foi realizada em tampão Anza com adição da enzima *Xhol*. Visto que o inserto MEG3 possui tamanho de 1600bps e que pMSCV de 6264 bps, uma eletroforese em gel de agarose agarose 8%. Nas extremidades da Fig. 4 foram adicionados os marcadores de peso molecular (1KB).

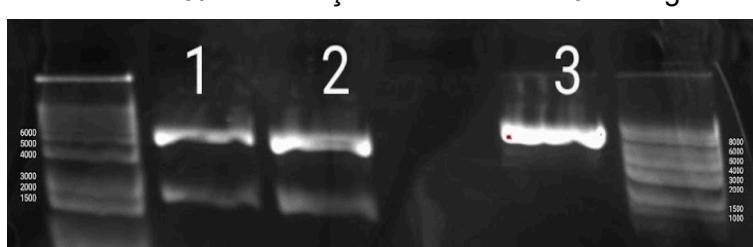


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose da extração de DNA plasmidial pCI-MEG3 de quatro colônias coletadas. 1- Digestão de pCI-MEG3 em tampão Anza; 2- Digestão de pCI-Meg3 em tampão O; 3- digestão de pMSCV (aberto) em tampão Anza.

## CONCLUSÃO E PRÓXIMAS ETAPAS

Conclui-se que a transformação das bactérias termo-competentes para expansão do plasmídeo pCI-MEG3 foi bem sucedida, assim como a digestão com enzimas de restrição para o isolamento do gene *MEG3* e abertura do plasmídeo pMSCV. Em seguida, será realizada a purificação do inserto, sua clonagem em plasmídeo pMSCV e sua posterior transfecção nas células tumorais tireoideanas, a fim

de se obter futuras análises sobre os efeitos da superexpressão do gene. Logo, avaliando o impacto da superexpressão de *MEG3* sobre outros genes da região *DLK1-DIO3* (*DLK1*, *RTL1*, *DIO3* e diferentes miRNAs).

## BIBLIOGRAFIA:

- AAVIK E, et al. **Global DNA methylation analysis of human atherosclerotic plaques reveals extensive genomic hypomethylation and reactivation at imprinted locus 14q32 involving induction of a miRNA cluster.** *Eur Heart J.* 2015;36(16):993–1000.
- ALVES LF, DA SILVA IN, DE MELLO DC, FUZIWARA CS, GUIL S, ESTELLER M, et al. **Epigenetic regulation of DLK1-DIO3 region in thyroid carcinoma.** *Cells.* 2024;13(12):1001.
- ALVES LF, GERALDO MV. **MiR-495-3p regulates cell migration and invasion in papillary thyroid carcinoma.** *Front Oncol.* 2023;13:1039654.
- ALVES LF, MARSON LA, SIELSKI MS, VICENTE CP, KIMURA ET, GERALDO MV. **DLK1-DIO3 region as a source of tumor suppressor miRNAs in papillary thyroid carcinoma.** *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2024.
- CLARK OH. **Predictors of thyroid tumor aggressiveness.** *West J Med.* 1996;165(3):131–8.
- DADAFARIN S, RODRÍGUEZ TC, CARNAZZA MA, TIWARI RK, MOSCATELLO A, GELIEBTER J. **MEG3 expression indicates lymph node metastasis and presence of cancer-associated fibroblasts in papillary thyroid cancer.** *Cells.* 2022;11(3181).
- DAS PP, HENDRIX DA, APOSTOLOU E, et al. **PRC2 is required to maintain expression of the maternal Gtl2-Rian-Mirg locus by preventing de novo DNA methylation in mouse embryonic stem cells.** *Cell Rep.* 2015;12(9):1456–70.
- FARHADOVA S, GHOUSEIN A, CHARON F, et al. **The long non-coding RNA Meg3 mediates imprinted gene expression during stem cell differentiation.** *Nucleic Acids Res.* 2024;52(11):6183–200.
- FORMOSA A, LENA A, MARKERT E, et al. **DNA methylation silences miR-132 in prostate cancer.** *Oncogene.* 2013;32:127–34.
- FORMOSA A, MARKERT E, LENA A, et al. **MicroRNAs mapped to the 14q32.31 locus regulate proliferation, apoptosis, migration and invasion in metastatic prostate cancer cells.** *Oncogene.* 2014;33:5173–82.
- GERALDO MV, NAKAYA HI, KIMURA ET. **Down-regulation of 14q32-encoded miRNAs and tumor suppressor role for miR-654-3p in papillary thyroid cancer.** *Oncotarget.* 2017;8(6):9597–607.
- GREIFE A, et al. **Concomitant downregulation of the imprinted genes DLK1 and MEG3 at 14q32.2 by epigenetic mechanisms in urothelial carcinoma.** *Clin Epigenetics.* 2014;6:29.
- HE Y, LUO Y, LIANG B, YE L, LU G, HE W. **Potential applications of MEG3 in cancer diagnosis and prognosis.** *Oncotarget.* 2017;8(42):73282–95.
- HUSSAIN MS, et al. **The complex role of MEG3: An emerging long non-coding RNA in breast cancer.** *Pharmacol Res.* 2023;188:154850.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Síntese de resultados e comentários** [Internet]. Brasília: INCA; 2025.
- LÔRO G, WANG M, WU X, TAO D, XIAO X, WANG L, et al. **Long non-coding RNA MEG3 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in prostate cancer.** *Cell Physiol Biochem.* 2015;37(6):2209–20.
- MACIEL RM, KIMURA ET, CERUTTI JM. **[Pathogenesis of differentiated thyroid cancer (papillary and follicular)].** *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2005;49(5):691–700.
- PENG W, SI S, ZHANG Q, et al. **Long non-coding RNA MEG3 functions as a competing endogenous RNA to regulate gastric cancer progression.** *J Exp Clin Cancer Res.* 2015;34:79.
- ROCHA ST, EDWARDS CA, ITO M, OGATA T, FERGUSON-SMITH AC. **Genomic imprinting at the Dlk1-Dio3 domain in mammals.** *Trends Genet.* 2008;24(6):306–16.
- SANLI I, LALEVÉE S, CAMMISA M, PERRIN A, RAGE F, LLÈRES D, et al. **Meg3 non-coding RNA expression controls imprinting by preventing transcriptional upregulation in cis.** *Cell Rep.* 2018;23(2):337–48.
- SHANK JB, ARE C, WENOS CDC. **Thyroid cancer: global burden and trends.** *Indian J Surg Oncol.* 2021;13(1):40–5.
- TACCALITI A, BÓSPARO M. **Genetic mutations in thyroid carcinoma.** *Minerva Endocrinol.* 2009;34(1):11–28.
- ZHANG J, YAO T, WANG Y, YU J, LIU Y, LIN Z. **Long noncoding RNA MEG3 is downregulated in cervical cancer and affects cell proliferation and apoptosis by regulating miR-21.** *Cancer Biol Ther.* 2016;17(1):104–13..
- ZHANG L, et al. **Biological roles and molecular mechanisms of long non-coding RNA MEG3 in cancer traits.** *Cancers (Basel).* 2022;14(24):6032.
- ZHANG X, et al. **Upregulated miR-155 in papillary thyroid carcinoma promotes tumor growth by targeting APC and activating Wnt/β-catenin signaling.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(8):E1305–13.