

MEG3 COMO UM REGULADOR TRANSCRICIONAL DA REGIÃO DLK1-DOI3 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 cromossômicos 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

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, conseqüentemente, 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.

[illegible]

Figura 2. Backbone do plasmídeo

qPCR: A expressão dos genes *DLK1*, *RTL1* e *DIO3* será analisada utilizando o kit SYBR® Green Dye (Applied Biosystems) e a expressão dos miRNAs será analisada 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$. 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 $\pm$ do desvio padrão (DP).

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 *XhoI* e saturação da enzima *NotI*; a segunda digestão foi realizada em tampão O com adição da enzima *NotI* e saturação da enzima *XhoI*. A digestão para abertura e consequente linearização do

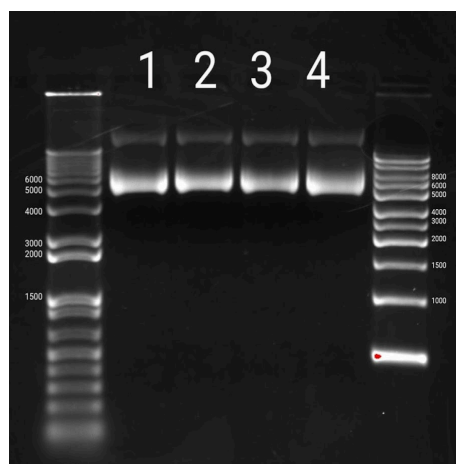


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose da extração de DNA plasmidial pCI-MEG3 de quatro colônias coletadas. 1- colônia 1; 2 - colônia 2 ; 3- colônia 3; 4- colônia 4.



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.

plasmídeo pMSCV foi realizada em tampão Anza com adição da enzima *XhoI*. 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).

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.