

PAOLA MARINO DANTONIO

**O papel de NODAL, membro da superfamília TGF- β , no câncer de
tiroide**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2019

PAOLA MARINO DANTONIO

**O papel de NODAL, membro da superfamília TGF- β , no câncer de
tiroide**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Edna Teruko Kimura

Versão original.

São Paulo
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Marino Dantonio, Paola
/ Paola Marino Dantonio; orientadora Edna
Teruko Kimura. -- São Paulo, 2019.
79 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Câncer de tireoide. 2. TGF-beta. 3. Nodal. 4.
Diferenciação celular. I. Teruko Kimura, Edna,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Paola Marino Dantonio

Título da Dissertação/Tese: O papel de NODAL, membro da superfamília TGF- β , no câncer de tireoide

Orientador(a): Edna Teruko Kimura

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 22 de agosto de 2018.

PARECER 1402/CEPSH

CAAE nº 94667118.3.0000.5467

Protocolo CEPSH-ICB nº 1447/18

O Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "**Influência do Cross-Talk da Sinalização Notch/Nodal e microRNAs no Câncer de Tireoide**", das pesquisadoras Profa. Dra. **Edna Teruko Kimura** e aluna Paola Marino Dantonio.

Caberá às pesquisadoras elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: ww2.icb.usp.br/icb/cepsb, como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto. O primeiro relatório deverá ser enviado, via Plataforma Brasil, até **22/08/2019**.

Atenciosamente,

Profa. Dra. **CAMILA SQUARZONI DALE**
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.027/2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 108/2016/CEUA, datado de 13/09/2016, e por solicitação da Profa. Dra. **Edna Teruko Kimura**, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Paola Marino Dantonio** ao Projeto de Pesquisa "*Controle da proliferação da célula folicular da tiroide e câncer*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 06 de março de 2017.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador da CEUA-ICB/USP

Dedico esta dissertação aos meus pais,
que sempre me guiaram ao caminho
da honestidade e persistência.

AGRADECIMENTOS

À professora Edna, o meu reconhecimento pela orientação, pela importante contribuição em minha formação científica e pelas valiosas oportunidades de enriquecimento profissional e pessoal.

À Dr^a Lynne por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, pela confiança depositada em mim e pelas oportunidades de aprendizado.

Aos membros do Lab Tiroide (Cesar, Kelly, Débora, Daniel e Viviane) e do grupo Postovit & Fu (Guihua, Jiahui, Gabrielle, Zhihua, Douglas, Olena, Michael, Laura, Mackenzie, Indrani, Jeff, Huachen, Jiesi, Alaa, Bahareh, Marina, Xiaowei). Obrigada por todos os ensinamentos, discussões, e pelo ambiente de trabalho.

À amiga Fernanda Talarico pelo suporte com as análises estatísticas.

A todos os colegas, funcionários e docentes do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento pelo suporte técnico, administrativo e científico.

Aos membros da banca de qualificação, Dra. Vanessa M. Freitas, Dr. João Roberto Maciel Martins e Dra. Glaucia M. Machado Santelli pelas críticas e sugestões.

À amiga Anna Julia pela fiel amizade e presença nos momentos críticos enfrentados profissional e pessoalmente. Obrigada por sempre abrir meus olhos e mente para a positividade das coisas.

Ao amigo Doug Quilty pela amizade e valiosa ajuda técnica e científica. Obrigada pela companhia, paciência, honestidade demasiada, e por corrigir meus e-mails em inglês.

A todos os amigos que me acompanharam e fizeram dessa jornada menos difícil.

Aos meus mestres Shihan Marcos Costa e Sensei Claudemir de Oliveira pelos incentivos, por acreditarem mim e, principalmente, me fazerem acreditar em mim mesma.

À FAPESP, CNPq e Alberta Innovates pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

À Nathalia pelo apoio em todos os momentos, principalmente os de incerteza e ansiedade. Obrigada por me aceitar, por me acompanhar sempre, pelo amor e carinho.

À minha família, em especial meus pais, Vera e Mario, e minha irmã, Pamela, pelas batalhas diárias que enfrentaram para que eu pudesse chegar até aqui. Obrigada por acreditarem na minha capacidade, por incentivarem meus estudos e renunciarem à minha presença em momentos importantes. Por todo o amor e amparo incondicionais, obrigada.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram dessa jornada,

Muito obrigada!

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Glândula Tiroide do Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade de São Paulo e no *Postovit Lab* do Departamento de Oncologia, Faculdade de Medicina e Odontologia da Universidade de Alberta, Edmonton, Canadá, com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do programa *Alberta Innovates Translational Health Chair in Cancer Research* (Dr. Lynne M. Postovit).

Processos FAPESP: 2016/17129-4, 2017/04639-7 e 2018/15868-0;

Processos CNPq: 133873/2017-0, 430756/2018/6.

"Nem tudo que se enfrenta pode ser mudado, mas nada pode ser mudado até que
seja enfrentado."

James Baldwin

RESUMO

DANTONIO, PM. **O papel de NODAL, membro da superfamília TGF- β , no câncer de tireoide.** 2019. 79 p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O câncer de tireoide é uma neoplasia endócrina cuja incidência tem aumentado ao longo dos últimos anos. Mais de 80% dos casos consiste em carcinomas papilíferos (PTC), que são geralmente bem diferenciados e apresentam bom prognóstico. No entanto, uma fração dos pacientes é diagnosticada com doença agressiva e mau prognóstico. Estes casos são frequentemente resistentes à terapia convencional e apresentam baixo grau de diferenciação celular, sendo considerados pouco diferenciados ou anaplásicos (ATC). A perda de diferenciação se caracteriza pela ausência da expressão de marcadores de diferenciação tiroídiana como tiroglobulina (Tg), tiroperoxidase (TPO), simportador sódio/iodo (NIS), entre outros. A aquisição de características de células-tronco por células tumorais tem sido reportada em diversos cânceres, sendo a reativação de vias de sinalização embrionárias um dos possíveis mecanismos envolvidos nesse processo. A via de sinalização Nodal é crucial para a indução do mesoderma e formação do eixo ântero-posterior durante a embriogênese. Nodal é um ligante pertencente à superfamília TGF- β , a qual possui membros que apresentam expressão desregulada em tumores da tireoide, tais como TGF- β 1 e activinas A e B. A reativação da sinalização Nodal tem sido reportada no câncer e associada a fenótipos mais agressivos. Mostramos através de coloração por imunohistoquímica que NODAL está presente nas células foliculares de PTC, mas não de ATC. A superexpressão de *NODAL* em linhagem de PTC diminui a proliferação celular, mas não afeta a capacidade de formação de esferas nem a expressão de genes de pluripotência e diferenciação tiroídiana, enquanto o silenciamento parcial de *NODAL* aumenta a expressão de *SOX2* e *NIS*. Tanto a superexpressão quanto silenciamento de *NODAL* não influenciam a ativação da via Smad. Identificamos, ainda, microRNAs com expressão reduzida em amostras de PTC e potencialmente envolvidos na regulação da via Nodal, além de discutirmos os desafios de mensuração de Nodal a níveis proteico e de mRNA. Nossos resultados mostram que NODAL está expresso em carcinomas bem diferenciados da tireoide, mas não em ATC, ao contrário do que se observa em outros tipos de câncer. Além disso, a superexpressão de *NODAL* não promove fenótipo de célula-tronco em

linhagem de câncer diferenciado de tireoide. Em conjunto, nossos dados sugerem que a perda da expressão de NODAL pode estar associada a fenótipos menos diferenciados de câncer de tireoide, como evidenciado pelos resultados de imunohistoquímica. Dessa forma, experimentos adicionais como superexpressão de *NODAL* devem ser conduzidos em linhagens de ATC. Além disso, o uso de modelos mais avançados como animal ou cultura 3D pode ser empregado para estudar o envolvimento do microambiente tumoral, uma vez que o modelo de linhagens celulares apresenta limitações e não recapitula a heterogeneidade tumoral observada no câncer *in vivo*.

Palavras-chave: Câncer de tireoide. TGF- β . Nodal. Diferenciação celular.

ABSTRACT

DANTONIO, PM. **The role of NODAL, member of the TGF- β superfamily, in thyroid cancer.** 2019. 79 p. Dissertation (Master thesis in Systems Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Thyroid cancer is an endocrine neoplasia with increasing incidence over the last years. More than 80% of cases consist of papillary carcinomas (PTC), which are usually well differentiated and present good prognosis. However, a fraction of patients is diagnosed with aggressive disease and bad prognosis. These cases are frequently resistant to conventional therapy and present low-grade cell differentiation, being considered poorly differentiated or anaplastic (ATC). The loss of differentiation is characterized by the loss of expression of thyroid differentiation markers such as thyroglobulin (Tg), thyroperoxidase (TPO), sodium/iodine symporter (NIS), among others. The acquisition of stem cell features by cancer cells has been reported in several cancers, and reactivation of embryonic signaling pathways is one of the possible mechanisms involved in this process. The Nodal signaling pathway is crucial for mesoderm induction and anterior-posterior axis formation during embryogenesis. Nodal is a ligand belonging to TGF- β superfamily, which has members with deregulated expression in thyroid tumors, such as TGF- β 1 and activins A and B. Reactivation of Nodal signaling has been reported in cancer and associated with more aggressive phenotypes. We show through immunohistochemistry staining that NODAL is present in follicular cells of PTC, but not ATC. *NODAL* overexpression in PTC cell line decreases cell proliferation but does not affect sphere formation capacity or the expression of pluripotency and thyroid differentiation genes, while *NODAL* knock down increases expression of *SOX2* and *NIS*. Both *NODAL* overexpression and knock down do not influence the activation of Smad signaling. We also identified microRNAs with reduced expression in PTC samples and potentially involved in the regulation of Nodal pathway, besides discussing the challenges of measuring Nodal protein and mRNA expression. Our results show that, contrary to what is observed in other types of cancer, NODAL is expressed in well differentiated thyroid carcinomas rather than in ATC. Moreover, *NODAL* overexpression does not promote stem cell-like phenotype in differentiated thyroid cancer cell line. Together, our data suggest that *NODAL* loss might be associated with less differentiated phenotypes in thyroid cancer, as evidenced by our

immunohistochemistry results. Thus, further experiments such as *NODAL* overexpression should be conducted with ATC cell lines. Furthermore, the use of more advanced models such as animal and 3D culture could be employed to study the involvement of tumor microenvironment, once cell line model is limited and do not recapitulate the tumor heterogeneity found in cancer *in vivo*.

Keywords: Thyroid cancer. TGF- β . Nodal. Cell differentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A via de sinalização MAPK no câncer de tireoide..	23
Figura 2. Sinalização dos ligantes da superfamília TGF- β	27
Figura 3. A via de sinalização Nodal	29
Figura 4. Método stem-loop para quantificação da expressão de miRNAs por PCR quantitativo	41
Figura 5. Mapa do vetor de superexpressão de <i>NODAL</i> .	43
Figura 6. Expressão da proteína NODAL em amostras de tecido tireoidiano	47
Figura 7. Expressão gênica de componentes da via Nodal em linhagem celular.	48
Figura 8. Expressão de NODAL em linhagens de tireoide.	49
Figura 9. Enriquecimento de NODAL em esferas de linhagem de câncer de tireoide.	51
Figura 10. Validação da superexpressão de <i>NODAL</i> na linhagem TPC-1	52
Figura 11. Efeito da superexpressão de <i>NODAL</i> na formação de esferas	53
Figura 12. Efeitos da superexpressão de <i>NODAL</i> na expressão gênica	54
Figura 13. Efeito da superexpressão de <i>NODAL</i> na taxa de proliferação celular	55
Figura 14. Validação do knock-down de <i>NODAL</i> na linhagem TPC-1	56
Figura 15. Efeito do knock-down de <i>NODAL</i> na expressão gênica	56
Figura 16. Efeito da inibição farmacológica dos receptores ALK4/5/7 na proliferação celular	57
Figura 17. Ativação da via Smad em linhagens selvagens e com modulação de NODAL	58
Figura 18. Expressão de <i>miR-302d-3p</i> em linhagens de tireoide	58
Figura 19. Expressão de potenciais miRNAs reguladores da tradução de NODAL em amostras de PTC	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Os efeitos pró- e anti-tumorigênicos de NODAL em diferentes tipos de câncer ...	32
Tabela 2. Linhagens celulares utilizadas em ensaios <i>in vitro</i>	36
Tabela 3. Anticorpos usados nos experimentos de <i>western blot</i>	38
Tabela 4. Sondas TaqMan® utilizadas nos experimentos de PCR em tempo real.....	40
Tabela 5. Sequências shRNA utilizadas no silenciamento gênico de <i>NODAL</i>	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR – Região 3' não traduzida
a.u. – Unidades arbitrárias
kb – Quilobase
kDa – Quilodalton
mM – Milimolar
ng – Nanograma
nM – Nanomolar
µg – Micrograma
µL – Microlitro
µM – Micromolar
ActRII – Receptor de activina tipo II
Akt – Proteína quinase B
ALK – “*Activin receptor-like kinase*”
AMH – Hormônio anti-Mulleriano
ASE – “*Asymmetric enhancer*”
ATC – Carcinoma anaplásico de tireoide
BMP – Proteína morfogenética óssea
BRAF – “*V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*”
BRAF^{T1799A} – Mutação no gene *BRAF*
BRAF^{V600E} – Proteína BRAF mutante
cDNA – DNA complementar
CDK – Quinase dependente de ciclina
Ct – “*Cycle threshold*”
CTRL – Controle
DAB – Diaminobenzidina
ddH₂O – Água destilada e deionizada
ddPCR – “*Digital droplet PCR*”
DMEM – “*Dulbecco's modified Eagle's medium*”
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNase – Desoxirribonuclease
dNTP – Deoxinucleotídeo trifosfatado
DP – Desvio padrão
DTT – Ditioneitol
EGF – Fator de crescimento epidermal
EMT – Transição epitélio-mesênquima
EUA – Estados Unidos da América
FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FGF – Fator de crescimento fibroblástico
FOXH1 – “*Forkhead box protein H1*”
FTC – Carcinoma folicular da tireoide

GBM – Glioblastoma
GDF – Fator de crescimento e diferenciação
GSK3 β – “*Glycogen synthase kinase 3 beta*”
HCl – Ácido clorídrico
HRP – “*Horseradish peroxidase*”
ICB – Instituto de Ciências Biomédicas
IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IME – Instituto de Matemática e Estatística
LATS2 – “*Large tumor suppressor kinase 2*”
LSE – “*Left side-specific enhancer*”
MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno
miRNA – microRNA
MMLV – *Murine Moloney Leukemia Virus*
mRNA – RNA mensageiro
NDE – “*Node-specific enhancer*”
NEAA – Aminoácidos não essenciais
NF κ B – Fator nuclear kappa B
NIS – Simportador sódio-iodo
nt - Nucleotídeo
OCT4 – “*Octamer-Binding Protein 4*”
PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS – Tampão fosfato salino
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PDTc – Carcinoma pouco diferenciado da tireoide
pH – Potencial hidrogeniônico
PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase
PN – “*Part number*”
PAX8 – “*Paired Box 8*”
POU5F1 – “*POU Class 5 Homeobox 1*”
PTC – Carcinoma papilífero de tireoide
qPCR – PCR quantitativo em tempo real
RNA – Ácido ribonucleico
RNAi – RNA de interferência
RNase – Ribonuclease
RNU6B – Pequeno RNA nuclear 6B
RPKM – *Reads Per Kilobase Million*
RPMI – “*Roswell Park Memorial Institute*”
RPLP0 – “*Ribosomal protein lateral stalk subunit P0*”
RT – Transcrição reversa
SBE – “*Smad binding element*”
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SFB – Soro fetal bovino
shRNA – RNA “*short hairpin*”
SMAD – “*Mothers against decapentaplegic homolog*”

SOX2 – “*SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2*”
STR – Repetição curta em tandem
TBS – Tampão salino de tris
TCGA – Atlas do genoma do câncer
TDGF1 – “*Teratocarcinoma-derived growth factor 1*”
TG – Tiroglobulina
TGF- β – Fator de crescimento transformante beta
TP53 – Proteína tumoral p53
TPO – Tiroperoxidase
TSH – Hormônio estimulante da tireoide
TSHR – Receptor do hormônio estimulante da tireoide
UK – Reino Unido
USP – Universidade de São Paulo
YAP – “*Yes-associated protein*”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 O câncer de tireoide	22
1.2 A superfamília TGF-β	26
1.3 A via de sinalização Nodal	28
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivos específicos	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Análise de expressão proteica por imunohistoquímica	35
3.2 Cultura celular e tratamento	36
3.3 Análise de expressão proteica por <i>Western blotting</i>	37
3.3.1 <i>Extração de proteína total</i>	37
3.3.2 <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida e western blotting</i>	37
3.3.3 <i>Imunodeteção</i>	38
3.4 Análise da expressão de mRNA e miRNA por PCR quantitativo em tempo real	39
3.4.1 <i>Extração de RNA total</i>	39
3.4.2 <i>RT-PCR para análise de mRNA</i>	39
3.4.3 <i>RT-PCR para análise do miRNA miR-302d-3p</i>	40
3.5 Modulação da expressão de <i>NODAL</i> e sinalização em linhagem celular	42
3.5.1 <i>Superexpressão de NODAL</i>	42
3.5.2 <i>Silenciamento de NODAL</i>	42
3.5.3 <i>Inibição farmacológica</i>	43
3.6 Ensaios de formação de esfera	44
3.7 Ensaio de gene repórter Luciferase	44
3.8 Ensaios de proliferação celular	45
3.9 Análise <i>in silico</i>	45
3.10 Análise estatística	46
4 RESULTADOS	47
4.1 Expressão proteica de <i>NODAL</i> em tecido de tireoide humana	47
4.2 Expressão gênica de componentes da via <i>NODAL</i> em linhagem celular	48
4.3 Expressão proteica de <i>NODAL</i> em linhagem celular	49
4.4 Enriquecimento de população com características de célula-tronco	50

4.5 Efeitos da modulação de <i>NODAL</i> em linhagem celular	51
4.5.1 <i>Efeitos da superexpressão</i>	52
4.5.2 <i>Efeitos do knock-down</i>	53
4.5.3 <i>Efeitos da inibição farmacológica dos receptores ALK4/5/7</i>	53
4.5.4 <i>Efeitos na ativação da via Smad</i>	57
4.6 Expressão do <i>miR-302d-3p</i> em linhagem celular	57
4.7 Potenciais miRNAs envolvidos na regulação de <i>NODAL</i> em PTC	59
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS*	67

1 INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide vem apresentando aumento em sua incidência ao longo das últimas décadas (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019). A maioria dos casos consiste em carcinomas papilíferos e foliculares, que geralmente apresentam boa diferenciação celular e bom prognóstico. Entretanto, uma parcela dos pacientes apresenta carcinomas pouco diferenciados ou indiferenciados, caracterizados pela perda de marcadores de diferenciação e função tiroidianas e comportamento mais agressivo, resultando em pior prognóstico. Alterações genéticas que sustentam a ativação da via de sinalização MAPK como as observadas nos genes *BRAF*, *RAS* e *RET* estão fortemente relacionadas ao desenvolvimento de tumores malignos na tireoide (KIMURA; NIKIFOROVA; ZHU; KNAUF *et al.*, 2003; KONDO; EZZAT; ASA, 2006), e alterações adicionais como mutações em *TP53*, *TERT* e na via PI3K/Akt contribuem para progressão e malignidade da doença (FAGIN; WELLS, 2016; NIKIFOROVA; WALD; ROY; DURSO *et al.*, 2013).

A desdiferenciação observada em carcinomas mais agressivos pode estar associada com a aquisição de um fenótipo similar ao de células-tronco. Nesse contexto, a reativação de vias de sinalização embrionárias emerge como um potencial mecanismo através do qual células tumorais poderiam adquirir este fenótipo indiferenciado. A desregulação da via TGF- β tem sido estudada em câncer de tireoide (KIMURA; KOPP; ZBAEREN; ASMIS *et al.*, 1999; MATSUO; EBINA; KULCSAR; FRIGUGLIETTI *et al.*, 2003; MATSUO; FIORE; SIGUEMATU; EBINA *et al.*, 2010; MATSUO; LEONI; COLQUHOUN; KIMURA, 2006), e membros dessa superfamília desempenham papéis importantes durante o desenvolvimento embrionário, como é o caso de Nodal. A sinalização Nodal é inibida em tecidos adultos através de uma complexa rede regulatória, mas sua reativação tem sido revelada e associada a fenótipos mais malignos em melanoma, câncer de mama, próstata, entre outros (QUAIL; SIEGERS; JEWER; POSTOVIT, 2013).

1.1 O câncer de tireoide

O câncer de tireoide é a neoplasia endócrina mais frequente e sua incidência continua a aumentar nos últimos anos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019), com cerca de

10.000 novos casos estimados para 2019 no Brasil e 52.000 nos Estados Unidos, sendo o quinto câncer mais incidente em mulheres brasileiras (INCA, 2018) e o sexto em mulheres norte-americanas (ACS, 2019). Carcinomas originados de células foliculares tiroidianas são os mais frequentes, compreendendo os histotipos (i) papilífero (PTC) e (ii) folicular (FTC), considerados bem diferenciados; (iii) carcinoma pouco diferenciado (PDTC) e (iv) o carcinoma anaplásico (ATC) ou indiferenciado. O PTC é o tipo histo-patológico mais frequente de câncer da tireoide, representando aproximadamente 90% dos casos, enquanto FTC representa menos de 5% dos casos (HOWLADER N, 2019; XING, 2013). Em geral, os tipos bem diferenciados apresentam bom prognóstico e muitas vezes podem ser curados por ressecção cirúrgica seguida de ablação por radioiodo e tratamento supressivo de TSH (BYRD; YAWN; WILHOIT; SORA *et al.*, 2012; FAGIN; WELLS, 2016).

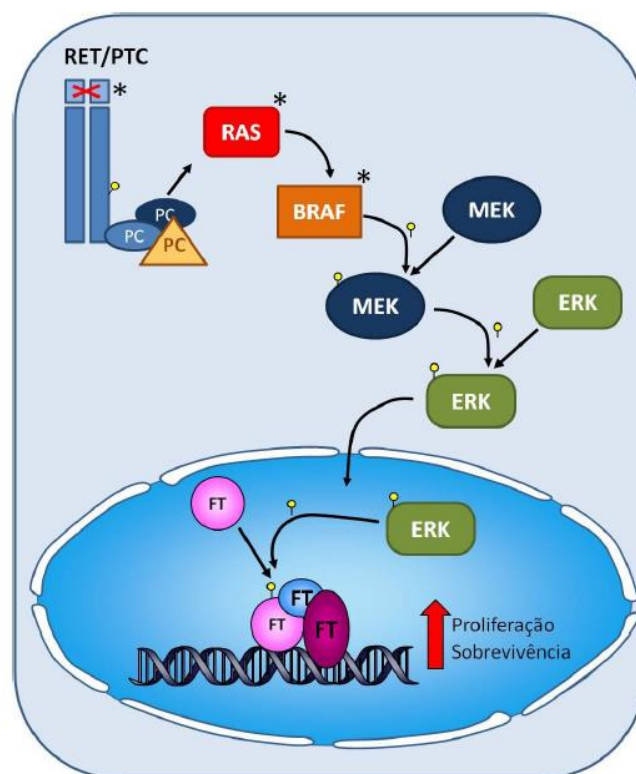


Figura 1. A via de sinalização MAPK no câncer de tireoide. Os rearranjos cromossômicos RET/PTC codificam uma proteína de fusão citoplasmática com capacidade de autofosforilação e ativação de outras proteínas citoplasmáticas (PC). Estas proteínas levam à ativação de RAS, que por sua vez promove a fosforilação da proteína BRAF e a consequente fosforilação da cadeia MEK/ERK. ERK é translocada ao núcleo para promover a fosforilação e ativação de diversos fatores de transcrição (FT), os quais dirigem a transcrição de genes alvo, induzindo a proliferação e sobrevivência celular. Figura cedida por Geraldo, M.V. (2011).

O genótipo de tumores tiroidianos é frequentemente associado com características clínicas e estado de diferenciação (NIKIFOROV; NIKIFOROVA, 2011), indicando que o comportamento do câncer da tireoide pode ser influenciado por seu perfil genético. A oncogênese do câncer de tireoide está intimamente relacionada à ativação de vias de sinalização que estimulam a proliferação, principalmente a via MAPK, causada por alterações genéticas mutuamente exclusivas nos genes *RAS*, *BRAF* ou *RET* (Figura 1) (GRIECO; SANTORO; BERLINGIERI; MELILLO *et al.*, 1990; KIMURA; NIKIFOROVA; ZHU; KNAUF *et al.*, 2003; NAMBA; GUTMAN; MATSUO; ALVAREZ *et al.*, 1990; SOARES; TROVISCO; ROCHA; LIMA *et al.*, 2003).

A mutação mais frequente em câncer de tireoide é a mutação pontual *BRAF^{T1799A}*, que consiste na troca de uma base timina por adenina na posição 1799 do gene *BRAF*, resultando na expressão da proteína mutante constitutivamente ativa *BRAF^{V600E}*, na qual o aminoácido 600 valina é substituído por ácido glutâmico (KIMURA; NIKIFOROVA; ZHU; KNAUF *et al.*, 2003; NAMBA; NAKASHIMA; HAYASHI; HAYASHIDA *et al.*, 2003; NIKIFOROV; NIKIFOROVA, 2011). Esta alteração ocorre em 60% dos casos de PTC (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, 2014), sendo detectada também em ATC. Mutações na família de genes *RAS* são a segunda alteração genética mais frequente em câncer de tireoide, majoritariamente em FTC e ATC, e estão relacionadas a tumores mais agressivos (HOWELL; HODAK; YIP, 2013).

Em PTC, o proto-oncogene *RET*, que codifica um receptor tirosina-quinase (ISHIZAKA; ITOH; TAHIRA; IKEDA *et al.*, 1989), sofre diferentes rearranjos cromossômicos denominados rearranjos *RET/PTC* (FUSCO; GRIECO; SANTORO; BERLINGIERI *et al.*, 1987) que resultam na ativação constitutiva do receptor e estão associadas ao processo de transformação tumoral. Mais de 15 rearranjos *RET/PTC* foram descritos em PTC (TALLINI; ASA, 2001), sendo *RET/PTC1* e *RET/PTC3* as formas mais comuns (NAKAZAWA; KONDO; KOBAYASHI; TAKAMURA *et al.*, 2005; SUGG; EZZAT; ROSEN; FREEMAN *et al.*, 1998). Estudos com rearranjos *RET/PTC* mostram uma incidência variável desses eventos em PTC, em diferentes populações (NIKIFOROV, 2011; ROMEI; ELISEI, 2012). Dados da literatura são inconclusivos sobre o papel de *RET/PTC* no fenótipo do câncer de tireoide, havendo estudos que demonstram tanto correlações positivas quanto negativas com características clínico-patológicas da doença. Em alguns estudos, a presença de *RET/PTC3* foi positivamente correlacionada a fenótipos mais agressivos, tumores maiores e estágios mais avançados (NIKIFOROV; ROWLAND; BOVE; MONFORTE-MUNOZ *et al.*, 1997; POWELL;

RUSSELL; NIBU; LI *et al.*, 1998), apesar de não influenciar a expressão de marcadores de diferenciação tireoidiana como faz a mutação BRAF^{V600E} (ROMEI; CIAMPI; FAVIANA; AGATE *et al.*, 2008). Esses dados indicam que essa alteração genética não deve contribuir para o processo de desdiferenciação. Altas concentrações de iodo desempenham um efeito protetor na presença do rearranjo RET/PTC3 (FIORE; FUZIWARA; KIMURA, 2009), e Knauf *et al.* (2003) demonstraram, ainda, que RET/PTC induz a desdiferenciação de células tireoidianas. O valor prognóstico da presença de rearranjos RET/PTC também tem sido debatido por diversos autores, com evidências que associam RET/PTC1 a um fenótipo mais favorável (SAAD; FALCIGLIA; STEWARD; NIKIFOROV, 2004), enquanto RET/PTC3 pode ser mais propenso a um comportamento agressivo (MOCHIZUKI; KONDO; NAKAZAWA; IWASHINA *et al.*, 2010).

As três alterações genéticas citadas (RET/PTC, BRAF^{T1799A} e RAS) resultam na ativação sustentada da via MAPK, promovendo maior capacidade proliferativa (MITSUTAKE; KNAUF; MITSUTAKE; MESA *et al.*, 2005). Além disso, a aquisição de mutações adicionais como nas vias p53 e PI3K contribuem para a progressão para carcinomas tireoidianos pouco diferenciados e anaplásicos (NIKIFOROVA; WALD; ROY; DURSO *et al.*, 2013; RICARTE-FILHO; RYDER; CHITALE; RIVERA *et al.*, 2009).

Apesar de ser a forma mais rara da doença (menos de 1% dos casos) (HOWLADER N, 2019; XING, 2013), o ATC é altamente agressivo e letal com sobrevida média de apenas seis meses, apresentando resistência à terapia convencional, rápido crescimento tumoral e metástases nos pulmões, ossos e cérebro (CABANILLAS; MCFADDEN; DURANTE, 2016; O'NEILL; SHAHA, 2013). Os carcinomas anaplásicos da tireoide podem surgir *de novo* ou progredir de carcinomas diferenciados através de eventos de desdiferenciação, como perda de expressão do receptor de TSH (TSHR), tiroglobulina (TG) e simportador sódio-iodo (NIS) (DAVIES; LATIF; MINSKY; MA, 2011). A perda de marcadores tireoidianos em ATC impõe um grande desafio para terapia, que é geralmente malsucedida (HADDAD; LYDIATT; BALL; BUSAIDY *et al.*, 2015).

1.2 A superfamília TGF- β

A superfamília TGF- β é bem conservada entre vertebrados e possui pelo menos 30 membros em humanos, que podem ser divididos nas subfamílias de ligantes TGF- β s, activinas, NODAL, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fatores de crescimento e diferenciação (GDFs), e hormônio anti-Mulleriano (AMH) (WAKEFIELD; HILL, 2013). A família de genes TGF- β exerce um grande e complexo papel no início do desenvolvimento embrionário, na biologia de células-tronco e no câncer, atuando em vários processos celulares como homeostase, diferenciação celular, adesão, proliferação e migração em diversos tipos celulares e contextos (HUANG; HUANG, 2005; MASSAGUE; BLAIN; LO, 2000; WATABE; MIYAZONO, 2009; WEISS; ATTISANO, 2013; WU; HILL, 2009).

Todas as proteínas da superfamília TGF- β são sintetizadas como precursores, que devem ser clivados por convertases para gerar os ligantes maduros (HARRISON; AL-MUSAWI; WALTON, 2011). Estes, por sua vez, formam dímeros através de pontes dissulfeto e requerem dois tipos de receptores serina/treonina quinase para transmitir seu sinal: os receptores do tipo I e tipo II (HELDIN; MIYAZONO; TEN DIJKE, 1997; HELDIN; MOUSTAKAS, 2016). Após interação com os ligantes, o receptor tipo II fosforila e ativa o receptor tipo I, expondo sítios de ligação para substratos intracelulares à jusante na via de sinalização: as proteínas SMAD reguladas por receptores (R-SMADs). Tradicionalmente, BMPs e GDFs sinalizam através de SMAD1, 5 e 8, enquanto TGF- β s, activinas e NODAL sinalizam por SMAD2 e 3 (Figura 2). R-SMADs são fosforiladas pelo complexo de receptor ativado e se associam a outro membro da família SMAD, SMAD4 (SHI; MASSAGUE, 2003). Os complexos SMAD se acumulam no núcleo onde regulam positiva ou negativamente a transcrição gênica, com ou sem o auxílio de outros fatores de transcrição (ROSS; HILL, 2008). A sinalização de SMADs é regulada pelas proteínas SMAD inibitórias (I-SMADs) SMAD6 e 7, as quais controlam os sinais de TGF- β s através de feedback negativo (MASSAGUE, 1998; MOUSTAKAS; SOUCHELNYTSKYI; HELDIN, 2001; NAKAO; AFRAKHTE; MOREN; NAKAYAMA *et al.*, 1997). Os mecanismos de antagonismo das I-SMADs são variados, podendo: (i) ligar-se a R-SMADs e SMAD4 e prevenir sua ligação entre si; (ii) direcionar a degradação dos receptores (EBISAWA; FUKUCHI; MURAKAMI; CHIBA *et al.*, 2001; KAVSAK; RASMUSSEN; CAUSING; BONNI *et al.*, 2000); (iii) induzir a desfosforilação dos receptores (SHI; SUN;

HE; XIONG *et al.*, 2004); e (iv) impedir a ativação de promotores por complexos SMAD (ZHANG; FEI; ZHANG; ZHANG *et al.*, 2007).

As vias TGF- β podem, ainda, ser moduladas em diferentes níveis por outras vias de sinalização. R-SMADS podem, por exemplo, ser fosforiladas por MAPKs, GSK3 β e CDKs, afetando sua estabilidade e acúmulo no núcleo (MASSAGUE, 2012). Adicionalmente, quando ativados, receptores da via TGF- β podem estimular outras vias de sinalização de maneira independente de SMADs, como as vias MAPK, NF κ B e PI3K/Akt (MOUSTAKAS; HELDIN, 2005; ZHANG, 2017).

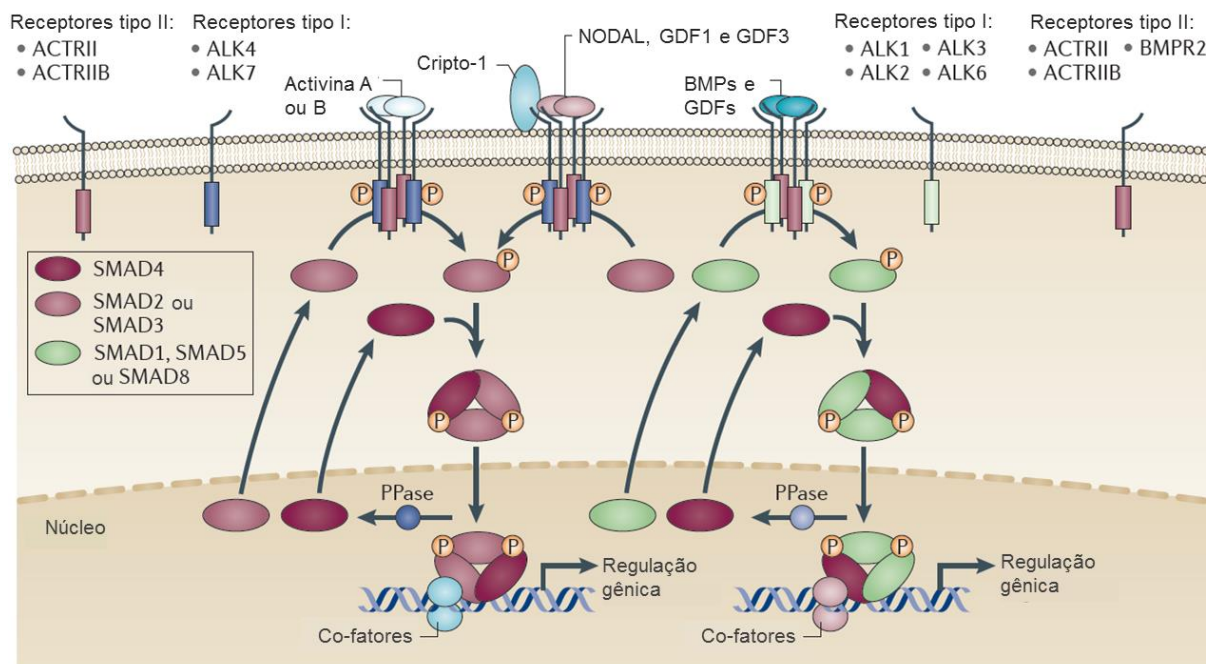


Figura 2. Sinalização dos ligantes da superfamília TGF- β . O esquema mostra a via de sinalização canônica via SMADs para proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), activinas, NODAL, e fatores de crescimento e diferenciação (GDFs). A sinalização através de ligantes TGF- β não é demonstrada. Cada ligante ativa uma combinação diferente de receptores tipo I e II, como indicado na figura. Sete receptores tipo I (ALK1-7) e cinco tipo II foram descritos em humanos. NODAL, GDF1 e GDF3 requerem a participação do co-receptor Cripto-1. Os receptores tipo I ditam quais SMADs reguladas por receptor (R-SMADs) são fosforiladas (P) em resposta a cada ligante. ALK1, ALK2, ALK3 e ALK6 fosforilam SMAD1, SMAD5 e SMAD8, enquanto ALK4, ALK5 e ALK7 fosforilam SMAD2 e SMAD3. A fosforilação de R-SMADs promove a formação de complexos com SMAD4 e subsequente acumulação no núcleo. O complexo SMAD interage com outros fatores de transcrição, co-ativadores ou co-repressores para regular a transcrição de genes alvo. PPase, fosfatase. Adaptado de (WAKEFIELD; HILL, 2013).

1.3 A via de sinalização Nodal

Um dos membros da família TGF- β é o fator de crescimento e diferenciação NODAL, um morfógeno embrionário que possui papel crucial na indução do mesoderma e formação do eixo anterior-posterior durante a embriogênese, e na manutenção da pluripotência (MESNARD; GUZMAN-AYALA; CONSTAM, 2006; SCHIER, 2003). Já em tecidos adultos a expressão de NODAL está limitada a nichos específicos como a glândula mamária, células-tronco do fígado e células β pancreáticas (QUAIL; SIEGERS; JEWER; POSTOVIT, 2013).

Assim como todos os membros da família TGF- β , NODAL é secretado como uma pró-proteína, de aproximadamente 37 kDa, que é geralmente clivada extracelularmente pelas convertases Furin e Pace4 (BECK; LE GOOD; GUZMAN; BEN HAIM *et al.*, 2002). A proteína madura resultante (aproximadamente 13 kDa) forma homodímeros para interagir com os receptores serina-treonina quinase tipo I, ALK4 ou ALK7, e do tipo II, ActRIIB, facilitada pelo co-receptor Cripto-1 (Figura 3) (SHEN; SCHIER, 2000). Apesar da sinalização Nodal geralmente requerer a participação de Cripto-1, sinais independentes do co-receptor têm sido descritos em embriões de camundongo (YEO; WHITMAN, 2001).

A interação dos receptores com NODAL promove a ativação dos receptores do tipo II por fosforilação, que por sua vez fosforilam as proteínas SMAD2/3. Estas se associam a SMAD4 e formam um complexo que é translocado para o núcleo e lá se acumula (SCHIER, 2003). No núcleo, o complexo SMAD interage com fatores de transcrição como FoxH1 e regulam a transcrição de genes alvo. A transdução de sinais mediados por NODAL tem importante participação do processo de endocitose (BLANCHET; LE GOOD; OORSCHOT; BAFLAST *et al.*, 2008). Inicialmente, NODAL e seu co-receptor Cripto são captados por endossomos primários que contêm o complexo de receptores ALK e a proteína estrutural SARA, que acopla os receptores ALK a moléculas SMAD (YAKYMOVYCH; YAKYMOVYCH; HELDIN, 2018). Dessa forma, pode-se dizer que endossomos agem como plataformas de sinalização que auxiliam a fosforilação de SMAD2/3 por receptores ativados por NODAL. Dentre os genes alvo induzidos pela sinalização Nodal estão os genes de pluripotência *NANOG* (VALLIER; MENDJAN; BROWN; CHNG *et al.*, 2009), *POU5F1* (*OCT4*), *SOX2* (PAUKLIN; VALLIER, 2015), e o próprio *NODAL*, criando, portanto, uma alça de *feedback* positivo (SCHIER, 2009), além de induzir a expressão de seu inibidor *Lefty*.

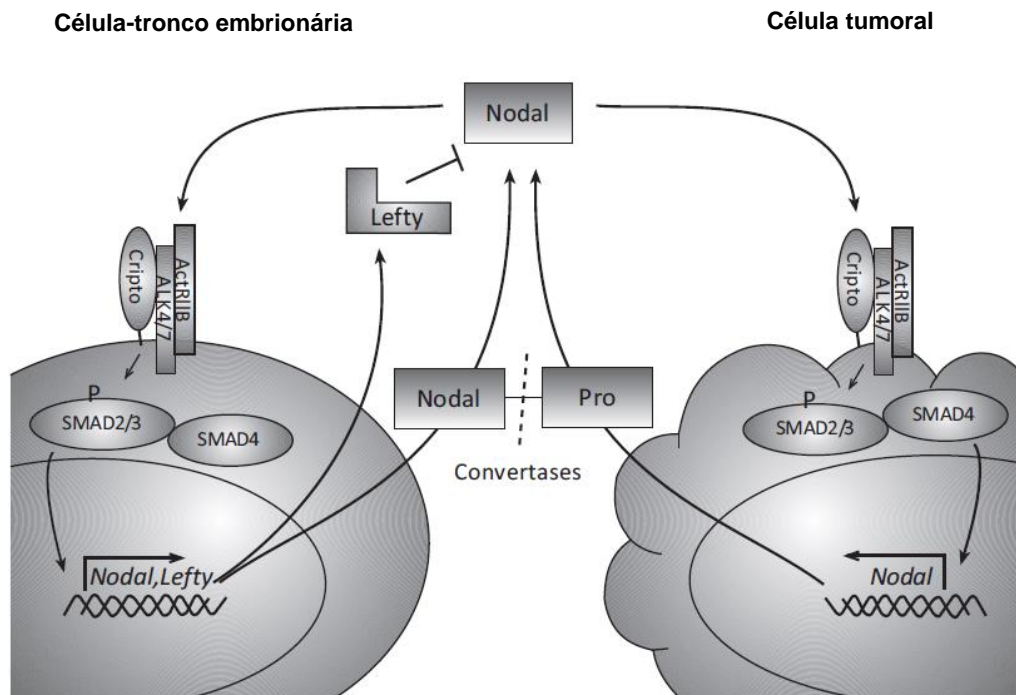


Figura 3. A via de sinalização Nodal. No meio extracelular, NODAL liga-se ao complexo de receptores do tipo I (ALK4/7) e tipo II (ActRIIB), levando à fosforilação e ativação de ALK4/7 por ActRIIB. O sinal desencadeado por NODAL é potencializado pelo co-receptor Cripto. Intracelularmente, ALK4/7 fosforila SMAD2/3, que, por sua vez, forma um complexo com SMAD4. O complexo de SMADs transloca para o núcleo, onde se associa com fatores de transcrição, como FOXH1, para propagar o sinal de NODAL. Alvos transcricionais dessa via incluem o próprio *NODAL* e o regulador negativo *LEFTY*, que inibe a ação de NODAL e Cripto. A proteína NODAL é sintetizada como pró-proteína, e clivada por convertases como Furin e Pace4 para gerar a proteína madura. Traduzido de Quail, Taylor & Postovit (2012).

Além de sinalizar através das proteínas SMADs, NODAL é capaz de ativar cascatas de sinalização independentes de SMAD, ainda que através de mecanismos não tão bem estudados. Uma exceção é a bem descrita ativação de p38 durante a especificação do endoderma visceral anterior (CLEMENTS; PERNAUTE; VELLA; RODRIGUEZ, 2011). Davies *et al.* (2005) descreveram a necessidade mútua das sinalizações SMAD e ERK para o processo de transição epitélio-mesênquima (EMT) induzido por TGF- β 1 em queratinócitos malignos, e o receptor de TGF- β 1 é capaz de ativar a via MAPK (LEE; PARDOUX; HALL; LEE *et al.*, 2007). Quail *et al.* (2014) demonstraram, ainda, que NODAL promove invasão e EMT através da ativação da via ERK1/2 em câncer de mama, e que esses efeitos são anulados mediante inibição da via com U0126, um inibidor de MEK1/2.

NODAL desempenha papéis paradoxicos em células-tronco pluripotentes, mantendo a pluripotência (VALLIER; ALEXANDER; PEDERSEN, 2005) enquanto

promove a indução do mesendoderma (ITOH; WATABE; MIYAZONO, 2014). Tendo em vista os vários e complexos papéis de NODAL, devemos considerar que a quantidade, duração e contexto do sinal são determinantes de como NODAL afeta a determinação celular, exigindo um conjunto intrincado de mecanismos regulatórios.

Em camundongo, a transcrição do gene *NODAL* é regulada em três regiões: nos *enhancers* (i) *left side-specific* (LSE), (ii) assimétrico (ASE), e (iii) *node-specific* (NDE) (NORRIS; ROBERTSON, 1999; SAIJOH; OKI; TANAKA; NAKAMURA *et al.*, 2005). O LSE e ASE estão envolvidos na autorregulação de *NODAL* através do fator de transcrição FOXH1, enquanto o NDE é responsivo à NOTCH (KREBS; IWAI; NONAKA; WELSH *et al.*, 2003; RAYA; KAWAKAMI; RODRIGUEZ-ESTEBAN; BUSCHER *et al.*, 2003). De fato, NOTCH4 regula a expressão de *NODAL* em células de melanoma humano (HARDY; KIRSCHMANN; SEFTOR; MARGARYAN *et al.*, 2010), sugerindo mecanismos similares de regulação transcricional entre humanos e camundongos. A transcrição de *NODAL* também pode ser regulada por mecanismos epigenéticos como metilação. O gene *NODAL* contém uma ilha CpG próxima ao sítio de iniciação da transcrição, e a metilação dessa região tem sido correlacionada com expressão gênica em células de melanoma (POSTOVIT; SEFTOR; SEFTOR; HENDRIX, 2007). Além disso, microRNAs (miRNAs) têm sido implicados na regulação pós-transcricional de *NODAL* durante o desenvolvimento de *zebrafish* (CHOI; GIRALDEZ; SCHIER, 2007), e Luo *et al.* (2012) demonstraram em modelos de trofoblasto que o miR-378a-5p tem como alvo a região 3' não traduzida (3'UTR) de *NODAL*, inibindo sua tradução.

Outros mecanismos de regulação da expressão de *NODAL* incluem controle da tradução, tráfico, processamento e modificações pós-traducionais da proteína. Uma modificação pós-traducional característica de membros da superfamília TGF- β é a N-glicosilação (SCHWARZ; AEBI, 2011), que geralmente auxilia na estabilidade da proteína (MITRA; SINHA; RAMYA; SUROLIA, 2006). O pró-domínio de *NODAL*, posteriormente clivado para geração da proteína madura, é indicado como sítio preferencial dessas modificações, enquanto o ligante *NODAL* maduro não possui sítios de N-glicosilação. É sugerido que, após clivagem do pró-domínio N-glicosilado, *NODAL* maduro é rapidamente degradado (LE GOOD; JOUBIN; GIRALDEZ; BEN-HAIM *et al.*, 2005).

A sinalização Nodal é também regulada por Lefty, que age como inibidor endógeno ao se ligar diretamente à *NODAL* ou ao co-receptor Cripto e impedir a

formação do complexo ligante-receptor (CHEN; SHEN, 2004). A expressão de Lefty também pode ser regulada pela via de sinalização embrionária Wnt e Oct4 (TABIBZADEH; HEMMATI-BRIVANLOU, 2006). Além de Lefty, células-tronco embrionárias também secretam Cerberus, outra molécula solúvel extracelular que antagoniza a sinalização Nodal durante o desenvolvimento embrionário (PICCOLO; AGIUS; LEYNS; BHATTACHARYYA *et al.*, 1999), e ambos são responsáveis por inibir a expressão de NODAL em tecidos adultos saudáveis, em adição a mecanismos de silenciamento epigenético (DAHLE; KUMAR; KUEHN, 2010).

A expressão simultânea de agonistas e antagonistas da sinalização Nodal sugere que os sinais dessa via são finamente regulados durante o desenvolvimento embrionário. De fato, a regulação espaço-temporal da sinalização Nodal requer uma regulação precisa, uma vez que as células são sensíveis tanto à dose quanto duração dos sinais dessa via (ROBERTSON, 2014).

A reativação da expressão de NODAL tem sido reportada em vários tipos de câncer, como melanoma (TOPCZEWSKA; POSTOVIT; MARGARYAN; SAM *et al.*, 2006), câncer de mama (QUAIL; WALSH; ZHANG; FINDLAY *et al.*, 2012; QUAIL; ZHANG; WALSH; SIEGERS *et al.*, 2012), próstata (LAWRENCE; MARGARYAN; LOESSNER; COLLINS *et al.*, 2011; VO; KHAN, 2011) e gliomas (HUENG; LIN; HUANG; LIU *et al.*, 2011), e associada à diversas características tumorais como agressividade, plasticidade, proliferação, migração e invasão, EMT, angiogênese e características de células-tronco (Tabela 1) (QUAIL; SIEGERS; JEWER; POSTOVIT, 2013; QUAIL; ZHANG; FINDLAY; HESS *et al.*, 2014). Além disso, alguns estudos revelaram uma correlação negativa entre expressão de NODAL e grau de diferenciação (NING; WANG; GUO; LIU *et al.*, 2015). Em contrapartida, alguns trabalhos demonstram diminuição da proliferação e aumento de apoptose decorrentes dessa sinalização (XU; ZHONG; MUNIR; YANG *et al.*, 2004; ZHONG; XU; YE; LEE *et al.*, 2009).

Os mecanismos responsáveis pelo controle da expressão de NODAL no câncer ainda não estão bem elucidados, mas a expressão baixa ou inexistente do inibidor Lefty tem sido reportada em diversos tumores malignos, tanto em amostras de pacientes quanto em linhagens celulares (HENDRIX; SEFTOR; SEFTOR; KASEMEIER-KULESA *et al.*, 2007; PAPAGEORGIOU; NICHOLLS; WANG; LACKMANN *et al.*, 2009; POSTOVIT; MARGARYAN; SEFTOR; KIRSCHMANN *et al.*, 2008). Além disso, a expressão de NODAL também pode ser modulada por condições microambientais como pH e hipóxia, como demonstrado em câncer de mama e melanoma (QUAIL;

TAYLOR; POSTOVIT, 2012; QUAIL; TAYLOR; WALSH; DIETERS-CASTATOR *et al.*, 2011). Outro componente que regula expressão gênica são os miRNAs, que em diferentes tipos de câncer encontram-se altamente desregulados (RUPAIMOOLE; SLACK, 2017).

Tabela 1. Os efeitos pró- e anti-tumorigênicos de NODAL em diferentes tipos de câncer.

Efeitos pró-tumorigênicos	Tipos de câncer	Referências
Invasão e migração	Melanoma, próstata, pâncreas	Lee et al. (2010), Postovit et al. (2007), Topczewska et al. (2006), Lawrence et al. (2011), Lonardo et al. (2011), Vo et al. (2011)
Angiogênese	Melanoma, mama, GBM	Hardy et al. (2010), Quail et al. (2012), Hueng et al. (2011)
Proliferação e apoptose	GBM, endométrio, mama, hepatocelular, próstata	De Silva et al. (2012), Papageorgiou et al. (2009), Cavallari et al. (2013), Quail et al. (2012), Vo et al. (2011)
Características de célula-tronco	GBM, próstata, pâncreas, mama	De Silva et al. (2012), Lawrence et al. (2011), Lonardo et al. (2011)
EMT	Mama	Quail et al. (2014)
Efeitos anti-tumorigênicos		
Proliferação e apoptose	Ovário, mama	Xu et al. (2004), Zhong et al. (2009)
	GBM, glioblastoma.	

Os miRNAs são pequenos (aproximadamente 22 nucleotídeos) RNAs endógenos não-codificantes que agem como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica, inibindo a tradução de mRNAs alvos através do pareamento imperfeito com a 3'UTR (GREGORY; CHENDRIMADA; COOCH; SHIEKHATTAR, 2005). Por ser composto de poucas bases, um único miRNA é capaz de regular diversos mRNAs distintos, da mesma forma que diferentes miRNAs podem regular um único mRNA alvo (BRENNECKE; HIPFNER; STARK; RUSSELL *et al.*, 2003). Dessa maneira, miRNAs emergem como importantes moduladores de sinalização celular devido à sua ação pleiotrópica em mRNAs que compõem as mais diversas vias de

sinalização, podendo controlar processos biológicos como diferenciação celular, proliferação e apoptose e, assim, sua desregulação pode influenciar no processo tumorigênico.

O miRNA miR-302 modula negativamente o inibidor de NODAL, Lefty, em células-tronco embrionárias humanas (BARROSO-DELJESUS; LUCENA-AGUILAR; SANCHEZ; LIGERO *et al.*, 2011). Este miRNA pertence ao *cluster* miR-302-367, que abrange miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d e miR-367. Os membros do *cluster* têm sido extensamente estudados e relacionados à indução de pluripotência, e empregados na reprogramação de células tumorais a um estado semelhante à células-tronco embrionárias pluripotentes (LIN; CHANG; CHANG-LIN; LIN *et al.*, 2008). Em modelos de câncer *in vivo* e *in vitro*, o *cluster* miR-302-367 foi associado a proliferação celular, migração, invasão, pluripotência e angiogênese. A expressão diminuída do *cluster* miR-302-367 em câncer de cólon e melanoma revela um papel supressor tumoral, que foi reestabelecido pela superexpressão de miR-302abcd em linhagens celulares. Nesses modelos, a superexpressão do cluster reduziu a expressão de marcadores de angiogênese, invasão e metástase (MAADI; MOSHTAGHIAN; TAHA; MOWLA *et al.*, 2016). Outros trabalhos seminais em glioma reforçam o papel supressor tumoral do *cluster* miR-302-367 (FAREH; TURCHI; VIROLLE; DEBRUYNE *et al.*, 2012; YANG; CHIBA; BRILL; DELIS *et al.*, 2015). Em contrapartida, Guo *et al.* (2017) demonstraram que a expressão de miR-302-367 encontra-se aumentada em câncer de próstata, induzindo proliferação, migração, formação de esferas e acelerando o crescimento tumoral em modelo animal. Estes efeitos são mediados pela interferência na via de sinalização Hippo, através da inibição de LATS2 e consequente aumento da atividade pró-tumoral de YAP. Em relação à *NODAL*, existem vários potenciais sítios de ligação para diferentes miRNAs na região 3'UTR do gene. Ainda que pobremente conservados entre vertebrados, a grande maioria é conservada em primatas.

Apesar de a maior parte dos estudos associarem um papel pró-tumorigênico a *NODAL*, alguns trabalhos descrevem efeitos protetores decorrentes dessa sinalização, de modo que as particularidades do papel de *NODAL* devem ser estudadas em cada tipo específico de câncer. Além disso, a participação de miRNA na regulação da expressão de *NODAL* em câncer humano ainda permanece pouco esclarecida.

2 OBJETIVOS

Avaliar o papel de NODAL, membro da família TGF- β , no câncer de tireoide utilizando modelos de linhagem celular e tecidos de tireoide humana.

2.1 Objetivos específicos

- 1) Avaliar a expressão de NODAL em tecidos humanos e linhagens celulares de câncer de tireoide;
- 2) Investigar o envolvimento de NODAL e os efeitos de sua modulação em marcadores de diferenciação tireoidiana e pluripotência;
- 3) Estudar o papel de NODAL na ativação da via Smad e proliferação celular;
- 4) Avaliar a expressão de miRNAs potencialmente reguladores da via de sinalização Nodal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Análise de expressão proteica por imunohistoquímica

Para detecção da expressão de NODAL em tecido tumoral e não tumoral de tireoide, tecidos emblocados em parafina proveniente de pacientes tireoidectomizados portadores de PTC e ATC (Biorrepositório do Laboratório de Biologia Molecular da Glândula Tireoide do ICB/USP, São Paulo, Brazil, e do laboratório do Dr. Todd McMullen da Universidade de Alberta, Edmonton, Canadá) foram utilizados para coloração por imunohistoquímica. As lâminas contendo cortes histológicos do tecido parafinizado foram aquecidas a 60°C por 2 h e desparafinizados e hidratados em banhos sequenciais de xilol e álcool. A reação de imunohistoquímica foi realizada utilizando o sistema *EnVision®+ Dual Link System-HRP (DAB+)* (PN K4065, Dako, Carpinteria, CA, EUA), o qual se baseia em um polímero marcado com HRP conjugado ao anticorpo secundário. Este polímero não contém avidina ou biotina, eliminando, dessa maneira, qualquer coloração inespecífica resultante da atividade endógena dessas moléculas.

Seguindo instruções do fabricante, foi realizada recuperação antigênica com solução de recuperação antigênica pH 9.0 (PN S236784-2) por 20 min a 100°C e, após resfriamento, a atividade da peroxidase endógena foi inibida com solução de bloqueio da peroxidase (PN S200380-2) por 5 min. Para evitar coloração inespecífica, as lâminas foram incubadas com solução de bloqueio livre de soro (PN X090930-2) por 15 min. O anticorpo primário policlonal anti-NODAL gerado em coelho (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi diluído em solução específica (PN S080981-2) na concentração 1:100 e incubado nas lâminas por 30 min a 25°C em câmara úmida. As lâminas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado a polímero marcado com a enzima peroxidase (PN K4065) por 1 h em temperatura ambiente em câmara úmida. Após lavagens, a coloração foi feita com a incubação da solução substrato-cromógeno DAB+ (PN K3467) por 2-8 min, que resulta em um precipitado acastanhado no local do antígeno de interesse. A contra-coloração nuclear foi realizada com Hematoxilina de Gill (Vector, Burlingame, CA, EUA). Os tecidos foram desidratados e montados com lamínulas utilizando meio de montagem VectaMount® (Vector). As lâminas foram digitalizadas no aparelho Aperio CS2 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) e as imagens

adquiridas foram visualizadas através do software Aperio eSlide Manager (Leica Biosystems).

3.2 Cultura celular e tratamento

Foram utilizadas duas linhagens derivadas de carcinoma papilífero (TPC-1 e K1), duas linhagens de carcinoma pouco diferenciado (BCPAP e KTC1), sete linhagens de carcinoma anaplásico (KTC2, C643, SW1736, Hth7, Hth74, Hth83 e 8305C) e a linhagem Nthy-ori 3-1, derivada de células foliculares humanas não tumorais imortalizadas com o vírus SV40 (Tabela 2). As linhagens TPC-1, BCPAP, KTC1, Hth7, C643 e SW1736 foram cultivadas em meio DMEM (Gibco, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% SFB (Gibco). Células K1, Hth74, Hth83, 8305C e Nthy-ori 3-1 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% SFB; e a linhagem KTC2 foi cultivada em meio RPMI suplementado com 5% de SFB. As linhagens Hth74, Hth7 e Nthy-ori 3-1 foram suplementadas com 2 mM L-glutamina (Gibco) e SW1736 com 1X aminoácidos não-essenciais (Gibco). Todas as células foram cultivadas em incubadora a 37°C e atmosfera de 5% CO₂ e foram recentemente autenticadas por *Short Tandem Repeat* (STR).

Tabela 2. Linhagens celulares utilizadas em ensaios *in vitro*.

Linhagem	Origem	Principal alteração genética	Meio de cultura
TPC-1	PTC	RET/PTC1	DMEM + 10% SFB
K1	PTC	BRAF (V600E) + PI3KCA (E545K)	RPMI 1640 + 10% SFB
BCPAP	PDTC	BRAF (V600E) + TP53 (D259Y)	DMEM + 10% SFB
KTC1	PDTC	BRAF (V600E)	DMEM + 10% SFB
KTC2	ATC	BRAF (V600E)	RPMI 1640 + 5 % SFB
8305C	ATC	BRAF (V600E)	RPMI 1640 + 10% SFB
C643	ATC	HRAS (G13R) + TP53 (R248Q)	RPMI 1640 + 10% SFB
Hth7	ATC	NRAS (Q61R)	DMEM 10% SFB + 2 mM glut
Hth74	ATC	NF1 (L732F)	RPMI 1640 + 10% SFB + 2 mM glut
Hth83	ATC	HRAS (Q61R)	RPMI 1640 + 10% SFB
SW1736	ATC	BRAF (V600E)	RPMI 1640 + 10% SFB + NEAA 1X
Nthy-ori 3-1		----- SV40	RPMI 1640 + 10% SFB + 2 mM glut

SFB, soro fetal bovino. Glut, L-glutamina. NEAA, aminoácidos não-essenciais.

3.3 Análise de expressão proteica por *Western blotting*

3.3.1 *Extração de proteína total*

Células aproximadamente 80% confluentes foram lavadas três vezes com PBS 1X e incubadas por 5 min em temperatura ambiente com reagente de extração proteica M-PER[®] (ThermoScientific, Waltham, MA, EUA) contendo 1-2% coquetel inibidor de proteases e fosfatases (Halt[™], ThermoScientific), raspadas e centrifugadas a 14000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C. Células foram opcionalmente sonicadas previamente à centrifugação para aumentar o rendimento. As proteínas totais foram quantificadas por espectrofotometria utilizando o kit comercial Micro BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific).

3.3.2 *Eletroforese em gel de poliacrilamida e western blotting*

Para realização de *western blot*, 30-40 µg de lisado proteico foram misturados com tampão de amostra Laemmli 4X (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) contendo 10% β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e aquecidas a 95°C por 7 min. As amostras de proteínas foram fracionadas por SDS-PAGE 10% em equipamento de eletroforese vertical Mini-Protean[®] (Bio-Rad) usando tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%; pH 8). O peso molecular *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad) foi fracionado em paralelo aos extratos proteicos para determinar o tamanho das proteínas de interesse. Em seguida, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Bio-Rad) em tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%; pH 8,3) a 90 volts e 4°C por 90 min. A membrana foi corada com solução Ponceau S (Sigma-Aldrich) para averiguar a qualidade da transferência e lavada com solução Tween 20 0,1% em salina tamponada com Tris (T-TBS) 1X.

3.3.3 Imunodeteção

Sítios de ligação não específicos foram bloqueados através da incubação com leite desnatado 5% diluído em T-TBS ou tampão de bloqueio Odyssey em PBS (PN 927-40000, LI-COR, Lincoln, NE, EUA) por 1 h em temperatura ambiente. A membrana foi incubada *overnight* em anticorpo primário (Tabela 3) diluído na mesma solução de bloqueio a 4°C, seguido de lavagens em T-TBS 1X e incubação com anticorpo secundário conjugado a enzima peroxidase ou a fluoróforo (Tabela 3) por 1 h em temperatura ambiente. Após lavar o excesso de anticorpo secundário conjugado a peroxidase, as membranas foram incubadas com a solução de revelação Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad) e imediatamente expostas a filmes de raio-X (Fujifilm, Tóquio, Japão), que foram revelados em sala escura. Membranas incubadas com anticorpo secundário conjugado a fluoróforo foram escaneadas no aparelho Odyssey® CLx (LI-COR), que detecta o nível de fluorescência emitido. Todas as membranas foram incubadas também com anticorpo anti-tubulina (sem *stripping*), que foi usada como controle.

A densitometria das bandas de interesse foi realizada com o software público ImageJ Analysis (disponível em <https://imagej.nih.gov/ij/>) e os valores foram normalizados pelos respectivos sinais da proteína controle tubulina.

Tabela 3. Anticorpos usados nos experimentos de *western blot*.

Anticorpo primário	Fabricante	Concentração
NODAL, camundongo monoclonal	R&D Systems	1:1000
Myc-Tag, camundongo monoclonal	Cell Signaling	1:1000
β-tubulina, coelho policlonal	LI-COR	1:2500
α-tubulina, camundongo monoclonal	LI-COR	1:2500

Anticorpo secundário	Fabricante	Concentração
Anti-camundongo IgG-HRP	Cell Signaling	1:5000
Anti-coelho IgG-HRP	Cell Signaling	1:5000
IRDye® 800CW anti-camundongo	LI-COR	1:15000
IRDye® 680RD anti-coelho	LI-COR	1:15000

R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA).

3.4 Análise da expressão de mRNA e miRNA por PCR quantitativo em tempo real

Todas as reações de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foram realizadas em triplicata biológica e duplicata técnica utilizando o aparelho ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As expressões relativas de mRNA e miRNA foram calculadas pelo programa Q-Gene, que calcula os níveis de expressão através de $2^{\Delta\Delta Ct}$ e eficiência dos *primers* (SIMON, 2003).

3.4.1 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído das linhagens celulares baseado na metodologia desenvolvida por Chomczynski e Sacchi (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987), utilizando-se o reagente TRIzol (Invitrogen). Brevemente, as células foram homogeneizadas com 1 mL de TRIzol e 200 μ L de clorofórmio foram adicionados. Após homogeneização, realizou-se centrifugação a 12000 g por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi coletada e o RNA precipitado através da adição de 500 μ L de isopropanol, homogeneização e centrifugação por 10 min. O sobrenadante foi removido e o *pellet* eluído em 30-50 μ L de H₂O livre de RNase. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria através do valor de absorbância A₂₆₀.

3.4.2 RT-PCR para análise de mRNA

Sintetizamos DNA complementar (cDNA) a partir de 5 μ g de RNA total por transcrição reversa utilizando a enzima MMLV (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. Brevemente, 10 μ L de RNA total foram combinados com 1 μ L de DTT (100 mM), 1 μ L de inibidor de RNase (20 U/ μ L), 1 μ L de mix de dNTP (10 mM) e 1 μ L de transcriptase reversa MMLV. A reação foi mantida a 21°C por 10 min, a 42°C por 30 min, seguida de inativação da transcriptase a 99°C por 10 min, em termociclador Cyclogene (Techne, Minneapolis, MN, EUA). Os produtos de PCR foram amplificados a partir do cDNA com o uso de sondas comerciais TaqMan ou *primers* desenhados no laboratório (Tabela 4), e TaqMan *Gene Expression Master*

Mix (Applied Biosystems). A expressão de mRNA foi normalizada pelo gene endógeno *RPLP0*.

Tabela 4. Sondas TaqMan® utilizadas nos experimentos de PCR em tempo real.

Gene	Nº de acesso	Sonda TaqMan®
<i>NODAL</i>	NM_018055	Hs00415443_m1
<i>LEFTY1</i>	NM_020997	Hs00764128_s1
<i>TDGF1</i>	NM_003212	Hs02339499_g1
<i>NANOG</i>	NM_024865	Hs04260366_g1
<i>POU5F1 (OCT4)</i>	NM_002701	Hs04260367_gH
<i>SOX2</i>	NM_003106	Hs01053049_s1
<i>NOTCH4</i>	NM_004557	Hs00965889_m1
<i>TG</i>	NM_003235	Hs00174974_m1
<i>TPO</i>	NM_000547	Hs00892519_m1
<i>NKX2-1</i>	NM_001079668	Hs00968940_m1
<i>NIS</i>	NM_000453	Hs00166567_m1
<i>PAX8</i>	NM_003466	Hs01015257_g1
<i>RPLP0</i>	NM_053275	Hs99999902_m1

3.4.3 RT-PCR para análise do miRNA *miR-302d-3p*

Para análise da expressão do miRNA *miR-302d-3p* por PCR em tempo real utilizamos o kit de quantificação de miRNAs *TaqMan® MiRNA Assays* específico para este miRNA (PN4427975; Assay ID 535; Applied Biosystems). Este sistema utiliza síntese dirigida de cDNA para *miR-302d-3p* pelo método de *stem-loop*, no qual o *primer* específico para o miRNA provoca a formação de um grampo sobre si mesmo, gerando maior estabilidade para a transcrição reversa (CHEN; RIDZON; BROOMER; ZHOU *et al.*, 2005) (Figura 4). Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit *TaqMan® microRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), com o qual 10 ng de RNA total foram utilizados em uma reação de volume final igual a 15 µL na presença de 1,5 µL de tampão 10X, 0,15 µL de mix de dNTP (100 mM), 0,19 µL de inibidor de RNases (20 U/ µL), 1 µL de transcriptase reversa *MultiScribe®* (50 U/µL), 3 µL de primer específico para *miR-302d-3p* e 4 µL de H₂O destilada e deionizada (ddH₂O). A pipetagem foi realizada no gelo e a reação ocorreu nas seguintes

condições em termociclador Cyclogene (Techne): 16°C por 30 min, 42°C por 30 min, 85°C por 5 min.

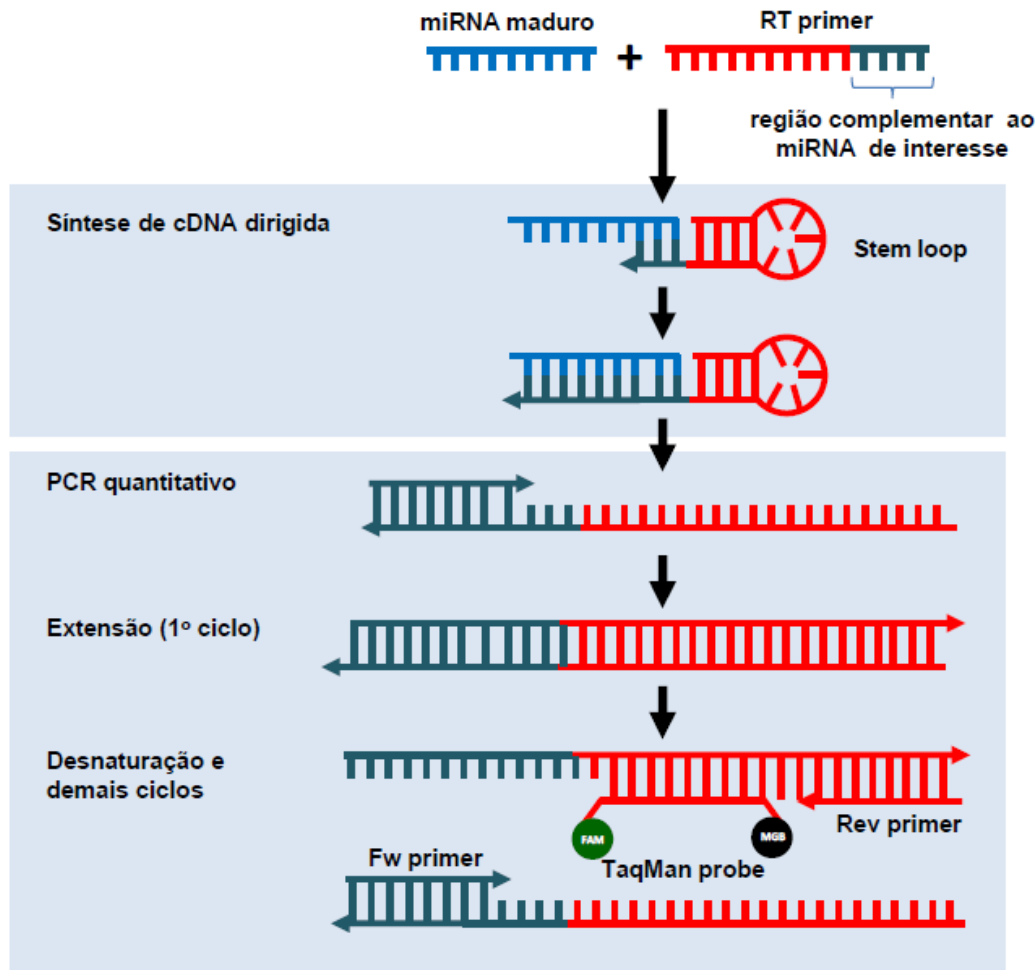


Figura 4. Método stem-loop para quantificação da expressão de miRNAs por PCR quantitativo.

O “RT *primer*” contém região complementar ao miRNA de interesse e, quando adicionado à reação de síntese de cDNA, forma uma estrutura secundária em forma de grampo, gerando um segmento dupla-fita que servirá de molde para a transcrição reversa dirigida para o miRNA de interesse. Na reação de PCR, a estrutura secundária é desnaturada e serve de *template* para o *primer* reverso (“*Rev primer*”) e a sonda Taqman (“*Taqman probe*”). O *primer forward* (“*Fw primer*”) é específico para o miRNA de interesse. FAM = fluoróforo repórter; MGB = quencher não fluorescente (CHEN; RIDZON; BROOMER; ZHOU *et al.*, 2005).

O cDNA de *miR-302d-3p* foi utilizado em qPCR juntamente com TaqMan *Universal Master Mix*, No AmpErase UNG (Applied Biosystems) e o reagente 20X contendo *primers* e sondas específicas marcadas com fluoróforo FAM para o *miR-302d-3p* (Assay ID 535). Na corrida foi incluído o pequeno RNA nucleolar *6B*

(*RNU6B*) (PN4427975, Assay ID 1093, Applied Biosystems), cuja expressão foi utilizada como referência para normalização.

3.5 Modulação da expressão de *NODAL* e sinalização em linhagem celular

3.5.1 Superexpressão de *NODAL*

Para a superexpressão de *NODAL* utilizamos um vetor plasmidial previamente construído no laboratório da Dra. Postovit contendo a sequência exônica do gene *NODAL* e uma *tag* MYC na região C-terminal clonados no vetor pCMV6-Entry (Cat. No. RC211302, Origene, Rockville, MD, EUA) (Figura 5). O plasmídeo pCMV6 contendo apenas o *tag* foi usado como controle negativo. A presença da *tag* MYC possibilita a validação da superexpressão através de imunodeteção com anticorpo específico Myc-Tag (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) (Tabela 3). A transfecção dos plasmídeos foi efetuada com o reagente Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen) e, após 48 h, as células foram selecionadas com G418 (geneticina, Gibco) 1250 µg/mL para estabelecimento das linhagens estáveis. A validação da superexpressão foi realizada por qPCR para mRNA de *NODAL* e *western blot* pela expressão de Myc-tag.

3.5.2 Silenciamento de *NODAL*

O silenciamento gênico parcial (*knock-down*) de *NODAL* foi realizado por RNA de interferência *short hairpin* (shRNA) (Dharmacon – Horizon Discovery, Lafayette, CO, EUA) (Tabela 5). O plasmídeo GIPZ contendo uma sequência não silenciadora foi utilizado como controle (RHS4346, Dharmacon). Foram gerados três clones com plasmídeos distintos codificadores de sequências complementares à região não traduzida 3' (3' UTR) do mRNA de *NODAL* (RHS4430-200235357, RHS4430-200305628, RHS4430-200241088), além do clone controle. As transfecções foram efetuadas com o reagente Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen) e, após 48 h, as células foram selecionadas com puromicina 1 µg/mL (Gibco). A validação do *knock-down* foi realizada por *western blot*.

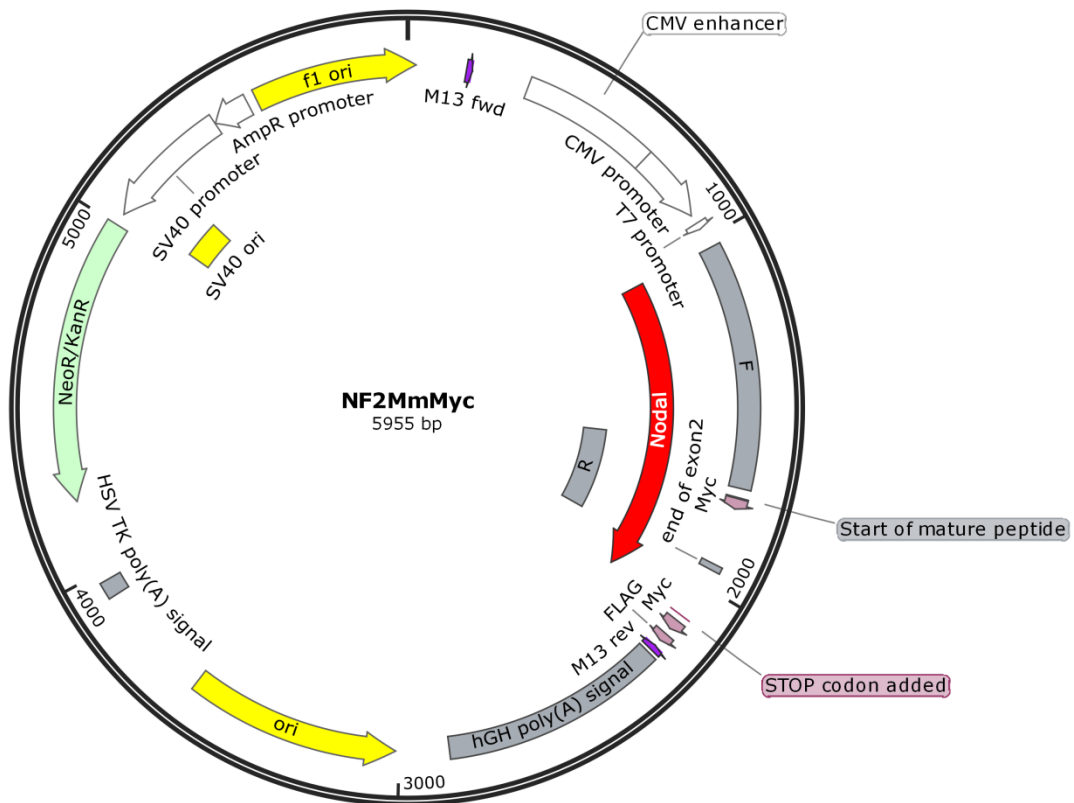


Figura 5. Mapa do vetor de superexpressão de *NODAL*. A sequência exônica do gene *NODAL* e uma tag MYC na região C-terminal foram clonados no vetor pCMV6-Entry. A presença da tag MYC possibilita a validação da superexpressão através de imunodeteção com anticorpo específico para Myc-Tag.

Tabela 5. Sequências shRNA utilizadas no silenciamento gênico de *NODAL*.

Vetor	Clone	Nº catálogo	Alvo	Sequência madura antissense
GIPZ Lentiviral	V3LHS_403216	RHS4430-200235357	NM_001329906 3'UTR	TAATCTATACAGTGATCCT
			NM_018055 3'UTR	
Human	V3LHS_403217	RHS4430-200305628	NM_018055 3'UTR	TCAGTAAAGAGAACATCCA
			NM_001329906 3'UTR	
NODAL shRNA	V3LHS_403219	RHS4430-200241088	NM_001329906 3'UTR	AAAGAACTCATGCACTTGT
			NM_018055 3'UTR	

3.5.3 Inibição farmacológica

O inibidor dos receptores ALK4, ALK5 e ALK7 SB431542 (Sigma-Aldrich) foi utilizado para inibir farmacologicamente a sinalização através destes receptores. Para tanto, células C643 foram cultivadas em meio de cultura completo e tratadas

com SB431542 na concentração de 20 μ M por 24, 48 e 72 horas. Como controle, as células foram tratadas com o mesmo volume de DMSO (veículo).

3.6 Ensaios de formação de esfera

Brevemente, células foram semeadas em placas de adesão ultrabaixa em meio DMEM/F12 GlutaMAX™ (Gibco) suplementado com B-27 1X, EGF 20 ng/mL e FGF 20 ng/mL (todos da Gibco) por 5-7 dias. Para aquisição de imagens e extração de proteína total, 5.000-40.000 células foram semeadas em placas de 6 poços e coletadas após 7 dias em triplicata biológica. Imagens foram adquiridas no microscópio Image Express Micro (Molecular Devices, San José, CA, EUA). Para contagem do número de esferas, 10 células foram semeadas em cada poço da placa de 96 poços e o número de esferas em cada poço foi contado após 7 dias em duplicata biológica.

3.7 Ensaio de gene repórter Luciferase

Para avaliar a ativação da via de sinalização Smad, utilizamos o plasmídeo SBE4-Luc (Addgene #16495; disponibilizado por Bert Vogelstein), que contém quatro cópias do sítio de ligação das proteínas SMAD na região promotora do gene da luciferase (ZAWEL; DAI; BUCKHAULTS; ZHOU *et al.*, 1998). As células foram cultivadas por 24 h em placas de 24 poços e co-transfectadas com 200 ng de SBE4-Luc e 20 ng do plasmídeo pRL-CMV (luciferase de *Renilla*) em meio Opti-MEM (Gibco). Vinte e quatro horas após a transfecção, células foram lavadas com PBS. A lise celular e a reação de luminescência foram realizadas utilizando o kit *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega, Madison, WI, EUA) conforme instruções do fabricante. A leitura do sinal de luminescência foi realizada no luminômetro GloMax® 20/20 (Promega). Os valores foram normalizados pelo nível de luminescência da luciferase de *Renilla* (unidades arbitrárias: a.u.).

3.8 Ensaio de proliferação celular

Para a realização da curva de crescimento, células foram semeadas em placas de 12 poços na densidade de 3×10^4 células/poço e contadas a cada 24 horas ao longo de quatro dias. Após lavagem com PBS 1X, as células aderidas foram incubadas com tripsina, misturadas e coletadas com meio de cultura completo e centrifugadas. Em seguida, o *pellet* de células foi ressuscitado em meio de cultura e misturadas com solução Azul de Trypan 0,4%. Células vivas foram manualmente contadas com o auxílio de um hemocitômetro.

Para ensaio de proliferação, células TPC-1 com superexpressão ou silenciamento de *NODAL* e seus respectivos controles foram semeadas em placas de 12 poços na densidade de 1×10^3 células/poço em duplicata e contadas a cada 24 horas por sete dias. A coleta e contagem de células foram realizadas como descrito anteriormente. Cada duplicata foi contada duas vezes.

Alternativamente, o número de células C643 após tratamento com SB431542 foi mensurado por citometria. Células foram coletadas em formaldeído 3,7% e mantidas a 4°C até contagem no citômetro de fluxo Guava EasyCyte Mini (Millipore, Burlington, MA, EUA).

3.9 Análise *in silico*

Para a identificação miRNAs que tenham sítio de ligação preditos na região 3'UTR de genes relacionados à via Nodal, foi utilizado o programa computacional online TargetScan (versão 7.2) (AGARWAL; BELL; NAM; BARTEL, 2015; LEWIS; BURGE; BARTEL, 2005). A expressão dos miRNAs de interesse foi analisada através de uma base de dados elaborada em nosso laboratório por Geraldo, MV com dados provenientes de amostras de PTC pareadas (tecido tumoral e não tumoral contralateral do mesmo paciente) do consórcio TCGA. As amostras foram classificadas de acordo com o perfil mutacional do gene BRAF no tumor: *BRAF^{T1799A}* ou selvagem (WT). A expressão total dos miRNAs em RPKM (*reads per kilobase million*) foi comparada de duas maneiras: expressão em amostras não tumorais VS. em amostras tumorais, independente do genótipo; e expressão em tumores WT VS. tumores *BRAF^{T1799A}*.

3.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do sistema estatístico R (disponível em <https://www.r-project.org/>) através de testes de comparação de médias. Comparações entre dois grupos foram feitas através de teste t. Comparações entre vários grupos foram realizadas através de ANOVA quando observadas as pressuposições de normalidade e homogeneidade dos dados pelos Testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente, e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado em casos de não verificação das pressuposições citadas. O teste de Tukey foi utilizado para correção de múltiplas comparações quando necessário. Os valores foram expressos em média \pm desvio padrão, e em todas as análises foi considerado um nível de 5% de significância.

4 RESULTADOS

4.1 Expressão proteica de NODAL em tecido de tireoide humana

A expressão de NODAL foi analisada em 20 casos de carcinoma papilífero, com ou sem infiltração nodular, e 11 de carcinoma anaplásico por imunohistoquímica. Nossos resultados mostram coloração específica de NODAL em um subconjunto de células foliculares de PTC (Figura 6), caracterizada por uma coloração citoplasmática granular que representa a localização da proteína em vesículas secretórias, e na membrana celular, que sugere secreção de NODAL. No entanto, nenhuma coloração foi detectada em amostras de carcinoma anaplásico, assim como no estroma de PTC.

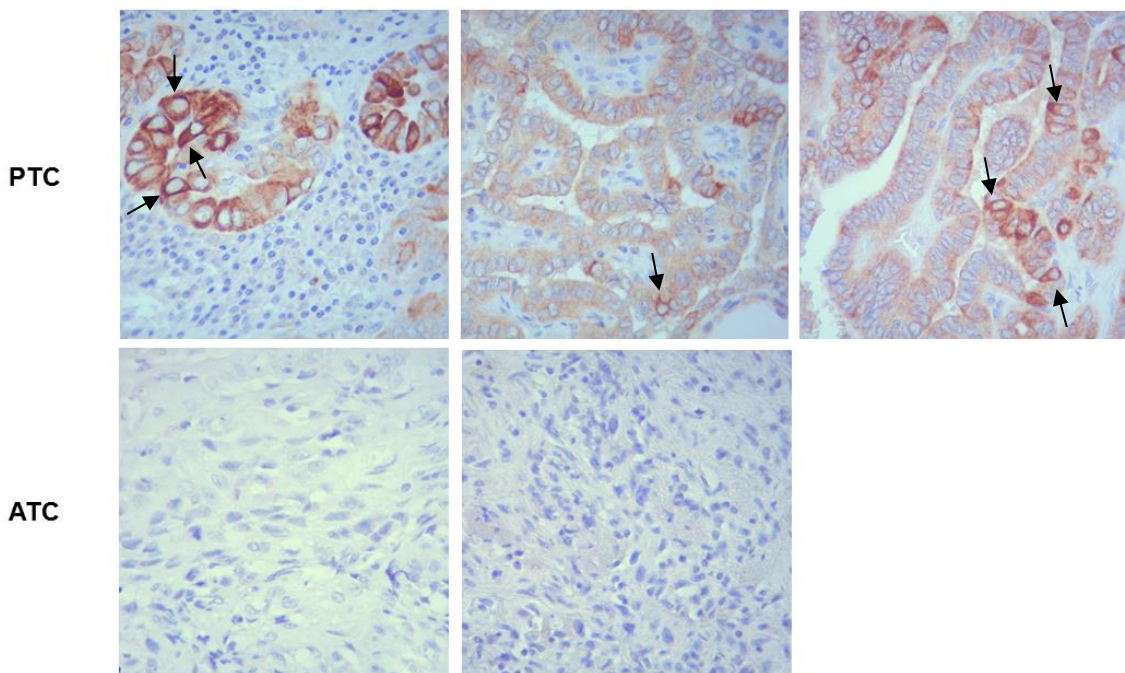


Figura 6. Expressão da proteína NODAL em amostras de tecido tireoidiano. Cortes histológicos de PTC e ATC emblocados em parafina foram desparafinizados e hidratados em xilol e álcool. Foram realizados reativação antigênica e bloqueio da peroxidase endógena e de sítios inespecíficos. Os tecidos foram incubados com anticorpo primário anti-NODAL por 30 min a 25°C e secundário conjugado à peroxidase por 1h. A coloração foi feita com incubação com DAB (marrom) e contra-coloração nuclear com Hematoxilina de Gill (roxo). Coloração específica para NODAL (setas) foi detectada em tecidos de carcinoma papilífero (PTC) (n=20), caracterizada por uma coloração granular citoplasmática e na membrana celular, mas não em carcinoma anaplásico (ATC) (n=11).

4.2 Expressão gênica de componentes da via *NODAL* em linhagem celular

A quantificação da expressão de *NODAL*, *LEFTY1*, *TDGF1*, *NANOG*, *POU5F1* e *SOX2* foi feita por PCR em tempo real nas linhagens TPC-1, BCPAP e 8305C a fim de caracterizar a expressão de componentes da via Nodal a nível de mRNA. Nossos resultados mostram que a detecção do mRNA *NODAL* é maior na linhagem de ATC 8305C (Figura 7), embora não estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis, p-valor = 0,05091). O inibidor *LEFTY1* é mais expresso na linhagem 8305C (ANOVA, p-valor = 0,00174), enquanto o gene *TDGF1*, codificador do co-receptor Cripto-1, é igualmente expresso nas três linhagens estudadas (ANOVA, p-valor = 0,893). Os genes de pluripotência *NANOG* e *POU5F1* estão menos expressos na linhagem de carcinoma pouco diferenciado BCPAP (ANOVA, p-valor = 0,01754 e 0,01602, respectivamente), enquanto *SOX2* mostra maior expressão nessa linhagem quando comparada a TPC-1 (ANOVA, p-valor = 0,00185) e 8305C (ANOVA, p-valor = 0,00034).

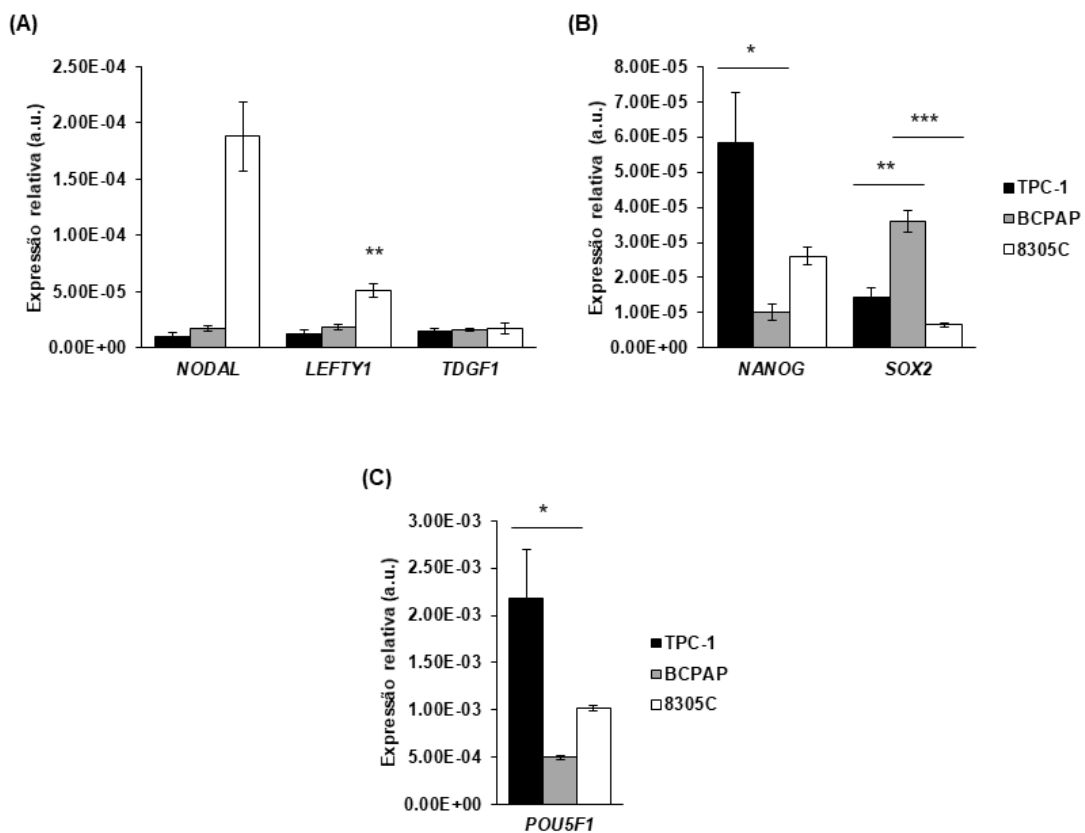


Figura 7. Expressão gênica de componentes da via Nodal em linhagem celular. O RNA total foi extraído de células aproximadamente 70% confluentes para síntese de cDNA, que foi utilizado para quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real. O gene *RPLP0* foi utilizado como normalizador para o cálculo de expressão relativa pelo Q-Gene. **(A)** Não

se observa diferença estatística na expressão dos genes *NODAL* e *TDGF1*, porém o inibidor *LEFTY1* encontra-se mais expresso na linhagem 8305C. **(B, C)** Os genes de pluripotência e alvos da via Nodal *NANOG* e *POU5F1* encontram-se menos expressos na linhagem BCPAP, ao contrário de *SOX2*, que apresenta expressão aumentada nessa linhagem. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=3). * p<0,05. ** p<0,01. *** p<0,001.

4.3 Expressão proteica de NODAL em linhagem celular

Utilizamos ensaios de *western blot* para comparar a expressão proteica de NODAL em diferentes linhagens de câncer de tireoide humano. Nossos resultados mostram diferentes bandas específicas para Nodal (Figura 8A-E), que são resultantes de modificações pós-traducionais da proteína, como glicosilação. A banda mais próxima de 37 kDa foi considerada em nossas análises por se tratar da forma não glicosilada da proteína. A análise estatística dos valores obtidos por densitometria óptica não mostrou diferença significativa na expressão de NODAL entre linhagens estudadas (teste de Kruskal-Wallis, p-valor = 0,4207). Além disso, observamos uma variabilidade significativa na expressão da proteína em linhagens celulares (Figura 8A-E), mais especificamente na linhagem 8305C (Figura 8F). Dessa forma, conduzimos os experimentos subsequentes com a linhagem TPC-1, que apresenta nível de expressão mais consistente.

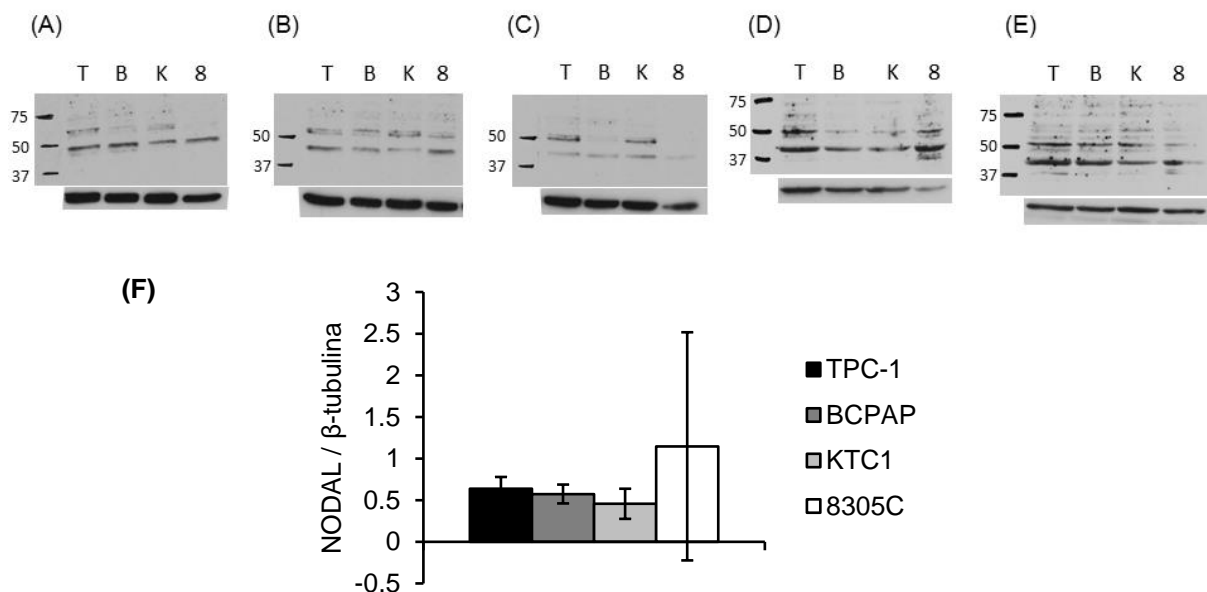


Figura 8. Expressão de NODAL em linhagens de tireoide. Ensaios de *western blot* com as linhagens TPC-1 (T), BCPAP (B), KTC1 (K) e 8305C (8) revelam significativa variabilidade

na expressão de NODAL em diferentes replicatas biológicas e experimentais (A-E), particularmente na linhagem 8305C. Para este ensaio, 30-40 µg de extrato proteico total foram fracionados por eletroforese em gel de poliácridamida e utilizados para ensaios de *western blotting*. A proteína β-tubulina foi utilizada como normalizador. (F) Densitometria óptica dos sinais de NODAL normalizados pelos sinais de β-tubulina. Valores analisados estatisticamente pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (p-valor = 0,4207). Valores mostrados como média. Barras representam desvio padrão.

4.4 Enriquecimento de população com características de célula-tronco

Visando superar as limitações anteriores, realizamos ensaios de formação de esfera a fim de enriquecer a população de células com características de células-tronco. Neste ensaio, células são cultivadas em placas de baixa aderência em meio suplementado com fatores de crescimento e formam esferas pela capacidade de auto-renovação. A linhagem TPC-1 mostrou uma surpreendente capacidade exclusiva de formar aglomerados de esferas enquanto as outras linhagens formaram apenas esferas isoladas a partir do mesmo número de células (Figura 9A). A linhagem de ATC 8305C formou esferas em maior tamanho e número, como esperado para uma linhagem derivada de câncer indiferenciado. BCPAP também apresentou capacidade de formar esferas, porém em menor número e tamanho, enquanto KTC1 mostrou baixa capacidade com esferas escarças e muito pequenas, não permitindo a extração de proteínas.

Analisamos a expressão proteica de NODAL nessas subpopulações por *western blot* e observamos que a população de esferas é enriquecida para NODAL quando comparado à população de células cultivadas em monocamada aderente nas três linhagens estudadas, principalmente TPC-1 (Figura 9B). Estes resultados corroboram a ideia de que a reexpressão de NODAL é limitada a uma subpopulação de células tumorais e é mais acentuada em carcinoma papilífero mais diferenciado em relação ao anaplásico (indiferenciado). Baseados nesses e outros resultados de *western blot*, decidimos superexpressar e silenciar o gene *NODAL* em linhagem de câncer de tireoide.

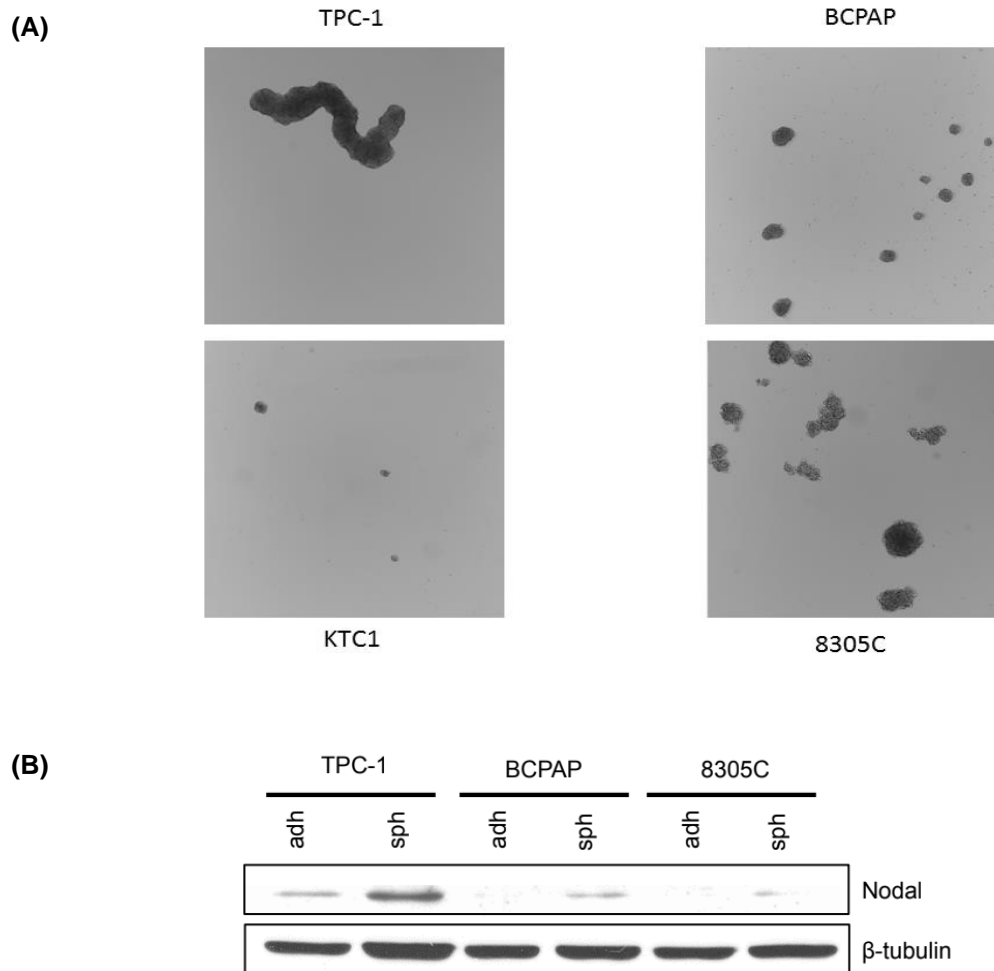


Figura 9. Enriquecimento de NODAL em esferas de linhagem de câncer de tireoide. As linhagens TPC-1, BCPAP, KTC1 e 8305C foram cultivadas em condições específicas para a formação de esferas não-aderentes. Quarenta mil células foram semeadas em placas de 6 poços e tiveram suas proteínas totais extraídas após 7 dias para análise de expressão de NODAL por *western blotting*. (A) Imagens adquiridas por microscopia evidenciam diferentes eficiências de formação de esferas entre as linhagens, sendo 8305C capaz de formar esferas isoladas maiores e mais abundantes, seguida de BCPAP. Células KTC1 formaram poucas e pequenas esferas, enquanto TPC-1 formou grandes agregados de esferas. (B) Ensaio de *western blot* mostram enriquecimento de NODAL em células cultivadas como esferas (sph) em comparação à monocamada aderente (adh). A proteína β -tubulina foi utilizada como normalizador.

4.5 Efeitos da modulação de *NODAL* em linhagem celular

A fim de investigar a participação de NODAL no câncer de tireoide, conduzimos estudos de superexpressão e silenciamento parcial por shRNA do gene na linhagem TPC-1. As validações foram realizadas através de ensaios de PCR em tempo real e de *western blotting*.

4.5.1 Efeitos da superexpressão

O clone da linhagem TPC-1 gerado com superexpressão de *NODAL* (NOE) apresenta um aumento expressivo nos níveis de mRNA e proteína (Figura 10). Os valores da validação por qPCR foram analisados estatisticamente por teste t, com p-valor < 0,001. Entretanto, a capacidade de formação de esferas da linhagem TPC-1 não foi influenciada pela superexpressão de *NODAL* (teste t, p-valor = 0,9191) (Figura 11). O perfil de expressão de genes relacionados à via Nodal (*LEFTY1*, *TDGF1*, *NANOG*, *POU5F1* e *SOX2*) e à diferenciação tireoidiana (*TG*, *TPO*, *NIS*, *NKX2-1* e *PAX8*) também não foi significativamente alterado pela superexpressão de *NODAL* (Figura 12).

A seguir avaliamos o efeito funcional da superexpressão de *NODAL* através de ensaio de proliferação. A superexpressão de *NODAL* na linhagem TPC-1 promoveu diminuição da proliferação celular em ensaio de contagem, como pode ser observado na figura 13A. Comparativamente, a linhagem TPC-1 selvagem apresenta a maior taxa de crescimento, imediatamente seguida por KTC1 (Figura 13B). BCPAP e 8305C, supostamente derivadas de tumores mais agressivos, crescem mais lentamente a uma taxa semelhante.

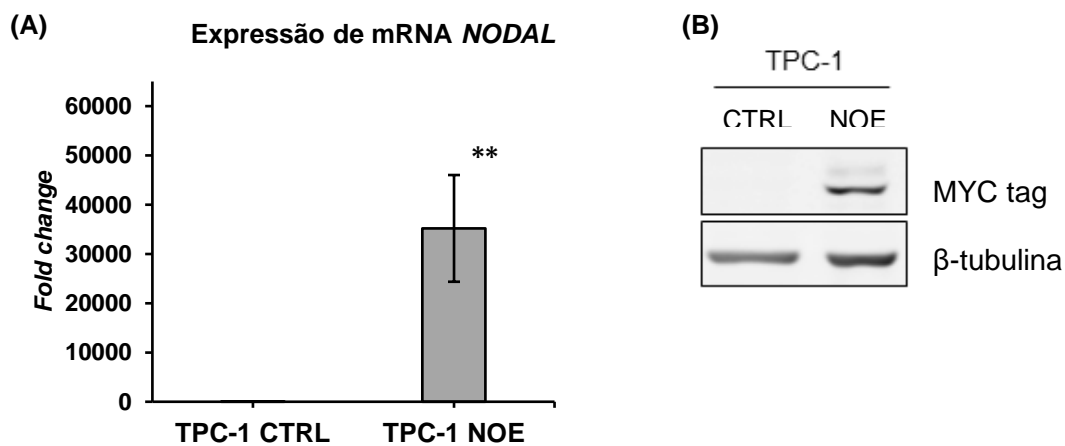


Figura 10. Validação da superexpressão de *NODAL* na linhagem TPC-1. Superexpressão de *NODAL* via transfecção de plasmídeo (NOE) aumenta os níveis de mRNA (p<0,001) (A) e da proteína (B) *NODAL*. A validação da expressão de mRNA foi feita através de PCR em tempo real. Valores expressos como *fold change*, calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, em relação à linhagem transfectada com plasmídeo controle. Valores analisados por teste t. Validação da expressão proteica foi realizada por ensaio de *western blotting* utilizando anticorpo específico para MYC-tag. A proteína β -tubulina foi utilizada como normalizador. ** p-valor < 0,001.

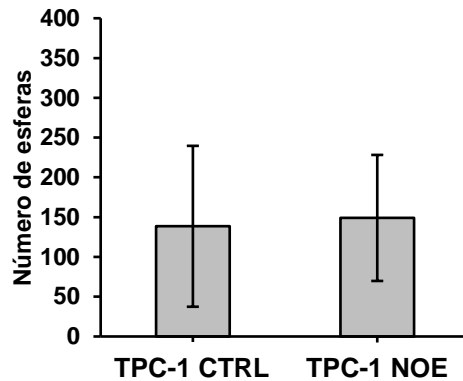


Figura 11. Efeito da superexpressão de *NODAL* na formação de esferas. Células foram semeadas na densidade de 10 células por poço em placas de baixa aderência de 96 poços com meio de cultura adequado para formação de esferas. O número de esferas em cada poço foi contado após 7 dias e não foi observada diferença entre a linhagem TPC-1 controle (CTRL) e com superexpressão de *NODAL* (NOE). Os valores foram analisados por teste t ($p = 0.9191$) ($n=2$).

4.5.2 Efeitos do knock-down

Os clones gerados com *knock-down* de *NODAL* promoveram diminuição de pelo menos 50% nos níveis proteicos, sendo a sequência de shRNA 403216 a mais eficaz com redução de 75% (Figura 14). Por esse motivo, o clone TPC-1 sh403216 (sh16) foi utilizado na condução de experimentos posteriores. O silenciamento parcial de *NODAL* induziu aumento da expressão do gene de pluripotência *SOX2* e do marcador tiroídiano *NIS* (p -valor = 0,0492 e 0,0431, respectivamente, calculados por teste t), mas não alterou o perfil de expressão dos outros genes estudados (Figura 15).

4.5.3 Efeitos da inibição farmacológica dos receptores ALK4/5/7

Alternativamente, testamos a inibição farmacológica dos receptores ALK4/5/7 na linhagem de ATC C643 com o inibidor SB431542. Após 72 horas de tratamento com SB431542, a proliferação diminuiu significativamente (teste t, p -valor = 0,0267) em relação ao tratamento com o veículo DMSO (Figura 16). Esse resultado indica que as vias de sinalização ativadas pelos receptores ALK4/5/7, que inclui a via de sinalização de Nodal, podem contribuir para a proliferação celular em ATC.

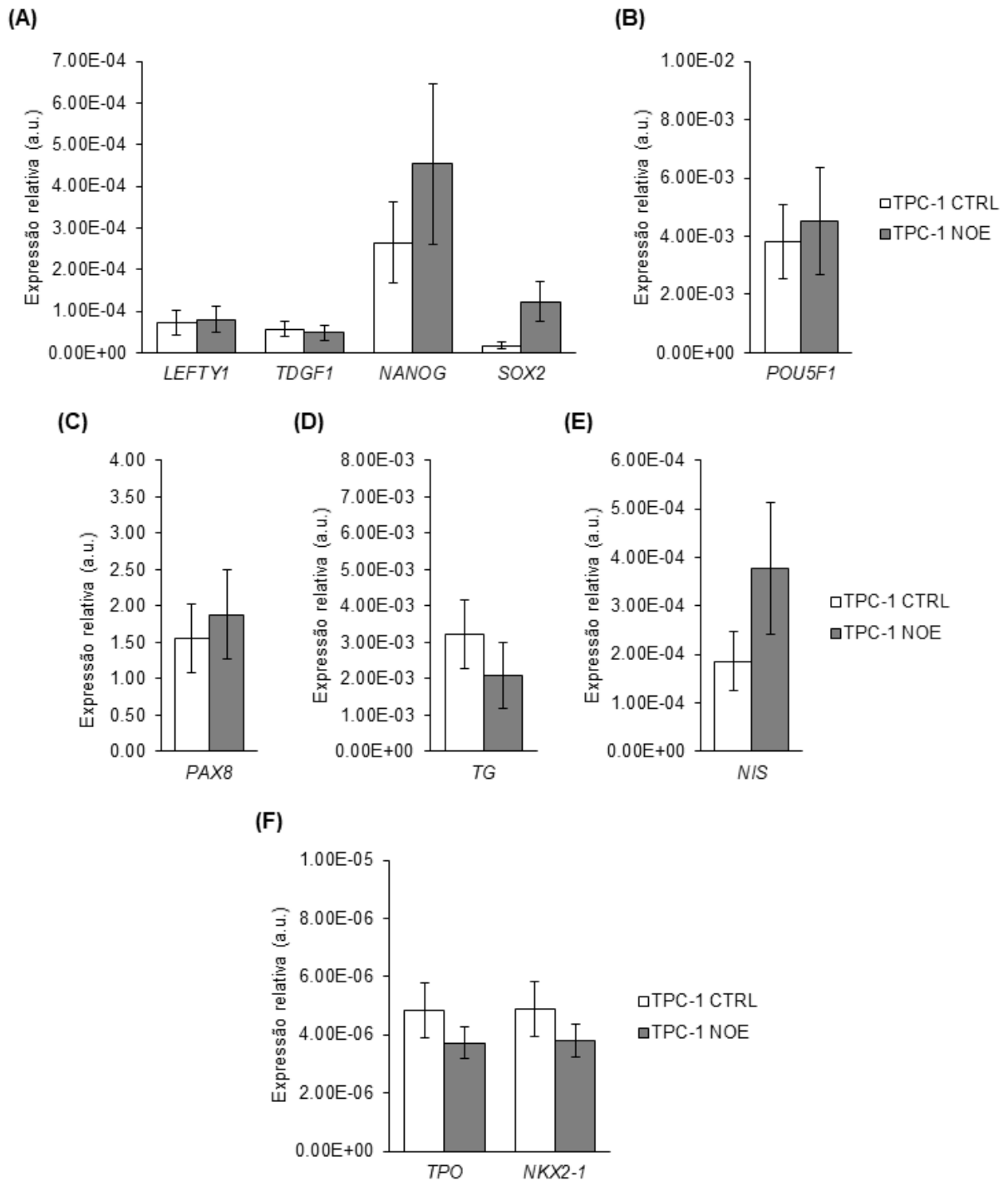


Figura 12. Efeitos da superexpressão de *NODAL* na expressão gênica. Células TPC-1 foram transfectadas com plasmídeo de superexpressão de *NODAL* (NOE) ou controle (CTRL) e selecionadas com G418 para estabelecimento da linhagem estável. A expressão dos genes analisados não foi significativamente alterada pela superexpressão de *NODAL* (A-F). Valores expressos como média \pm desvio padrão e analisados por teste t ($n=3$).

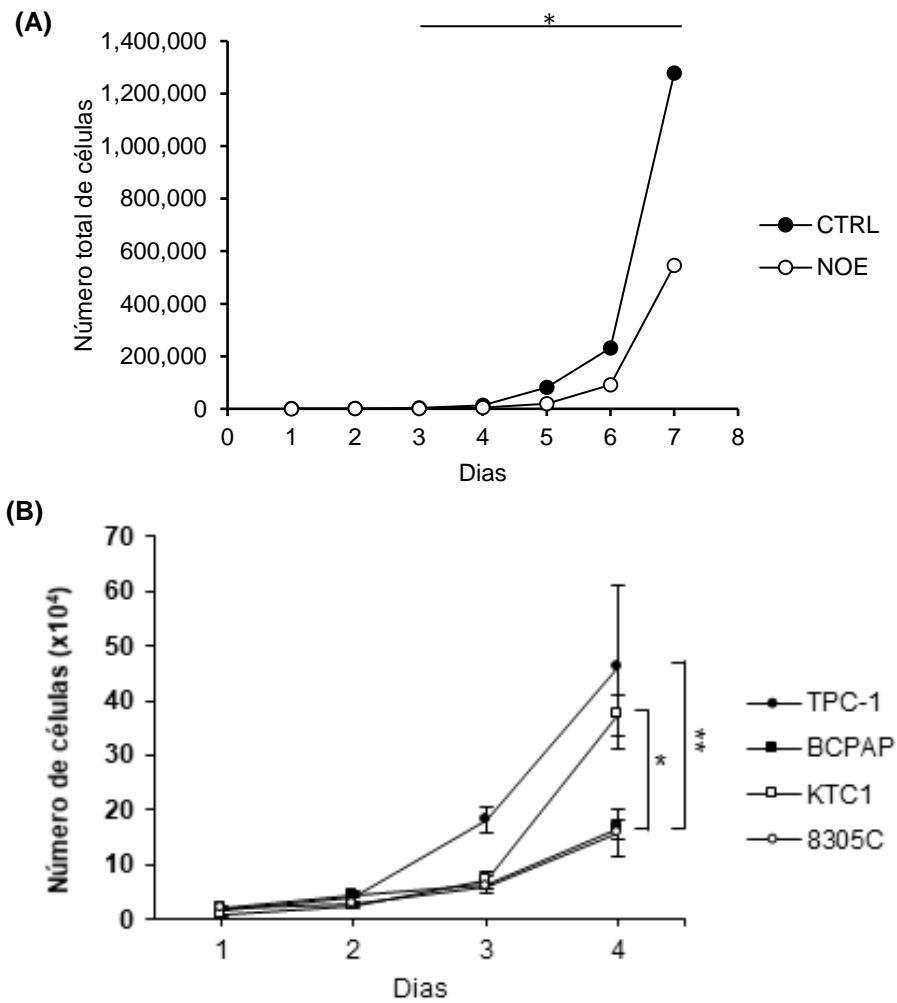


Figura 13. Efeito da superexpressão de *NODAL* na taxa de proliferação celular. Células foram semeadas em placas de 12 poços na densidade de 1×10^3 células/poço e contadas a cada 24 h por sete dias (A) ou 3×10^4 células/poço e contadas manualmente a cada 24 h ao longo de quatro dias (B) com o auxílio da solução Azul de Trypan 0,4% e um hemocitômetro. (A) A superexpressão de *NODAL* na linhagem TPC-1 diminui a proliferação celular (Teste t, $p < 0,05$ a partir do terceiro dia). (B) A linhagem TPC-1 possui a maior taxa de proliferação, seguida imediatamente pela linhagem KTC1, ambas de PTC. As linhagens derivadas de PDTc e ATC proliferam mais lentamente a uma taxa semelhante. Valores analisados por ANOVA seguido de teste Tukey. Valores expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

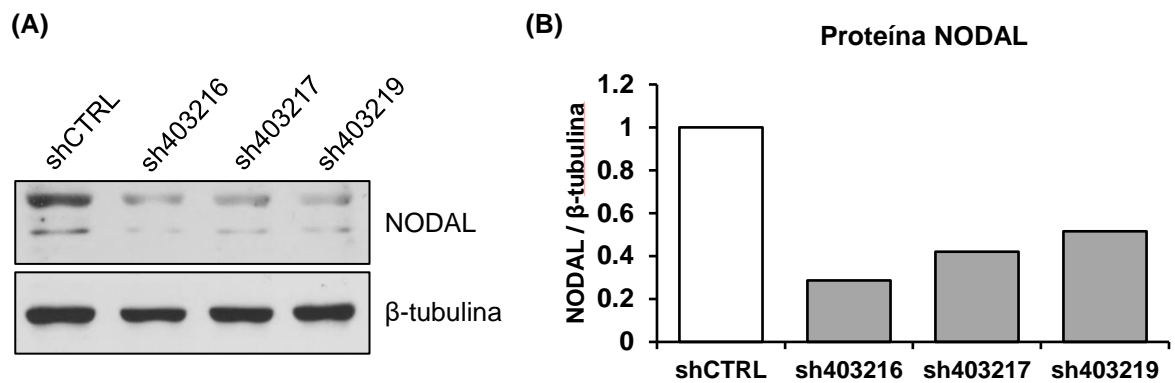


Figura 14. Validação do knock-down de *NODAL* na linhagem TPC-1. Células foram transfectadas com uma das três sequências de shRNA (sh403216, sh403217 e sh403219) ou uma sequência controle (shCTRL). O silenciamento parcial de *NODAL* reduz os níveis da expressão proteica e foi validado por ensaio de *western blotting* utilizando anticorpo específico para *NODAL* (A). A proteína β -tubulina foi utilizada como normalizador. (B) Densitometria óptica dos sinais de *NODAL* normalizado pelos sinais de β -tubulina. Valores mostrados como média.

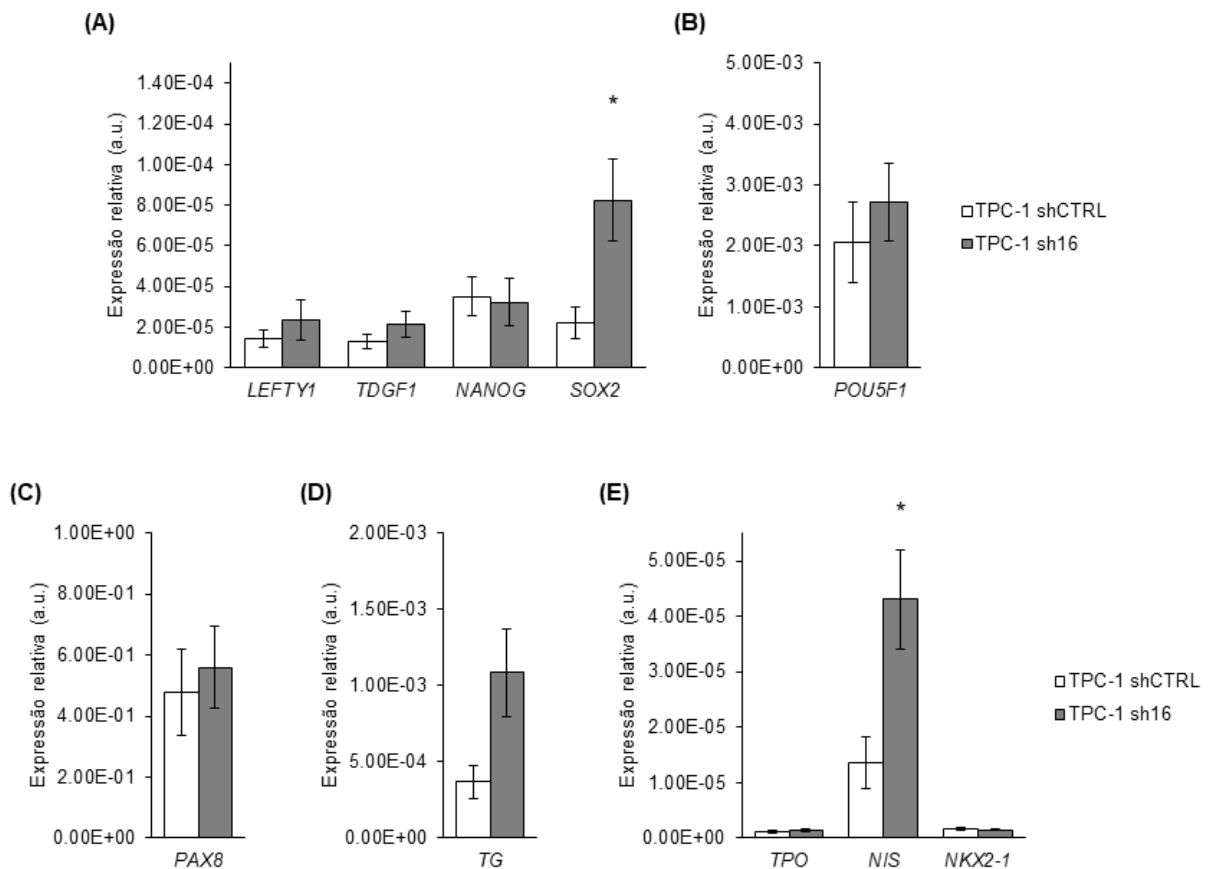


Figura 15. Efeito do knock-down de *NODAL* na expressão gênica. Células TPC-1 foram transfectadas com plasmídeo de silenciamento de *NODAL* (sh16) ou controle (shCTRL) e selecionadas com puomicina para estabelecimento da linhagem estável. A expressão dos genes analisados não foi significativamente alterada pelo *knock-down* de *NODAL*, exceto *SOX2* e *NIS*, que tiveram suas expressões aumentadas pelo silenciamento (A e E). Valores expressos como média \pm desvio padrão e analisados por teste t. * $p < 0,05$ ($n=3$).

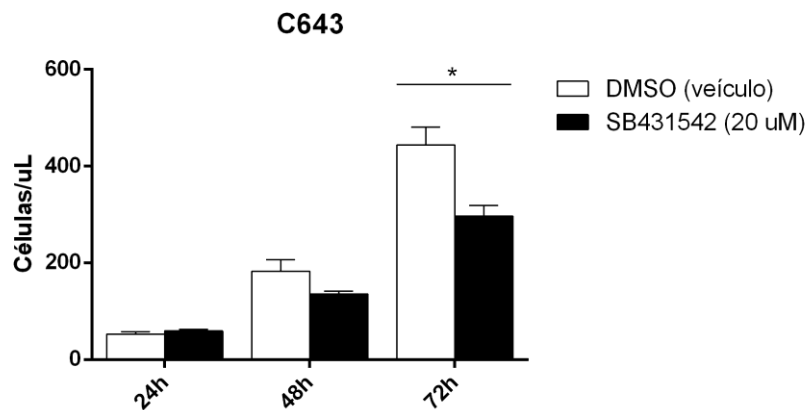


Figura 16. Efeito da inibição farmacológica dos receptores ALK4/5/7 na proliferação celular. Ensaio com linhagem de ATC C643 tratadas com DMSO (veículo) ou inibidor SB431542 na concentração de 20 μ m por 24, 48 e 72 horas mostra que a inibição dos receptores ALK4/5/7 diminui a proliferação em 72h. Valores expressos como média \pm desvio padrão e analisados por teste t. * $p < 0,05$ (n=3).

4.5.4 Efeitos na ativação da via Smad

Analisamos a atividade de ligação das proteínas SMAD ao DNA a fim de investigar o grau de ativação da via de sinalização Smad em linhagens de câncer de tireoide através de ensaio de gene repórter. Como pode ser observado na figura 17, as linhagens TPC-1, BCPAP e K1, todas de carcinoma papilífero, apresentam maior ativação da via Smad. Destas, TPC-1 se destaca com um aumento de 538 vezes em relação à linhagem não tumoral Nthy-ori 3-1. Ao mesmo tempo, as linhagens de carcinoma anaplásico C643 e Hth83 não apresentaram aumento na atividade da luciferase. Estes resultados reforçam a ideia de que a via Smad exerce um papel importante em células tumorais diferenciadas do câncer de tireoide.

4.6 Expressão do *miR-302d-3p* em linhagem celular

De forma a entender a regulação pós-transcricional de Nodal, investigamos a influência de miRNAs na regulação de componentes da via Nodal. miR-302 é um miRNA que regula o inibidor de Nodal, Lefty, e possui expressão desregulada em diferentes tipos de câncer. Por esse motivo, realizamos a análise do perfil de expressão de *miR-302d-3p* em linhagens celulares de câncer de tireoide. Nossos

resultados mostram que não foi detectada nenhuma expressão de *miR-302d-3p* (Figura 18), indicando sua ausência nas células estudadas.

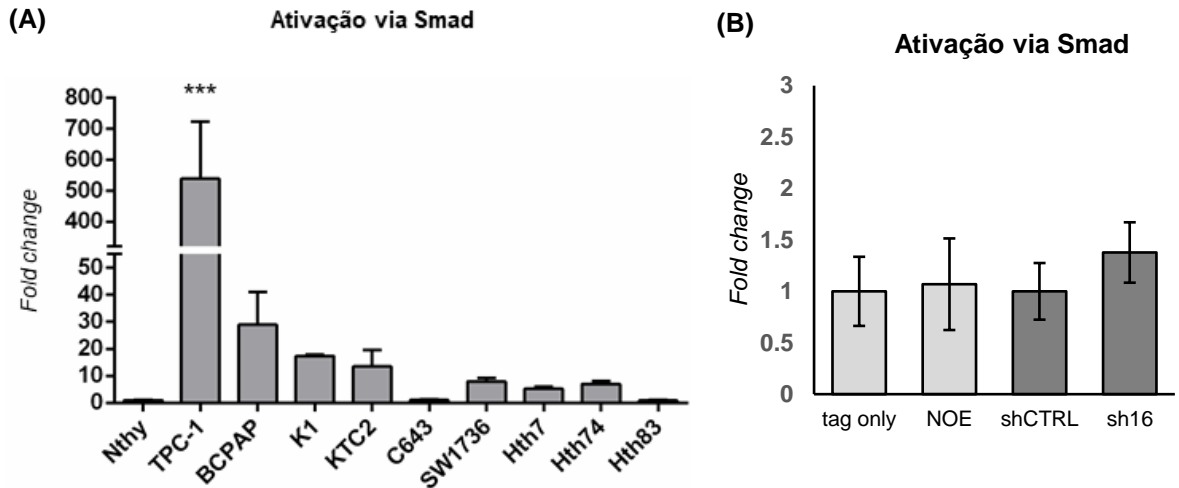


Figura 17. Ativação da via Smad em linhagens selvagens e com modulação de *NODAL*. Ensaios de gene repórter Luciferase mostram que a linhagem selvagem TPC-1 apresenta ativação da sinalização Smad cerca de 500 vezes maior que a linhagem controle Nthy-ori 3-1 **(A)**. A modulação de *NODAL* na linhagem TPC-1 não altera a ativação dessa via de sinalização **(B)**. Os valores de luminescência da Luciferase foram normalizados pelos da luciferase de *Renilla* e analisados por ANOVA. *** $p < 0,001$.

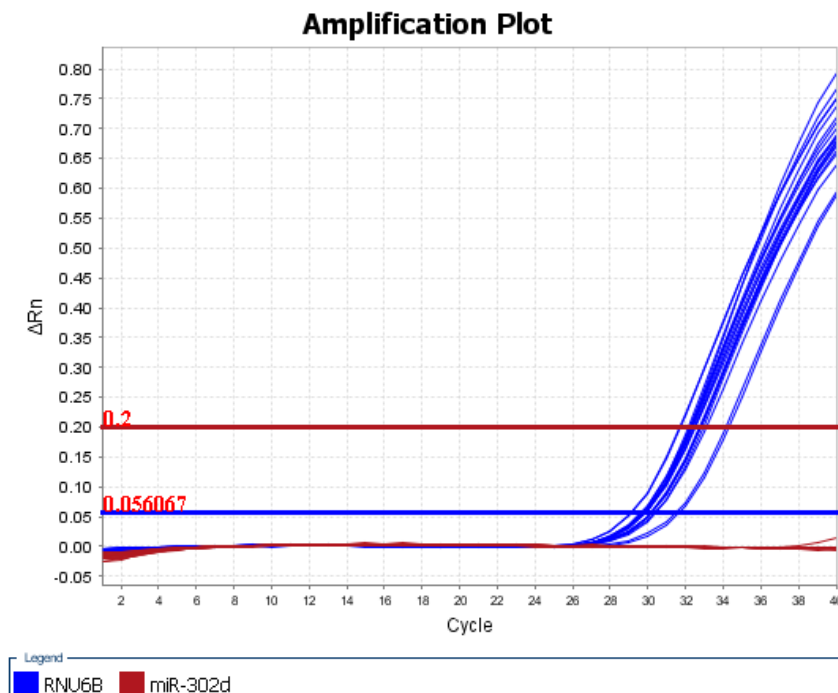


Figura 18. Expressão de *miR-302d-3p* em linhagens de tireoide. As linhagens celulares Nthy-ori 3-1, TPC-1, BCPAP, K1, KTC2, C643, SW1736, Hth7, Hth74 e Hth83 tiveram seu RNA total extraído para síntese de cDNA dirigido para *miR-302d-3p*. O gene *RNU6B* foi utilizado

como normalizador da reação. A figura mostra o gráfico de amplificação da reação de PCR em tempo real, a qual não detectou amplificação do miRNA de interesse em nenhuma das linhagens, indicando ausência de sua expressão.

4.7 Potenciais miRNAs envolvidos na regulação de *NODAL* em PTC

Identificamos através da ferramenta TargetScan os miRNAs miR-129-1 e miR-193b como potenciais reguladores da tradução de *NODAL*, uma vez que ambos possuem sítios de ligação preditos na 3'UTR desse transcrito. Analisamos a expressão desses miRNAs em 59 amostras de pacientes diagnosticados com PTC provenientes do consórcio TCGA.

O *miR-193b* apresenta menor expressão em amostras de PTC quando comparadas às amostras contralaterais não tumorais (teste t, $p < 0,001$), e em tumores BRAF^{T1799A}-positivos em relação a tumores selvagens (WT) (teste t, $p < 0,05$) (Figura 19A), indicando que baixa expressão deste miRNA pode estar envolvida na tumorigênese e na agressividade tumoral. Já a expressão do *miR-129-1* é menor em amostras de PTC (teste t, $p < 0,001$), porém não se distingue entre tumores selvagens e BRAF^{T1799A}-positivos (Figura 19B).

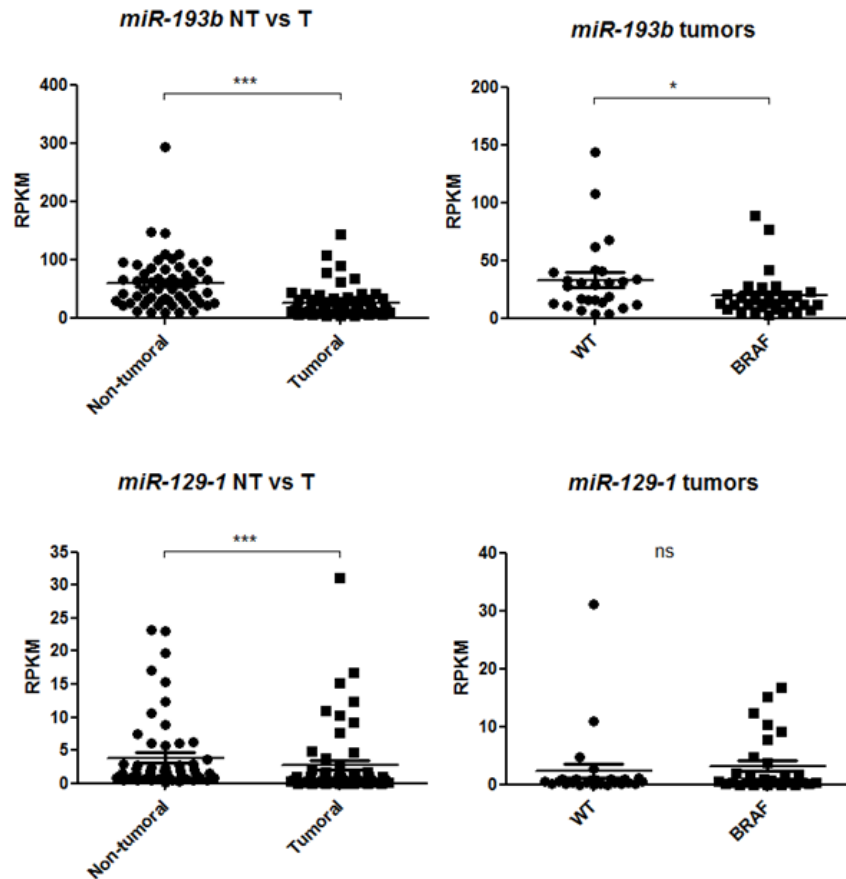


Figura 19. Expressão de potenciais miRNAs reguladores da tradução de NODAL em amostras de PTC. Análise *in silico* através do software TargetScan identificou os miRNAs miR-193b e miR-129-1 como potenciais reguladores da tradução de *NODAL*. Dados de expressão gênica extraídos do TCGA mostram que ambos os miRNAs encontram-se menos expressos em amostras tumorais em comparação a não tumorais. miR-193b encontra-se menos expresso também em tumores BRAF^{T1799A} em relação a tumores selvagens (WT). NT, não tumoral; T, tumoral; BRAF, tumores BRAF^{T1799A}-positivos; ns, não significante (n=59).

5 DISCUSSÃO

O câncer de tireoide apresenta graus de diferenciação celular variados, compreendendo os histotipos bem diferenciados, pouco diferenciados e indiferenciados. Estudos na literatura mostram a expressão da proteína NODAL e reativação da sua via de sinalização em diferentes tipos de câncer, principalmente em estágios mais avançados e tumores mais agressivos. Detectamos através de imunohistoquímica a presença de NODAL em amostras de carcinomas mais diferenciados (PTC), confirmando os achados de Chai *et al.* (2014), que mostrou expressão de NODAL em 100% das amostras de PTC estudadas por imunohistoquímica. A expressão mais acentuada de NODAL em determinadas células foliculares pode indicar um efeito autócrino ou parácrino em outras células, podendo formar nichos de indução da via Nodal. Entretanto, curiosamente, revelamos que NODAL está ausente em tecidos de carcinoma anaplásico. Dessa forma, nossos resultados sugerem que a expressão de NODAL em células foliculares adultas transformadas pode proteger contra graus extremos de desdiferenciação celular, desempenhando um papel protetor no qual sua ausência pode estar associada à perda de diferenciação característica do carcinoma anaplásico.

Obtivemos resultados homogêneos e consistentes através de imunohistoquímica, cuja análise mostra claramente que a célula folicular tiroideana, mas não o estroma, apresenta expressão de NODAL (Figura 6). Entretanto, observamos uma grande variabilidade nos resultados de *western blotting*, que pode ser uma consequência das limitações da metodologia empregada. A proteína NODAL é observada em apenas 25-40% das células de linhagens melanoma em cultura, sugerindo que sua sinalização é limitada e identifica uma importante subpopulação (HARDY; KIRSCHMANN; SEFTOR; MARGARYAN *et al.*, 2010) (ver 4.1). Nossos experimentos de *western blotting* podem ter mascarado a expressão diferencial de NODAL por um subconjunto de células, uma vez que as proteínas totais foram extraídas de um *pool* de células.

Abordamos esse problema realizando ensaio de formação de esferas (SUTHERLAND; MCCREDIE; INCH, 1971), amplamente empregado no estudo de células tumorais (VINCI; GOWAN; BOXALL; PATTERSON *et al.*, 2012), como avaliação da capacidade de auto-renovação. Este ensaio tem sido utilizado para demonstrar a

influência de Nodal na população de células-tronco tumorais em vários tipos de câncer, como de pâncreas (LONARDO; HERMANN; MUELLER; HUBER *et al.*, 2011), mama (GONG; SUN; SUN; ZHAO *et al.*, 2017), e cólon (GONG; GUO; HAI; YANG *et al.*, 2014). Estes estudos geralmente mostram uma correlação positiva entre Nodal e a capacidade de formação de esferas. O enriquecimento de células com características de célula-tronco nas linhagens de câncer de tireoide estudadas mostrou expressão aumentada de NODAL por ensaio de *western blotting*. Inesperadamente, esferas derivadas da linhagem de PTC clássico TPC-1 possuem os maiores níveis da proteína NODAL quando comparados aos de BCPAP e 8305C. Juntos, nossos resultados de ensaio de formação de esferas e imunohistoquímica indicam que NODAL é altamente expresso em um subconjunto de células de PTC, mas não de ATC.

O estudo de Nodal em câncer apresenta limitações que se devem à complexidade metodológica de sua mensuração. Um artigo publicado por Strizzi *et al.* (2012) dedica-se inteiramente à discussão desses desafios, que persistem até hoje. Como parte do grupo pioneiro no estudo de Nodal em câncer, os autores discutem as discrepâncias na detecção da expressão gênica e proteica de Nodal em diferentes estudos, contextos e metodologias. Da mesma maneira, apesar de termos detectado a proteína NODAL em tecido humano por imunohistoquímica e em linhagens celulares por *western blot*, paradoxalmente a medição do mRNA *NODAL* em linhagens de câncer de tireoide mostrou-se desafiadora mesmo quando empregado o método de PCR altamente sensível *digital droplet PCR* (ddPCR) (dados não mostrados). De fato, foi demonstrado recentemente que um programa celular de tradução seletiva é responsável pelo aumento dos níveis de síntese da proteína NODAL a partir de quantidades pequenas de transcrito em células de câncer de mama sob condições de estresse como hipóxia (JEWER; LEE; ZHANG; LIU *et al.*, 2019 (preprint)). Em nossas análises de expressão gênica por PCR em tempo real, os *cycle thresholds* (Cts) obtidos foram maiores que 33, com a maioria sendo maior que 36, para vários genes, não se limitando a *NODAL*. Dessa forma, a quantificação de expressão por níveis de mRNA deve ser feita de maneira sensível e precisa. Consideramos, portanto, a quantificação proteica como método mais confiável para avaliar o papel de NODAL.

A aquisição de características semelhantes às de célula-tronco por células tumorais tem sido extensamente estudada e descrita na literatura (ADORNO-CRUZ; KIBRIA; LIU; DOHERTY *et al.*, 2015). Através desse processo, células tumorais se tornam indiferenciadas, quiescentes e resistentes à terapia. Nosso experimento de curva de crescimento celular mostra que as linhagens de PDTC e ATC, BCPAP e 8305C, respectivamente, possuem uma taxa de proliferação consideravelmente mais baixa que TPC-1 e KTC1. O rápido crescimento observado no número de células TPC-1 e KTC1 indica que essas linhagens são resistentes aos sinais inibitórios de proliferação da via TGF- β e, apesar de ATC frequentemente apresentar rápido crescimento da massa tumoral, nossos resultados não são surpreendentes. Linhagens celulares não recapitulam a heterogeneidade do tumor da qual são derivadas, de modo que a baixa taxa de crescimento observada em BCPAP e 8305C podem indicar que essas células possuem um fenótipo mais quiescente em relação às células TPC-1 e KTC1. Além disso, baixas taxas de proliferação correlacionam com um perfil migratório e invasivo em outros tipos de câncer (HOEK; EICHHOFF; SCHLEGEL; DOBBELING *et al.*, 2008).

Mostramos ainda que as células TPC-1 apresentam maior atividade da via de sinalização de SMADs do que as outras linhagens estudadas mensuradas através do ensaio SBE4-Luc, sugerindo que essa linhagem pode ser mais responsiva à sinalização Nodal devido à presença de maior maquinário molecular envolvido na transdução de sinais induzidos por Nodal. Entretanto, a modulação do gene *NODAL* não alterou a ativação da via Smad em nosso ensaio de gene repórter, indicando o possível envolvimento de outras moléculas na ativação dessa sinalização, como os demais membros da família TGF- β além de outras vias como MAPK, PKC e Akt (FENG; DERYNCK, 2005).

Os efeitos da sinalização TGF- β são diversos e altamente contexto-dependentes, tanto em células saudáveis como no câncer. Seus sinais desempenham um papel duplo na regulação da proliferação e morte celular, além de estarem envolvidos no processo metastático através da indução de EMT (DERYNCK; AKHURST; BALMAIN, 2001; IKUSHIMA; MIYAZONO, 2010). Na célula folicular tireoidiana, a via de sinalização TGF- β participa da regulação da diferenciação e proliferação celular, atuando como fator anti-mitogênico na ausência de oncogenes (DREMIER; TATON; COULONVAL; NAKAMURA *et al.*, 1994; HELDIN; LANDSTROM; MOUSTAKAS, 2009; MACIEL; KIMURA; TAKAHASKI; LOPES *et al.*, 1995; MATSUO; MARTINS; LEONI;

HAJJAR *et al.*, 2004). A ligação de TGF- β s no heterocomplexo de receptores TGFBR1/2 induz a fosforilação de SMAD2/3, que se translocam ao núcleo junto com SMAD4 para induzir a expressão de p21 e, conseqüentemente, a inibição do ciclo celular (GONG; AMMANAMANCHI; KO; BRATTAIN, 2003; YOO; CHOI; LEE; KIM *et al.*, 1999). Além disso, a ação inibitória de TGF- β 1 sobre fatores de proliferação como IGF-1 e EGF é bem estabelecida e discutida na literatura (LIU; TAKANO; AMINO, 1996; MINCIONE; ESPOSITO; DI MARCANTONIO; PICCIRELLI *et al.*, 2003; PISAREV; THOMASZ; JUVENAL, 2009). Entretanto, Kimura *et al.* (1999) reportaram aumento da expressão de TGF- β 1 em tumores da tireoide, sugerindo que a célula tumoral tireoidiana se torna insensível ao sinal anti-proliferativo desta via. Da mesma forma, outros estudos mostraram o envolvimento de TGF- β 1 na potencialização da migração e invasão celular (NILSSON; DAHLMAN; WESTERMARK; WESTERMARK, 1995), sendo associado ao fenômeno da transição epitélio-mesênquima (GRANDE; FRANZEN; KARLSSON; ERICSON *et al.*, 2002). Como membro da família TGF- β e sinalizador através de SMADs, Nodal pode estar associado à proliferação celular em câncer de tireoide, e sua ausência em ATC pode estar relacionada à ativação do ciclo celular e ao rápido crescimento desse tipo de tumor. A superexpressão de *NODAL* conferiu menor taxa de proliferação às células TPC-1 quando comparadas ao seu controle. Paradoxalmente, a inibição da sinalização através dos receptores ALK4/5/7 foi capaz de reduzir a proliferação celular na linhagem de ATC C643. Nodal sinaliza através dos receptores do tipo I ALK4 ou ALK7, mas diferentes ligantes da superfamília TGF- β também são capazes de ativar esses receptores em adição ao receptor ALK5, como os ligantes TGF- β s, activinas A e B, e GDFs (HELDIN; MOUSTAKAS, 2016). Apesar de tecidos de ATC não expressarem a proteína NODAL, apresentamos resultados que indicam o envolvimento da via de sinalização estimulada pelos receptores ALK4/5/7 na linhagem C643, ainda que através de outro ligante diferente de Nodal.

A glândula tireoide origina-se a partir de células do endoderma (NILSSON; FAGMAN, 2017), e Nodal é um dos fatores-chave responsáveis pela especificação desse tecido embrionário (FELDMAN; GATES; EGAN; DOUGAN *et al.*, 1998). De fato, o crescimento e diferenciação da glândula tireoide em *zebrafish* envolve a expressão de fatores de transcrição dependentes de Nodal (ELSALINI; VON GARTZEN; CRAMER; ROHR, 2003). Além disso, Takano & Amino propuseram anos atrás uma nova teoria para a origem do câncer de tireoide, na qual remanescentes de células embrionárias

tiroidianas, e não células foliculares normais, seriam responsáveis pelo seu desenvolvimento (TAKANO; AMINO, 2005). Essa teoria, chamada pelos autores de “carcinogênese de células fetais” (*fetal cell carcinogenesis*), considera o processo de carcinogênese como um desenvolvimento anormal de células tiroidianas fetais, ao invés de desdiferenciação de células foliculares normais ou benignas. Nossos resultados reforçam até certo ponto essa teoria, indicando que células de ATC perdem a expressão de NODAL e que isso pode impedir a expressão de marcadores de diferenciação tiroidiana. Assim, a perda de diferenciação observada no câncer de tireoide agressivo pode não resultar da aquisição de perfil de célula-tronco, mas sim da perda da atividade de fatores de transcrição cruciais para a manutenção do estado diferenciado das células foliculares tiroidianas.

Frente à escassez de dados que esclareçam os mecanismos de reexpressão de NODAL no câncer, consideramos que a desregulação de miRNAs pudesse estar envolvida. A desregulação do miR-302 tem sido descrita em diversos tipos de câncer, e o *cluster* ao qual pertence está relacionado à indução de pluripotência. Em nossa análise *in silico*, descobrimos que o miR-302d tem Lefty como potencial alvo, e análises da expressão de *miR-302d-3p* por qPCR revelaram ausência da expressão desse miRNA nas linhagens estudadas, concordando com estudos que o descrevem como supressor tumoral. Análises *in silico* adicionais revelaram miR-193b e miR-129-1 como potenciais reguladores de *NODAL*, e dados provenientes do consórcio TCGA indicam que a desregulação negativa desses miRNAs em tecidos de PTC pode estar envolvida no aumento da tradução do mRNA *NODAL* nesses tecidos. Estudos adicionais são necessários para abordar e validar essa proposição.

Nosso estudo sugere que NODAL está associado a estágios menos agressivos e mais diferenciados do câncer de tireoide, e sua ausência em tecidos de ATC revelam um possível papel protetor dessa molécula. Contudo, assim como no trabalho de Xu *et al.* (2004), a nossa superexpressão do gene *NODAL* foi realizada em linhagem de PTC, que supostamente já expressa o morfógeno. É de fundamental interesse que análises adicionais sejam conduzidas em linhagens e modelos de ATC a fim de investigar o papel de NODAL nesse tipo tumoral.

6 CONCLUSÕES

- i. A proteína NODAL é expressa no carcinoma papilífero de tireoide humano, mas não em carcinoma anaplásico;
- ii. Há uma discrepância entre os níveis de mRNA e proteína NODAL em linhagens de câncer de tireoide, fenômeno observado em outros tipos de câncer;
- iii. A superexpressão de *NODAL* não altera o perfil de expressão de genes de pluripotência e marcadores tiroidianos na linhagem TPC-1, enquanto o silenciamento parcial de *NODAL* aumenta a expressão de *SOX2* e *NIS* na mesma linhagem;
- iv. A superexpressão de *NODAL* diminui a proliferação celular da linhagem TPC-1;
- v. A modulação de *NODAL* não altera a sinalização de SMADs na linhagem TPC-1;
- vi. Os miRNAs miR-193 e miR-129-1 apresentam expressão reduzida no PTC comparado com amostra não-tumoral e podem estar relacionados ao aumento de NODAL observado via imunohistoquímica em amostras de PTC;
- vii. O estudo de Nodal exige ensaios e modelos mais avançados que abordem a heterogeneidade celular e complexidade do microambiente tumoral.

REFERÊNCIAS*

ACS. **Cancer Facts & Figures 2019**. Atlanta: American Cancer Society, 2019.

ADORNO-CRUZ, V.; KIBRIA, G.; LIU, X.; DOHERTY, M. *et al.* Cancer stem cells: targeting the roots of cancer, seeds of metastasis, and sources of therapy resistance. **Cancer Res**, 75, n. 6, p. 924-929, Mar 15 2015.

AGARWAL, V.; BELL, G. W.; NAM, J. W.; BARTEL, D. P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. **Elife**, 4, Aug 12 2015.

BARROSO-DELJESUS, A.; LUCENA-AGUILAR, G.; SANCHEZ, L.; LIGERO, G. *et al.* The Nodal inhibitor Lefty is negatively modulated by the microRNA miR-302 in human embryonic stem cells. **FASEB J**, 25, n. 5, p. 1497-1508, May 2011.

BECK, S.; LE GOOD, J. A.; GUZMAN, M.; BEN HAIM, N. *et al.* Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. **Nat Cell Biol**, 4, n. 12, p. 981-985, Dec 2002.

BLANCHET, M. H.; LE GOOD, J. A.; OORSCHOT, V.; BAFLAST, S. *et al.* Cripto localizes Nodal at the limiting membrane of early endosomes. **Sci Signal**, 1, n. 45, p. ra13, Nov 11 2008.

BRENNECKE, J.; HIPFNER, D. R.; STARK, A.; RUSSELL, R. B. *et al.* bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. **Cell**, 113, n. 1, p. 25-36, Apr 4 2003.

BYRD, J. K.; YAWN, R. J.; WILHOIT, C. S.; SORA, N. D. *et al.* Well differentiated thyroid carcinoma: current treatment. **Curr Treat Options Oncol**, 13, n. 1, p. 47-57, Mar 2012.

CABANILLAS, M. E.; MCFADDEN, D. G.; DURANTE, C. Thyroid cancer. **Lancet**, 388, n. 10061, p. 2783-2795, Dec 3 2016.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. **Cell**, 159, n. 3, p. 676-690, Oct 23 2014.

CAVALLARI, C.; FONSA TO, V.; HERRERA, M. B.; BRUNO, S. *et al.* Role of Lefty in the anti tumor activity of human adult liver stem cells. **Oncogene**, 32, n. 7, p. 819-826, Feb 14 2013.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

CHAI, Y. J.; KIM, Y. A.; JEE, H. G.; YI, J. W. *et al.* Expression of the embryonic morphogen Nodal in differentiated thyroid carcinomas: Immunohistochemistry assay in tissue microarray and The Cancer Genome Atlas data analysis. **Surgery**, 156, n. 6, p. 1559-1567; discussion 1567-1558, Dec 2014.

CHEN, C.; RIDZON, D. A.; BROOMER, A. J.; ZHOU, Z. *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, 33, n. 20, p. e179, Nov 27 2005.

CHEN, C.; SHEN, M. M. Two modes by which Lefty proteins inhibit nodal signaling. **Curr Biol**, 14, n. 7, p. 618-624, Apr 6 2004.

CHOI, W. Y.; GIRALDEZ, A. J.; SCHIER, A. F. Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430. **Science**, 318, n. 5848, p. 271-274, Oct 12 2007.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, 162, n. 1, p. 156-159, Apr 1987.

CLEMENTS, M.; PERNAUTE, B.; VELLA, F.; RODRIGUEZ, T. A. Crosstalk between Nodal/activin and MAPK p38 signaling is essential for anterior-posterior axis specification. **Curr Biol**, 21, n. 15, p. 1289-1295, Aug 9 2011.

DAHLE, O.; KUMAR, A.; KUEHN, M. R. Nodal signaling recruits the histone demethylase Jmjd3 to counteract polycomb-mediated repression at target genes. **Sci Signal**, 3, n. 127, p. ra48, Jun 22 2010.

DAVIES, M.; ROBINSON, M.; SMITH, E.; HUNTLEY, S. *et al.* Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF-beta1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways. **J Cell Biochem**, 95, n. 5, p. 918-931, Aug 1 2005.

DAVIES, T. F.; LATIF, R.; MINSKY, N. C.; MA, R. Clinical review: The emerging cell biology of thyroid stem cells. **J Clin Endocrinol Metab**, 96, n. 9, p. 2692-2702, Sep 2011.

DE SILVA, T.; YE, G.; LIANG, Y. Y.; FU, G. *et al.* Nodal promotes glioblastoma cell growth. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 3, p. 59, 2012.

DERYNCK, R.; AKHURST, R. J.; BALMAIN, A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nat Genet**, 29, n. 2, p. 117-129, Oct 2001.

DREMIER, S.; TATON, M.; COULONVAL, K.; NAKAMURA, T. *et al.* Mitogenic, dedifferentiating, and scattering effects of hepatocyte growth factor on dog thyroid cells. **Endocrinology**, 135, n. 1, p. 135-140, Jul 1994.

EBISAWA, T.; FUKUCHI, M.; MURAKAMI, G.; CHIBA, T. *et al.* Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. **J Biol Chem**, 276, n. 16, p. 12477-12480, Apr 20 2001.

ELSALINI, O. A.; VON GARTZEN, J.; CRAMER, M.; ROHR, K. B. Zebrafish *hhx*, *nk2.1a*, and *pax2.1* regulate thyroid growth and differentiation downstream of Nodal-dependent transcription factors. **Dev Biol**, 263, n. 1, p. 67-80, Nov 1 2003.

FAGIN, J. A.; WELLS, S. A., Jr. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. **N Engl J Med**, 375, n. 11, p. 1054-1067, Sep 15 2016.

FAREH, M.; TURCHI, L.; VIROLLE, V.; DEBRUYNE, D. *et al.* The miR 302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. **Cell Death Differ**, 19, n. 2, p. 232-244, Feb 2012.

FELDMAN, B.; GATES, M. A.; EGAN, E. S.; DOUGAN, S. T. *et al.* Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. **Nature**, 395, n. 6698, p. 181-185, Sep 10 1998.

FENG, X. H.; DERYNCK, R. Specificity and versatility in *tgf-beta* signaling through Smads. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 21, p. 659-693, 2005.

FIORE, A. P.; FUZIWARA, C. S.; KIMURA, E. T. High iodine concentration attenuates RET/PTC3 oncogene activation in thyroid follicular cells. **Thyroid**, 19, n. 11, p. 1249-1256, Nov 2009.

FUSCO, A.; GRIECO, M.; SANTORO, M.; BERLINGIERI, M. T. *et al.* A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. **Nature**, 328, n. 6126, p. 170-172, Jul 9-15 1987.

GERALDO, M. V. **Regulação da via de sinalização de TGF- β pelo microRNA miR-146b-5p no câncer de tireoide.** 2011. (PhD) - Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GONG, J.; AMMANAMANCHI, S.; KO, T. C.; BRATTAIN, M. G. Transforming growth factor beta 1 increases the stability of p21/WAF1/CIP1 protein and inhibits CDK2 kinase activity in human colon carcinoma FET cells. **Cancer Res**, 63, n. 12, p. 3340-3346, Jun 15 2003.

GONG, W.; SUN, B.; SUN, H.; ZHAO, X. *et al.* Nodal signaling activates the Smad2/3 pathway to regulate stem cell-like properties in breast cancer cells. **Am J Cancer Res**, 7, n. 3, p. 503-517, 2017.

GONG, Y.; GUO, Y.; HAI, Y.; YANG, H. *et al.* Nodal promotes the self-renewal of human colon cancer stem cells via an autocrine manner through Smad2/3 signaling pathway. **Biomed Res Int**, 2014, p. 364134, 2014.

GRANDE, M.; FRANZEN, A.; KARLSSON, J. O.; ERICSON, L. E. *et al.* Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes. **J Cell Sci**, 115, n. Pt 22, p. 4227-4236, Nov 15 2002.

GREGORY, R. I.; CHENDRIMADA, T. P.; COOCH, N.; SHIEKHATTAR, R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. **Cell**, 123, n. 4, p. 631-640, Nov 18 2005.

GRIECO, M.; SANTORO, M.; BERLINGIERI, M. T.; MELILLO, R. M. *et al.* PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. **Cell**, 60, n. 4, p. 557-563, Feb 23 1990.

GUO, Y.; CUI, J.; JI, Z.; CHENG, C. *et al.* miR-302/367/LATS2/YAP pathway is essential for prostate tumor-propagating cells and promotes the development of castration resistance. **Oncogene**, 36, n. 45, p. 6336-6347, Nov 9 2017.

HADDAD, R. I.; LYDIATT, W. M.; BALL, D. W.; BUSAIDY, N. L. *et al.* Anaplastic Thyroid Carcinoma, Version 2.2015. **J Natl Compr Canc Netw**, 13, n. 9, p. 1140-1150, Sep 2015.

HARDY, K. M.; KIRSCHMANN, D. A.; SEFTOR, E. A.; MARGARYAN, N. V. *et al.* Regulation of the embryonic morphogen Nodal by Notch4 facilitates manifestation of the aggressive melanoma phenotype. **Cancer Res**, 70, n. 24, p. 10340-10350, Dec 15 2010.

HARRISON, C. A.; AL-MUSAWI, S. L.; WALTON, K. L. Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF-beta superfamily ligands. **Growth Factors**, 29, n. 5, p. 174-186, Oct 2011.

HELDIN, C. H.; LANDSTROM, M.; MOUSTAKAS, A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. **Curr Opin Cell Biol**, 21, n. 2, p. 166-176, Apr 2009.

HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K.; TEN DIJKE, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature**, 390, n. 6659, p. 465-471, Dec 4 1997.

HELDIN, C. H.; MOUSTAKAS, A. Signaling Receptors for TGF-beta Family Members. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 8, n. 8, Aug 1 2016.

HENDRIX, M. J.; SEFTOR, E. A.; SEFTOR, R. E.; KASEMEIER-KULESA, J. *et al.* Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. **Nat Rev Cancer**, 7, n. 4, p. 246-255, Apr 2007.

HOEK, K. S.; EICHHOFF, O. M.; SCHLEGEL, N. C.; DOBBELING, U. *et al.* In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. **Cancer Res**, 68, n. 3, p. 650-656, Feb 1 2008.

HOWELL, G. M.; HODAK, S. P.; YIP, L. RAS mutations in thyroid cancer. **Oncologist**, 18, n. 8, p. 926-932, 2013.

HOWLADER N, N. A., Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). **SEER Cancer**

Statistics Review, 1975-2016. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2019. Disponível em: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/. Acesso em: 9/25/2019.

HUANG, S. S.; HUANG, J. S. TGF-beta control of cell proliferation. **J Cell Biochem**, 96, n. 3, p. 447-462, Oct 15 2005.

HUENG, D. Y.; LIN, G. J.; HUANG, S. H.; LIU, L. W. *et al.* Inhibition of Nodal suppresses angiogenesis and growth of human gliomas. **J Neurooncol**, 104, n. 1, p. 21-31, Aug 2011.

IKUSHIMA, H.; MIYAZONO, K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, 10, n. 6, p. 415-424, Jun 2010.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil.** . Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA), 2018. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>. Acesso em: 9/25/2019.

ISHIZAKA, Y.; ITOH, F.; TAHIRA, T.; IKEDA, I. *et al.* Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. **Oncogene**, 4, n. 12, p. 1519-1521, Dec 1989.

ITOH, F.; WATABE, T.; MIYAZONO, K. Roles of TGF-beta family signals in the fate determination of pluripotent stem cells. **Semin Cell Dev Biol**, 32, p. 98-106, Aug 2014.

JEWER, M.; LEE, L.; ZHANG, G.; LIU, J. *et al.* Translational control of breast cancer plasticity. **bioRxiv**, 2019 (preprint).

KAVSAK, P.; RASMUSSEN, R. K.; CAUSING, C. G.; BONNI, S. *et al.* Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. **Mol Cell**, 6, n. 6, p. 1365-1375, Dec 2000.

KIMURA, E. T.; KOPP, P.; ZBAEREN, J.; ASMIS, L. M. *et al.* Expression of transforming growth factor beta1, beta2, and beta3 in multinodular goiters and differentiated thyroid carcinomas: a comparative study. **Thyroid**, 9, n. 2, p. 119-125, Feb 1999.

KIMURA, E. T.; NIKIFOROVA, M. N.; ZHU, Z.; KNAUF, J. A. *et al.* High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. **Cancer Res**, 63, n. 7, p. 1454-1457, Apr 1 2003.

KNAUF, J. A.; KURODA, H.; BASU, S.; FAGIN, J. A. RET/PTC-induced dedifferentiation of thyroid cells is mediated through Y1062 signaling through SHC-RAS-MAP kinase. **Oncogene**, 22, n. 28, p. 4406-4412, Jul 10 2003.

KONDO, T.; EZZAT, S.; ASA, S. L. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. **Nat Rev Cancer**, 6, n. 4, p. 292-306, Apr 2006.

KREBS, L. T.; IWAI, N.; NONAKA, S.; WELSH, I. C. *et al.* Notch signaling regulates left-right asymmetry determination by inducing Nodal expression. **Genes Dev**, 17, n. 10, p. 1207-1212, May 15 2003.

LAWRENCE, M. G.; MARGARYAN, N. V.; LOESSNER, D.; COLLINS, A. *et al.* Reactivation of embryonic nodal signaling is associated with tumor progression and promotes the growth of prostate cancer cells. **Prostate**, 71, n. 11, p. 1198-1209, Aug 1 2011.

LE GOOD, J. A.; JOUBIN, K.; GIRALDEZ, A. J.; BEN-HAIM, N. *et al.* Nodal stability determines signaling range. **Curr Biol**, 15, n. 1, p. 31-36, Jan 11 2005.

LEE, C. C.; JAN, H. J.; LAI, J. H.; MA, H. I. *et al.* Nodal promotes growth and invasion in human gliomas. **Oncogene**, 29, n. 21, p. 3110-3123, May 27 2010.

LEE, M. K.; PARDOUX, C.; HALL, M. C.; LEE, P. S. *et al.* TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. **EMBO J**, 26, n. 17, p. 3957-3967, Sep 5 2007.

LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, 120, n. 1, p. 15-20, Jan 14 2005.

LIN, S. L.; CHANG, D. C.; CHANG-LIN, S.; LIN, C. H. *et al.* Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. **RNA**, 14, n. 10, p. 2115-2124, Oct 2008.

LIU, G.; TAKANO, T.; AMINO, N. TGF-beta 1 inhibits the cell proliferation stimulated by IGF-I by blocking the tyrosine phosphorylation of 175kDa substrate. **Endocr Res**, 22, n. 3, p. 277-287, Aug 1996.

LONARDO, E.; HERMANN, P. C.; MUELLER, M. T.; HUBER, S. *et al.* Nodal/Activin signaling drives self-renewal and tumorigenicity of pancreatic cancer stem cells and provides a target for combined drug therapy. **Cell Stem Cell**, 9, n. 5, p. 433-446, Nov 4 2011.

LUO, L.; YE, G.; NADEEM, L.; FU, G. *et al.* MicroRNA-378a-5p promotes trophoblast cell survival, migration and invasion by targeting Nodal. **J Cell Sci**, 125, n. Pt 13, p. 3124-3132, Jul 1 2012.

MAADI, H.; MOSHTAGHIAN, A.; TAHA, M. F.; MOWLA, S. J. *et al.* Multimodal tumor suppression by miR-302 cluster in melanoma and colon cancer. **Int J Biochem Cell Biol**, 81, n. Pt A, p. 121-132, Dec 2016.

MACIEL, R. M.; KIMURA, E. T.; TAKAHASKI, M. H.; LOPES, M. H. *et al.* Insulin-Like Growth Factor I in Human Thyroid Tissue: Specific Localization by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. **Endocr Pathol**, 6, n. 3, p. 207-215, Autumn 1995.

MASSAGUE, J. TGF-beta signal transduction. **Annu Rev Biochem**, 67, p. 753-791, 1998.

MASSAGUE, J. TGFbeta signalling in context. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 13, n. 10, p. 616-630, Oct 2012.

MASSAGUE, J.; BLAIN, S. W.; LO, R. S. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. **Cell**, 103, n. 2, p. 295-309, Oct 13 2000.

MATSUO, S. E.; EBINA, K. N.; KULCSAR, M. A.; FRIGUGLIETTI, C. U. *et al.* Activin betaB expression in rat experimental goiter and human thyroid tumors. **Thyroid**, 13, n. 3, p. 239-247, Mar 2003.

MATSUO, S. E.; FIORE, A. P.; SIGUEMATU, S. M.; EBINA, K. N. *et al.* Expression of SMAD proteins, TGF-beta/activin signaling mediators, in human thyroid tissues. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 54, n. 4, p. 406-412, Jun 2010.

MATSUO, S. E.; LEONI, S. G.; COLQUHOUN, A.; KIMURA, E. T. Transforming growth factor-beta1 and activin A generate antiproliferative signaling in thyroid cancer cells. **J Endocrinol**, 190, n. 1, p. 141-150, Jul 2006.

MATSUO, S. E.; MARTINS, L.; LEONI, S. G.; HAJJAR, D. *et al.* [Biological markers in thyroid tumors]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 48, n. 1, p. 114-125, Feb 2004.

MESNARD, D.; GUZMAN-AYALA, M.; CONSTAM, D. B. Nodal specifies embryonic visceral endoderm and sustains pluripotent cells in the epiblast before overt axial patterning. **Development**, 133, n. 13, p. 2497-2505, Jul 2006.

MINCIONE, G.; ESPOSITO, D. L.; DI MARCANTONIO, M. C.; PICCIRELLI, A. *et al.* TGF-beta 1 modulation of IGF-I signaling pathway in rat thyroid epithelial cells. **Exp Cell Res**, 287, n. 2, p. 411-423, Jul 15 2003.

MITRA, N.; SINHA, S.; RAMYA, T. N.; SUROLIA, A. N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. **Trends Biochem Sci**, 31, n. 3, p. 156-163, Mar 2006.

MITSUTAKE, N.; KNAUF, J. A.; MITSUTAKE, S.; MESA, C., Jr. *et al.* Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. **Cancer Res**, 65, n. 6, p. 2465-2473, Mar 15 2005.

MOCHIZUKI, K.; KONDO, T.; NAKAZAWA, T.; IWASHINA, M. *et al.* RET rearrangements and BRAF mutation in undifferentiated thyroid carcinomas having papillary carcinoma components. **Histopathology**, 57, n. 3, p. 444-450, Sep 2010.

MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C. H. Non-Smad TGF-beta signals. **J Cell Sci**, 118, n. Pt 16, p. 3573-3584, Aug 15 2005.

MOUSTAKAS, A.; SOUCHELNYTSKYI, S.; HELDIN, C. H. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. **J Cell Sci**, 114, n. Pt 24, p. 4359-4369, Dec 2001.

NAKAO, A.; AFRAKHTE, M.; MOREN, A.; NAKAYAMA, T. *et al.* Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. **Nature**, 389, n. 6651, p. 631-635, Oct 9 1997.

NAKAZAWA, T.; KONDO, T.; KOBAYASHI, Y.; TAKAMURA, N. *et al.* RET gene rearrangements (RET/PTC1 and RET/PTC3) in papillary thyroid carcinomas from an iodine-rich country (Japan). **Cancer**, 104, n. 5, p. 943-951, Sep 1 2005.

NAMBA, H.; GUTMAN, R. A.; MATSUO, K.; ALVAREZ, A. *et al.* H-ras protooncogene mutations in human thyroid neoplasms. **J Clin Endocrinol Metab**, 71, n. 1, p. 223-229, Jul 1990.

NAMBA, H.; NAKASHIMA, M.; HAYASHI, T.; HAYASHIDA, N. *et al.* Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. **J Clin Endocrinol Metab**, 88, n. 9, p. 4393-4397, Sep 2003.

NIKIFOROV, Y. E. Molecular diagnostics of thyroid tumors. **Arch Pathol Lab Med**, 135, n. 5, p. 569-577, May 2011.

NIKIFOROV, Y. E.; NIKIFOROVA, M. N. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. **Nat Rev Endocrinol**, 7, n. 10, p. 569-580, Aug 30 2011.

NIKIFOROV, Y. E.; ROWLAND, J. M.; BOVE, K. E.; MONFORTE-MUNOZ, H. *et al.* Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. **Cancer Res**, 57, n. 9, p. 1690-1694, May 1 1997.

NIKIFOROVA, M. N.; WALD, A. I.; ROY, S.; DURSO, M. B. *et al.* Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. **J Clin Endocrinol Metab**, 98, n. 11, p. E1852-1860, Nov 2013.

NILSSON, M.; DAHLMAN, T.; WESTERMARK, B.; WESTERMARK, K. Transforming growth factor-beta promotes epidermal growth factor-induced thyroid cell migration and follicle neof ormation in collagen gel separable from cell proliferation. **Exp Cell Res**, 220, n. 2, p. 257-265, Oct 1995.

NILSSON, M.; FAGMAN, H. Development of the thyroid gland. **Development**, 144, n. 12, p. 2123-2140, Jun 15 2017.

NING, F.; WANG, H. F.; GUO, Q.; LIU, Z. C. *et al.* Expression and significance of Nodal in human cancers: a meta-analysis. **Int J Clin Exp Med**, 8, n. 11, p. 20227-20235, 2015.

NORRIS, D. P.; ROBERTSON, E. J. Asymmetric and node-specific nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements. **Genes Dev**, 13, n. 12, p. 1575-1588, Jun 15 1999.

O'NEILL, J. P.; SHAHA, A. R. Anaplastic thyroid cancer. **Oral Oncol**, 49, n. 7, p. 702-706, Jul 2013.

PAPAGEORGIU, I.; NICHOLLS, P. K.; WANG, F.; LACKMANN, M. *et al.* Expression of nodal signalling components in cycling human endometrium and in endometrial cancer. **Reprod Biol Endocrinol**, 7, p. 122, Oct 29 2009.

PAUKLIN, S.; VALLIER, L. Activin/Nodal signalling in stem cells. **Development**, 142, n. 4, p. 607-619, Feb 15 2015.

PICCOLO, S.; AGIUS, E.; LEYNS, L.; BHATTACHARYYA, S. *et al.* The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. **Nature**, 397, n. 6721, p. 707-710, Feb 25 1999.

PISAREV, M. A.; THOMASZ, L.; JUVENAL, G. J. Role of transforming growth factor beta in the regulation of thyroid function and growth. **Thyroid**, 19, n. 8, p. 881-892, Aug 2009.

POSTOVIT, L. M.; MARGARYAN, N. V.; SEFTOR, E. A.; KIRSCHMANN, D. A. *et al.* Human embryonic stem cell microenvironment suppresses the tumorigenic phenotype of aggressive cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 11, p. 4329-4334, Mar 18 2008.

POSTOVIT, L. M.; SEFTOR, E. A.; SEFTOR, R. E.; HENDRIX, M. J. Targeting Nodal in malignant melanoma cells. **Expert Opin Ther Targets**, 11, n. 4, p. 497-505, Apr 2007.

POWELL, D. J., Jr.; RUSSELL, J.; NIBU, K.; LI, G. *et al.* The RET/PTC3 oncogene: metastatic solid-type papillary carcinomas in murine thyroids. **Cancer Res**, 58, n. 23, p. 5523-5528, Dec 1 1998.

QUAIL, D. F.; SIEGERS, G. M.; JEWER, M.; POSTOVIT, L. M. Nodal signalling in embryogenesis and tumourigenesis. **Int J Biochem Cell Biol**, 45, n. 4, p. 885-898, Apr 2013.

QUAIL, D. F.; TAYLOR, M. J.; POSTOVIT, L. M. Microenvironmental regulation of cancer stem cell phenotypes. **Curr Stem Cell Res Ther**, 7, n. 3, p. 197-216, May 2012.

QUAIL, D. F.; TAYLOR, M. J.; WALSH, L. A.; DIETERS-CASTATOR, D. *et al.* Low oxygen levels induce the expression of the embryonic morphogen Nodal. **Mol Biol Cell**, 22, n. 24, p. 4809-4821, Dec 2011.

QUAIL, D. F.; WALSH, L. A.; ZHANG, G.; FINDLAY, S. D. *et al.* Embryonic protein nodal promotes breast cancer vascularization. **Cancer Res**, 72, n. 15, p. 3851-3863, Aug 1 2012.

QUAIL, D. F.; ZHANG, G.; FINDLAY, S. D.; HESS, D. A. *et al.* Nodal promotes invasive phenotypes via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. **Oncogene**, 33, n. 4, p. 461-473, Jan 23 2014.

QUAIL, D. F.; ZHANG, G.; WALSH, L. A.; SIEGERS, G. M. *et al.* Embryonic morphogen nodal promotes breast cancer growth and progression. **PLoS One**, 7, n. 11, p. e48237, 2012.

RAYA, A.; KAWAKAMI, Y.; RODRIGUEZ-ESTEBAN, C.; BUSCHER, D. *et al.* Notch activity induces Nodal expression and mediates the establishment of left-right asymmetry in vertebrate embryos. **Genes Dev**, 17, n. 10, p. 1213-1218, May 15 2003.

RICARTE-FILHO, J. C.; RYDER, M.; CHITALE, D. A.; RIVERA, M. *et al.* Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. **Cancer Res**, 69, n. 11, p. 4885-4893, Jun 1 2009.

ROBERTSON, E. J. Dose-dependent Nodal/Smad signals pattern the early mouse embryo. **Semin Cell Dev Biol**, 32, p. 73-79, Aug 2014.

ROMEI, C.; CIAMPI, R.; FAVIANA, P.; AGATE, L. *et al.* BRAFV600E mutation, but not RET/PTC rearrangements, is correlated with a lower expression of both thyroperoxidase and sodium iodide symporter genes in papillary thyroid cancer. **Endocr Relat Cancer**, 15, n. 2, p. 511-520, Jun 2008.

ROMEI, C.; ELISEI, R. RET/PTC Translocations and Clinico-Pathological Features in Human Papillary Thyroid Carcinoma. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 3, p. 54, 2012.

ROSS, S.; HILL, C. S. How the Smads regulate transcription. **Int J Biochem Cell Biol**, 40, n. 3, p. 383-408, 2008.

RUPAIMOOLE, R.; SLACK, F. J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nat Rev Drug Discov**, 16, n. 3, p. 203-222, Mar 2017.

SAAD, A.; FALCIGLIA, M.; STEWARD, D. L.; NIKIFOROV, Y. E. Amiodarone-induced thyrotoxicosis and thyroid cancer: clinical, immunohistochemical, and molecular genetic studies of a case and review of the literature. **Arch Pathol Lab Med**, 128, n. 7, p. 807-810, Jul 2004.

SAIJOH, Y.; OKI, S.; TANAKA, C.; NAKAMURA, T. *et al.* Two nodal-responsive enhancers control left-right asymmetric expression of Nodal. **Dev Dyn**, 232, n. 4, p. 1031-1036, Apr 2005.

SCHIER, A. F. Nodal signaling in vertebrate development. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 19, p. 589-621, 2003.

SCHIER, A. F. Nodal morphogens. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 1, n. 5, p. a003459, Nov 2009.

SCHWARZ, F.; AEBI, M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. **Curr Opin Struct Biol**, 21, n. 5, p. 576-582, Oct 2011.

SHEN, M. M.; SCHIER, A. F. The EGF-CFC gene family in vertebrate development. **Trends Genet**, 16, n. 7, p. 303-309, Jul 2000.

SHI, W.; SUN, C.; HE, B.; XIONG, W. *et al.* GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. **J Cell Biol**, 164, n. 2, p. 291-300, Jan 19 2004.

SHI, Y.; MASSAGUE, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell**, 113, n. 6, p. 685-700, Jun 13 2003.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA Cancer J Clin**, 69, n. 1, p. 7-34, Jan 2019.

SIMON, P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. **Bioinformatics**, 19, n. 11, p. 1439-1440, Jul 22 2003.

SOARES, P.; TROVISCO, V.; ROCHA, A. S.; LIMA, J. *et al.* BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. **Oncogene**, 22, n. 29, p. 4578-4580, Jul 17 2003.

STRIZZI, L.; HARDY, K. M.; KIRSCHMANN, D. A.; AHRLUND-RICHTER, L. *et al.* Nodal expression and detection in cancer: experience and challenges. **Cancer Res**, 72, n. 8, p. 1915-1920, Apr 15 2012.

SUGG, S. L.; EZZAT, S.; ROSEN, I. B.; FREEMAN, J. L. *et al.* Distinct multiple RET/PTC gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia. **J Clin Endocrinol Metab**, 83, n. 11, p. 4116-4122, Nov 1998.

SUTHERLAND, R. M.; MCCREDIE, J. A.; INCH, W. R. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. **J Natl Cancer Inst**, 46, n. 1, p. 113-120, Jan 1971.

TABIBZADEH, S.; HEMMATI-BRIVANLOU, A. Lefty at the crossroads of "stemness" and differentiative events. **Stem Cells**, 24, n. 9, p. 1998-2006, Sep 2006.

TAKANO, T.; AMINO, N. Fetal cell carcinogenesis: a new hypothesis for better understanding of thyroid carcinoma. **Thyroid**, 15, n. 5, p. 432-438, May 2005.

TALLINI, G.; ASA, S. L. RET oncogene activation in papillary thyroid carcinoma. **Adv Anat Pathol**, 8, n. 6, p. 345-354, Nov 2001.

TOPCZEWSKA, J. M.; POSTOVIT, L. M.; MARGARYAN, N. V.; SAM, A. *et al.* Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. **Nat Med**, 12, n. 8, p. 925-932, Aug 2006.

VALLIER, L.; ALEXANDER, M.; PEDERSEN, R. A. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. **J Cell Sci**, 118, n. Pt 19, p. 4495-4509, Oct 1 2005.

VALLIER, L.; MENDJAN, S.; BROWN, S.; CHNG, Z. *et al.* Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. **Development**, 136, n. 8, p. 1339-1349, Apr 2009.

VINCI, M.; GOWAN, S.; BOXALL, F.; PATTERSON, L. *et al.* Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. **BMC Biol**, 10, p. 29, Mar 22 2012.

VO, B. T.; KHAN, S. A. Expression of nodal and nodal receptors in prostate stem cells and prostate cancer cells: autocrine effects on cell proliferation and migration. **Prostate**, 71, n. 10, p. 1084-1096, Jul 2011.

WAKEFIELD, L. M.; HILL, C. S. Beyond TGFbeta: roles of other TGFbeta superfamily members in cancer. **Nat Rev Cancer**, 13, n. 5, p. 328-341, May 2013.

WATABE, T.; MIYAZONO, K. Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. **Cell Res**, 19, n. 1, p. 103-115, Jan 2009.

WEISS, A.; ATTISANO, L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, 2, n. 1, p. 47-63, Jan-Feb 2013.

WU, M. Y.; HILL, C. S. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. **Dev Cell**, 16, n. 3, p. 329-343, Mar 2009.

XING, M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. **Nat Rev Cancer**, 13, n. 3, p. 184-199, Mar 2013.

XU, G.; ZHONG, Y.; MUNIR, S.; YANG, B. B. *et al.* Nodal induces apoptosis and inhibits proliferation in human epithelial ovarian cancer cells via activin receptor-like kinase 7. **J Clin Endocrinol Metab**, 89, n. 11, p. 5523-5534, Nov 2004.

YAKYMOVYCH, I.; YAKYMOVYCH, M.; HELDIN, C. H. Intracellular trafficking of transforming growth factor beta receptors. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, 50, n. 1, p. 3-11, Jan 1 2018.

YANG, C. M.; CHIBA, T.; BRILL, B.; DELIS, N. *et al.* Expression of the miR-302/367 cluster in glioblastoma cells suppresses tumorigenic gene expression patterns and abolishes transformation related phenotypes. **Int J Cancer**, 137, n. 10, p. 2296-2309, Nov 15 2015.

YEO, C.; WHITMAN, M. Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms. **Mol Cell**, 7, n. 5, p. 949-957, May 2001.

YOO, Y. D.; CHOI, J. Y.; LEE, S. J.; KIM, J. S. *et al.* TGF-beta-induced cell-cycle arrest through the p21(WAF1/CIP1)-G1 cyclin/Cdks-p130 pathway in gastric-carcinoma cells. **Int J Cancer**, 83, n. 4, p. 512-517, Nov 12 1999.

ZAWEL, L.; DAI, J. L.; BUCKHAULTS, P.; ZHOU, S. *et al.* Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. **Mol Cell**, 1, n. 4, p. 611-617, Mar 1998.

ZHANG, S.; FEI, T.; ZHANG, L.; ZHANG, R. *et al.* Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation. **Mol Cell Biol**, 27, n. 12, p. 4488-4499, Jun 2007.

ZHANG, Y. E. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF-beta Family. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 9, n. 2, Feb 1 2017.

ZHONG, Y.; XU, G.; YE, G.; LEE, D. *et al.* Nodal and activin receptor-like kinase 7 induce apoptosis in human breast cancer cell lines: Role of caspase 3. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol**, 1, n. 1, p. 83-96, Feb 27 2009.