

Cesar Seigi Fuziwara

**Influência do MicroRNA let-7 e miR-17-92
como oncomiRs no câncer**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Edna Teruko Kimura

São Paulo
2010

RESUMO

Fuziwara CS. Influência do MicroRNA *let-7* e *miR-17-92* como oncomiRs no câncer [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

No câncer, a alteração na expressão de microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs de ~22nt que regulam pós-transcricionalmente a tradução protéica, exerce efeito oncogênico na célula (oncomiR). Os oncomiRs atuam na regulação de genes chave para a proliferação celular e apoptose, tornando interessante seu estudo para entendimento da biologia do câncer. O carcinoma papilífero de tiróide apresenta alterações genéticas ativadoras alinhadas na via de sinalização MAPK (RET>RAS>BRAF>ERK). Observamos que a indução do oncogene *RET/PTC* diminui a expressão de *let-7* em células foliculares tiroideas. Na linhagem de carcinoma papilífero TPC-1, que expressa *RET/PTC-1*, a introdução de *let-7* diminui a proliferação celular assim como reduz a fosforilação de ERK, indicando papel de gene supressor tumoral para este miRNA. No carcinoma anaplásico, avaliamos o papel da introdução do cluster *miR-17-92*, composto por sete miRNAs diferentes, na linhagem ARO. Observamos que *in vitro* *miR-17-92* atua de forma oncogênica aumentando a proliferação e viabilidade de células ARO. No entanto, estas células apresentam diminuição no crescimento em soft-agar. No xenotransplante, os tumores derivados de ARO-*miR-17-92* apresentam menor volume e expressam MMP-9 de forma reduzida, indicando também um papel de gene supressor tumoral para o cluster. Desta forma mostramos que os miRNAs podem exercer influência importante no comportamento biológico do câncer.

Palavras-chave: Câncer de tiróide. MicroRNA. Let-7. RET/PTC. MiR-17-92.

Proliferação. Diferenciação.

ABSTRACT

Fuziwara CS. Influence of MicroRNA *let-7* and miR-17-92 as oncomiRs in cancer [dissertation (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

In cancer, alteration in microRNA (miRNA) expression, small RNAs (~22nt) that regulate post-transcriptionally protein levels, exerts oncogenic roles within the cell (oncomiR). OncomiRs regulate genes involved in cell proliferation and apoptosis and contribute to cancer cell biology. Papillary thyroid cancer displays activating genetic alterations aligned in MAPK signaling pathway (RET>RAS>BRAF>ERK). Using conditional induction of oncogenes in thyroid follicular cells, we observed that only *RET/PTC* decreases *let-7* miRNA expression. In the papillary thyroid cancer cell line TPC-1, harboring *RET/PTC-1* oncogene, we observed that *let-7* introduction exerts inhibitory effect in cell proliferation and reduces ERK phosphorylation, indicating a tumor suppressor role for *let-7*. In anaplastic thyroid cancer, we evaluate the role of introduction of miR-17-92 cluster, composed of seven distinct miRNAs, in ARO cell line. We observed *in vitro* that miR-17-92 increases cell proliferation and viability of ARO cell, acting as an oncogene. However, these cells show impaired soft agar growth. In xenotransplant, ARO-miR-17-92 tumors smaller in volume and express reduced levels of MMP-9, indicating a tumor suppressor role for the cluster. Thus, we showed that miRNAs may exert important influence in biological behavior of cancer.

Keywords: Thyroid cancer. MicroRNA. *Let-7*. *RET/PTC*. MiR-17-92. Proliferation. Differentiation.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o câncer pode ser definido como um processo complexo que resulta do acúmulo de alterações genéticas em oncogenes, genes supressores de tumor e na classe dos microRNAs (1). Os microRNAs (miRNAs) constituem uma classe recém descrita de reguladores pós-transcricionais da expressão gênica composta por pequenos RNAs endógenos (~22 nucleotídeos) não-codificantes (2). A atuação dos miRNAs como oncogenes e genes supressores tumorais, através da regulação de processos como apoptose e proliferação celular, indica uma participação importante destes pequenos RNAs na patogênese do câncer (3). Desta forma o estudo da influência dos miRNAs na tumorigênese do câncer de tiróide pode contribuir no entendimento da biologia do câncer.

1.1 MiRNAs

O primeiro miRNA, *lin-4*, foi descoberto em 1993, sendo inicialmente descrito como stRNA (do inglês *small temporal RNA*) por ser expresso de forma transiente, e regular temporalmente o desenvolvimento de *Caenorhabditis elegans* (4). O mecanismo de atuação dos miRNAs, no momento de sua descoberta, foi associado à atividade antisense de *lin-4* que inibia a expressão de *lin-14* (4). Entretanto, hoje reconhece-se que os miRNAs atuam ligando-se à região 3' não traduzida (UTR) dos mRNAs alvo, inibindo a tradução protéica (5).

A biogênese dos miRNAs encontra-se esquematizada na Figura 1. Inicialmente, os miRNAs são transcritos a partir de seus genes pela RNA polimerase II formando longos transcritos primários (pri-miRNA) contendo cap 5' e cauda poli(A). O pri-miRNA é processado ainda no núcleo pela DROSHA, uma enzima RNase III, formando um segmento de cerca de 70 nucleotídeos em forma de grampo (*hairpin*), precursor do miRNA

(pre-miRNA). Este é exportado do núcleo para o citoplasma pelo complexo Exportina-5/Ran-GTP, onde sofre novo processamento por outra RNase III, DICER, gerando um duplex miRNA:miRNA, com 18 a 25 nucleotídeos de comprimento. Em seguida, o duplex se associa ao complexo multiprotéico RISC (do inglês *RNA-induced silencing complex*), retendo somente a fita madura do miRNA, que direciona a ligação à região 3' não traduzida dos mRNAs alvos (5).

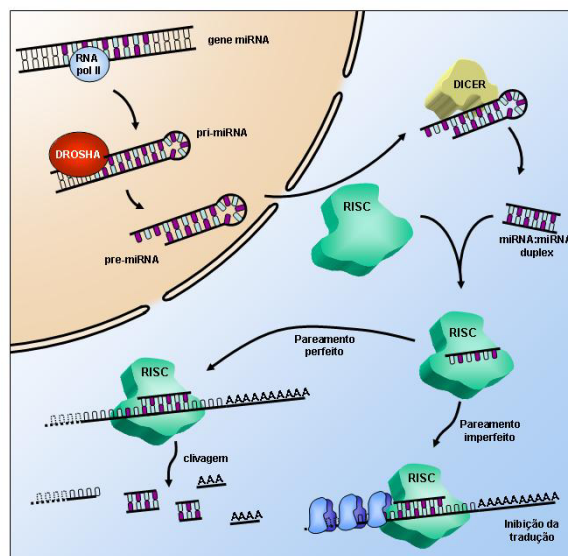


Figura 1. Biogênese do miRNA. Após sua transcrição pela enzima RNA polimerase II, o transcrito primário do miRNA (pri-miRNA) é clivado pela enzima RNase III DROSHA ainda no núcleo, gerando, assim, um transcrito menor, em forma de grampo (pre-miRNA). O pre-miRNA é exportado ao citoplasma e processado pela enzima DICER, gerando transcritos de fita dupla (miRNA:miRNA). A incorporação deste duplex miRNA:miRNA ao complexo RISC libera uma das fitas do transcrito, deixando a outra incorporada ao complexo. Assim, o pareamento perfeito desta sequência madura do miRNA com o mRNA alvo provocará a degradação do mesmo. Já o pareamento imperfeito provocará o impedimento da tradução.

Fonte: Desenho por Murilo Geraldo.

Os miRNAs regulam negativamente a expressão de mRNAs num mecanismo que depende do grau de complementaridade entre o miRNA e seus mRNAs alvo. Quando ocorre o

pareamento perfeito ou próximo ao perfeito do miRNA com a sequência codificadora de proteína do mRNA, a via de interferência de RNA (RNAi) é ativada resultando na clivagem do mRNA alvo por ribonucleases associadas ao complexo RISC, mecanismo este comumente encontrado em plantas (6). Apesar desta atuação ter sido descrita em mamíferos, a maioria dos miRNAs encontrados em animais atua por um segundo mecanismo que não envolve a degradação do mRNA alvo (7). Assim, os miRNAs regulam a expressão gênica por pareamento imperfeito com a região 3' UTR resultando na inibição da tradução. O pareamento imperfeito possibilita que um único miRNA regule a expressão de vários mRNAs alvo diferentes e ainda, que diferentes miRNAs controlem de cooperativamente a expressão de um único mRNA alvo. Conseqüentemente, a combinação única de miRNAs expressos em cada tipo celular pode regular de forma específica a tradução de inúmeros mRNAs, configurando, assim, uma complexa rede regulatória exercida pelos miRNAs (8).

1.2 MiRNAs e câncer

A conservação dos miRNAs entre espécies animais de classes distintas, como vertebrados e ascídios, mostra um importante papel dos miRNAs nos processos biológicos como diferenciação e desenvolvimento e também nos processos patológicos como o câncer (9, 10). Os miRNAs que participam de processos importantes no câncer são denominados oncomiRs (3, 10). A alteração da expressão de um oncomiR pode contribuir para a tumorigênese basicamente de duas maneiras: (i) quando um oncomiR que controla um oncogene apresentar expressão reduzida ou (ii) quando um oncomiR que controla um gene supressor tumoral se apresentar super-expresso (figura 2)

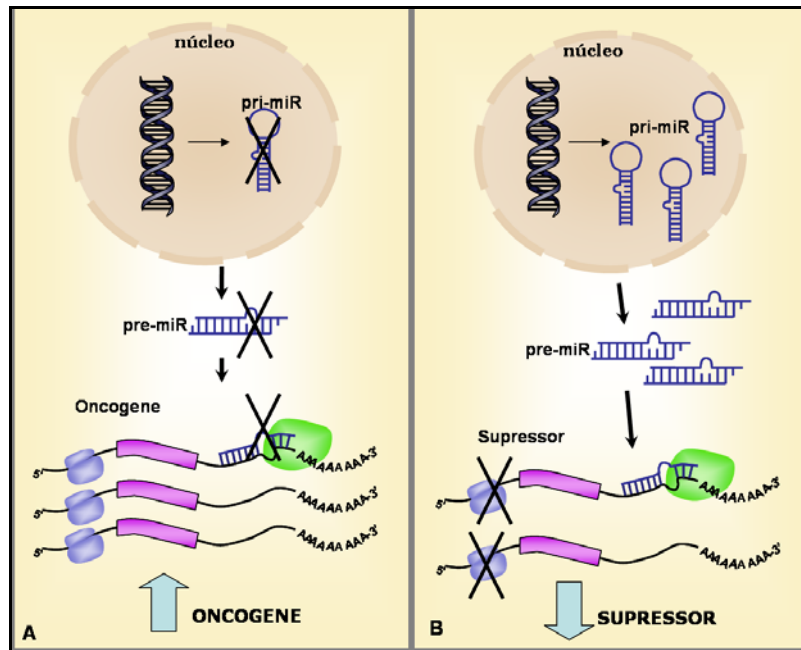


Figura 2. OncomiRs: miRNAs com papel no câncer. A diminuição da expressão de um oncomiR responsável por regular um oncogene atua de forma oncogênica à medida que aumenta a tradução deste oncogene (A); da mesma forma, o aumento da expressão de um oncomiR responsável por regular um gene supressor tumoral diminui a tradução da proteína supressora tumoral, e atua de forma oncogênica. Fonte: Figura adaptada de Esquela-Kerscher e Slack (2006) (3) por Murilo Geraldo.

Um estudo recente mostrou que cerca de 50% dos miRNAs descritos em humanos estão localizados em áreas do genoma conhecidas como sítios frágeis associados ao câncer, que incluem regiões de perda de heterozigotidade, ampliações e quebras cromossômicas (11).

Outros estudos abordando miRNAs no câncer mostraram uma assinatura característica de expressão de miRNAs nos tecidos tumorais em relação aos seus respectivos tecidos normais, de forma que os miRNAs se tornam eficientes marcadores para diagnóstico de tumores (12). Interessante notar, que na época desta publicação eram reconhecidos cerca de 300 miRNAs, sendo que no estudo foram analisados cerca de 200 miRNAs. Atualmente,

este número está próximo de 1000 miRNAs descritos, indicando enorme potencialidade dos miRNAs como ferramentas para estudo e detecção do câncer (13). Apesar disto, uma das grandes dificuldades do estudo dos miRNAs reside no fato de os miRNAs atuarem de forma pleiotrópica e a predição de alvos potenciais através de ferramentas de bioinformática mostrarem que um único miRNA pode regular a tradução de centenas de mRNA alvo (13-15).

Let-7 (do inglês *lethal-7*) foi o segundo stRNA descrito em *C.elegans* e primeiro miRNA descrito em mamíferos (16, 17). A família de miRNAs let-7 (do let-7a ao let-7i) é codificada por treze loci gênicos localizados em diferentes cromossomos (18). Entretanto, let-7 ganhou reconhecimento da comunidade científica por ser o primeiro miRNA a ter um alvo com função importante no câncer descoberto (19). Neste estudo importante, foi mostrado que isoformas do oncogene RAS apresentavam sítios múltiplos e potenciais para a ligação de let-7 na região 3`UTR do mRNA, podendo sofrer regulação deste miRNA. A descrição do mecanismo de *let-7* controlando os níveis protéicos do oncogene RAS (20) foi um marco no entendimento da influência dos miRNAs na tumorigênese. Num estudo clínico sobre papel de let-7 no câncer de pulmão, associou-se a diminuição deste miRNA com pior prognóstico, e ainda mostrou-se que a introdução de let-7 diminui o crescimento da linhagem A549 de adenocarcinoma de pulmão *in vitro*, indicando a potencialidade deste miRNA como gene supressor tumoral (19).

Na mesma época, outros miRNAs estavam sendo estudados no câncer. Dentre estes miRNAs destaca-se o *cluster* miR-17-92 localizado na região cromossômica 13q31, comumente amplificada em linfomas de células B (21). O *cluster* miR-17-92 é composto por sete miRNAs diferentes (miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b e miR-92-1) e está localizado em um íntron do gene C13orf25 (ou *MIRHG –miR17 host gene*

-non-protein coding) no cromossomo 13 (figura 3).

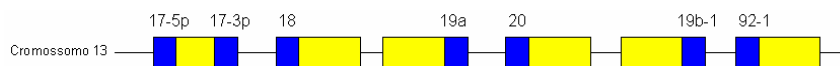


Figura 3. Cluster miR-17-92. Figura representativa da disposição dos miRNA que compõem o *cluster* miR-17-92 na região intrônica do gene C13orf25

Um estudo de perfil de expressão de miRNAs por microarray abrangendo 540 amostras (363 tumorais e 177 normais) de seis tipos de tumores sólidos (côlon, mama, próstata, pulmão, estômago e pâncreas) revelou que a expressão de *miR-21*, *miR-106a*, *miR-155* e de *miR-17-5p*, *miR-20a* e *miR-92*, componentes do *cluster* miR-17-92, encontra-se alterada num amplo espectro de tumores em relação ao tecido normal (22).

Alguns trabalhos sugerem atuação oncogênica do *cluster*, uma vez que a expressão de miR-17-92 está aumentada em diversos tipos de câncer, entre eles o câncer de pulmão e linfoma, especialmente nas formas mais agressivas (21, 23). Entretanto, outros estudos mostram que componentes do *cluster* podem regular a tradução de proteínas importantes relacionadas à progressão do ciclo celular como E2F1 e RB, sugerindo um papel de gene supressor tumoral (24, 25).

1.3 Câncer de tiróide

O câncer de tiróide é a neoplasia mais freqüente do sistema endócrino ocorrendo principalmente em jovens e adultos de meia idade com predominância nas mulheres (15,2 casos para 100.000 mulheres/ 5,2 casos para 100.000 homens) (26, 27). Os carcinomas

derivados da célula folicular tiroídiana podem ser divididos em três histotipos: (i) o carcinoma papilífero (~86% dos casos); (ii) o carcinoma folicular (7%) e (iii) o carcinoma anaplásico (2%) (27, 28). Os tumores diferenciados, carcinoma papilífero e folicular, apresentam prognóstico bastante favorável e alta taxa de cura através da excisão cirúrgica dos tumores associada à radioiodoterapia (^{131}I) (29). Por outro lado, para o carcinoma indiferenciado ou anaplásico o tratamento se torna mais complexo pois a cirurgia deve considerar o estágio em que o tumor se encontra e a presença de metástases à distância, assim como o fato desses tumores apresentarem refratariedade à radioiodoterapia e a outros tratamentos não convencionais no câncer de tiróide como quimioterapia e radioterapia externa (30).

No câncer de tiróide, alterações na via MAPK (do inglês *Mitogen Activated Protein Kinase*) como rearranjos no gene *RET* (*RET/PTC*) e mutações em *RAS* e *BRAF*, ativam de forma constitutiva a via (*RET*>*RAS*>*BRAF*>*ERK*) (figura 4).

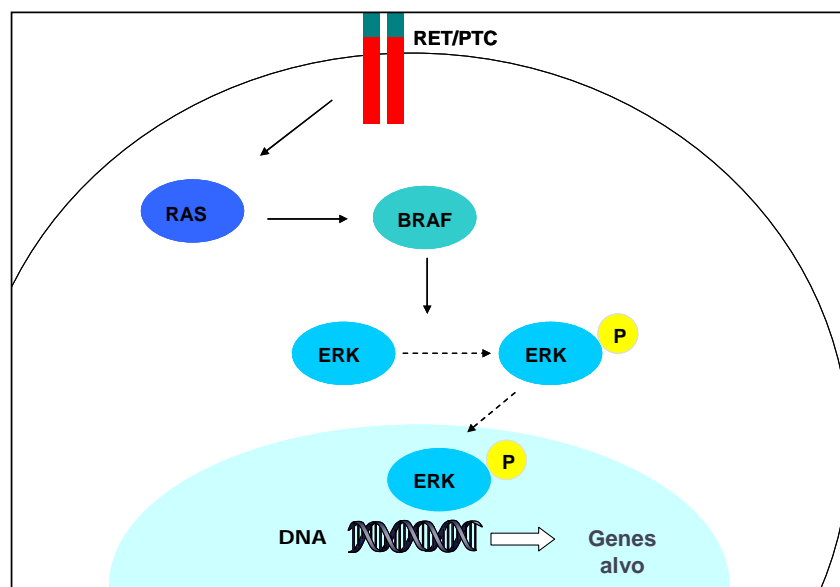


Figura 4. Via de sinalização MAPK. Figura esquemática da via mostrando seus principais componentes. O gene *RET* está representado como o rearranjo *RET/PTC*, alteração encontrada no carcinoma papilífero assim como mutações em *RAS* e *BRAF*, que ativam a via de forma constitutiva, induzindo a transcrição de genes alvo da sinalização proliferativa.

Estes eventos genéticos na via MAPK são detectados em mais de 70% dos casos de carcinoma papilífero, sem que haja sobreposição de alterações nos componentes da via (31). O receptor de membrana RET normalmente não é expresso em células foliculares tiroidianas, entretanto, a ocorrência de rearranjos cromossômicos, caracterizados pela fusão do domínio tirosino-quinase de RET com a porção N-terminal de genes heterólogos induz a expressão de proteínas quiméricas RET/PTC (32-34). Os rearranjos *RET/PTC* estão presentes em cerca de 16% dos carcinomas papilíferos (31, 35). Da mesma forma, as mutações pontuais em *RAS* e *BRAF* ativam a via MAPK, entretanto, cada alteração genética está associada a carcinomas com características histológicas e comportamento biológico distintos (36). A mutação de *BRAF*^{T1799A} é a mais prevalente no carcinoma papilífero de tiróide, sendo detectada em mais de 40% dos casos, e está associada às variantes do tipo clássico e célula-alta, além de pior prognóstico clínico (31, 37-41). Por outro lado, as mutações em *RAS* não são restritas a um subtipo, podendo ser encontradas em carcinomas papilíferos e foliculares, e também nos carcinomas indiferenciados (42).

A patogênese molecular do carcinoma anaplásico de tiróide ainda permanece pouco conhecida, no entanto acredita-se que este tipo de câncer possa surgir a partir de carcinoma papilífero ou folicular pré-existente ou num mecanismo *de novo*. A alteração genética mais importante do carcinoma anaplásico parece ser a mutação no gene supressor tumoral *TP53*, que codifica a proteína P53. Esta mutação encontra-se presente em mais de 50% dos carcinomas anaplásicos e pode estar associada ao comportamento mais agressivo deste histotipo tumoral, uma vez que a proteína P53 é de fundamental importância nos processos de resposta a danos no DNA e controle do ciclo celular (43, 44). Além de *TP53*, outras alterações genéticas foram detectadas neste tipo de câncer e podem estar localizadas na via MAPK, como *RAS* e *BRAF*, assim como nas vias PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) e AKT (45). As

mutações na via PI3K como em *PIK3CA* e *PTEN* são mais frequentes no carcinoma anaplásico (~12% dos casos) do que papilífero (~2%). Além disso, também foram detectadas mutações em *AKT1* (~16%) em carcinomas pouco diferenciados, metastáticos e refratários à radioiodoterapia (46), indicando que mutações nestas vias podem estar associadas a progressão tumoral para fases avançadas (47).

As alterações na expressão de miRNAs foram associadas a diversos tipos de câncer (1). No câncer de tiróide, dois estudos pioneiros revelaram o perfil de expressão de miRNAs no carcinoma papilífero (48, 49). Dentre os miRNAs diferencialmente expressos observou-se aumento considerável na expressão de *miR-221*, *miR-222* e *miR-146* (48) e diminuição de *miR-151*, *miR-148* e *let-7f* (49). Johnson et al. mostraram que *let-7* pode regular os níveis protéicos do oncogene RAS, importante para a transdução do sinal na via de sinalização MAPK (31). De forma que *let-7* poderia potencialmente exercer influência na via MAPK, importante via oncogênica no câncer de tiróide.

No carcinoma anaplásico de tiróide, um estudo recente revelou alteração no perfil de expressão de miRNAs em relação ao tecido normal (50). Dentre os miRNAs desregulados, observou-se redução de *miR-30d*, *miR-125-b1*, *miR-26a*, *miR-125b-2*, *miR-30a-5p* e *miR-92-1* e *miR-92-2*, entre outros. MiR-92 é um dos componentes do *cluster* miR-17-92 e a perda de sua expressão no carcinoma anaplásico poderia atuar de forma oncogênica e participar na progressão tumoral do câncer de tiróide.

6 CONCLUSÕES

- A indução do oncogene *RET/PTC* reduz a expressão de *let-7* em células foliculares tiroidianas, e sua introdução em linhagem de carcinoma papilífero TPC-1 que expressa *RET/PTC* diminui a proliferação celular e atenua a ativação da via MAPK, indicando que a perda de expressão de *let-7* seria um evento importante na transformação maligna mediada pelo oncogene;
- A introdução do *cluster* miR-17-92 em células ARO atua de forma oncogênica *in vitro*, alterando a proliferação e viabilidade celular, enquanto que *in vivo* o *cluster* interfere no crescimento tumoral e exerce função de supressor tumoral, indicando influência do micro-ambiente tumoral na função do *cluster*;
- Neste estudo mostramos que oncomiRs, miRNAs com papel no câncer modulam a biologia de células tumorais, e assim, apresentam-se como potenciais alvos na terapia coadjuvante do câncer no futuro.

REFERÊNCIAS*

1. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008;358(5):502-11.
2. Ricarte Filho JC, Kimura ET. [MicroRNAs: novel class of gene regulators involved in endocrine function and cancer]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50(6):1102-7.
3. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):259-69.
4. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
5. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376-85.
6. Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*. 2002;297(5589):2053-6.
7. Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 2004;304(5670):594-6.
8. Bartel DP, Chen CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet*. 2004;5(5):396-400.
9. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie JC, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-6.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22]

10. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 2007;302(1):1-12.
11. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(9):2999-3004.
12. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435(7043):834-8.
13. University of Manchester. MiRBase: the microRNA database [homepage on the internet]. Disponível em: <http://mirbase.org>. [2010 jul 15].
14. Massachusetts Insitute of Technology. Target Scan Human. Disponível em: <http://targetscan.org>. [2010 jul 15].
15. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. MicroRNA.org: a resource for predicted microRNA targets and expression. Disponível em: <http://microrna.org>. [2010 jul 15].
16. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 2000;408(6808):86-9.
17. Grosshans H, Slack FJ. Micro-RNAs: small is plentiful. *J Cell Biol.* 2002;156(1):17-21.
18. Bussing I, Slack FJ, Grosshans H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends Mol Med.* 2008;14(9):400-9.
19. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 2004;64(11):3753-6.
20. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 2005;120(5):635-47.
21. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, et al. A microRNA polycistron

- as a potential human oncogene. *Nature*. 2005;435(7043):828-33.
22. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(7):2257-61.
 23. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res*. 2005;65(21):9628-32.
 24. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 2005;435(7043):839-43.
 25. Takakura S, Mitsutake N, Nakashima M, Namba H, Saenko VA, Rogounovitch TI, et al. Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells. *Cancer Sci*. 2008;99(6):1147-54.
 26. DeLellis RA LR, Heitz PU, Eng C. World health classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of endocrine glands. 2000:IARC Press.
 27. Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007. 2010;National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/, based on November 2009 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2010.
 28. Carvalho GA, Graf H. [Anaplastic thyroid carcinoma]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005;49(5):719-24.
 29. Schlumberger MJ. Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Eng J Med*. 1998;338(5):297-306.
 30. Pittas AG, Adler M, Fazzari M, Tickoo S, Rosai J, Larson SM, et al. Bone metastases from thyroid carcinoma: clinical characteristics and prognostic variables in one hundred forty-six patients. *Thyroid*. 2000;10(3):261-8.
 31. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. 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.* 2003;63(7):1454-7.
32. Jhiang SM, Caruso DR, Gilmore E, Ishizaka Y, Tahira T, Nagao M, et al. Detection of the PTC/retTPC oncogene in human thyroid cancers. *Oncogene.* 1992;7(7):1331-7.
 33. Santoro M, Dathan NA, Berlingieri MT, Bongarzone I, Paulin C, Grieco M, et al. Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene.* 1994;9(2):509-16.
 34. Pierotti MA, Santoro M, Jenkins RB, Sozzi G, Bongarzone I, Grieco M, et al. Characterization of an inversion on the long arm of chromosome 10 juxtaposing D10S170 and RET and creating the oncogenic sequence RET/PTC. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(5):1616-20.
 35. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene.* 2003;22(29):4578-80.
 36. Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P. New insights in thyroid follicular cell biology and its impact in thyroid cancer therapy. *Endocr Relat Cancer.* 2007;14(4):957-77.
 37. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(11):5399-404.
 38. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(9):4393-7.
 39. Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(12):6373-9.

40. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12(2):245-62.
41. Riesco-Eizaguirre G, Gutierrez-Martinez P, Garcia-Cabezas MA, Nistal M, Santisteban P. The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(1):257-69.
42. Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P. Molecular biology of thyroid cancer initiation. *Clin Transl Oncol*. 2007;9(11):686-93.
43. Donghi R, Longoni A, Pilotti S, Michieli P, Della Porta G, Pierotti MA. Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *J Clin Invest*. 1993;91(4):1753-60.
44. Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest*. 1993;91(1):179-84.
45. Smallridge RC, Marlow LA, Copland JA. Anaplastic thyroid cancer: molecular pathogenesis and emerging therapies. *Endocr Relat Cancer*. 2009;16(1):17-44.
46. Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi 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*. 2009;69(11):4885-93.
47. Paes JE, Ringel MD. Dysregulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in thyroid neoplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37(2):375-87, viii-ix.
48. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(52):19075-80.
49. Pallante P, Visone R, Ferracin M, Ferraro A, Berlingieri MT, Troncone G, et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(2):497-508.

50. Visone R, Pallante P, Vecchione A, Cirombella R, Ferracin M, Ferraro A, et al. Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. *Oncogene*. 2007;26(54):7590-5.
51. Ricarte-Filho JC, Fuziwara CS, Yamashita AS, Rezende E, da-Silva MJ, Kimura ET. Effects of let-7 microRNA on Cell Growth and Differentiation of Papillary Thyroid Cancer. *Transl Oncol*. 2009;2(4):236-41.
52. Wang J, Knauf JA, Basu S, Puxeddu E, Kuroda H, Santoro M, et al. Conditional expression of RET/PTC induces a weak oncogenic drive in thyroid PCCL3 cells and inhibits thyrotropin action at multiple levels. *Mol Endocrinol*. 2003;17(7):1425-36.
53. Schweppe RE, Klopper JP, Korch C, Pugazhenthii U, Benezra M, Knauf JA, et al. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11):4331-41.
54. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
55. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.
56. Raymond CK, Roberts BS, Garrett-Engele P, Lim LP, Johnson JM. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. *RNA*. 2005;11(11):1737-44.
57. Petersen M, Wengel J. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol*. 2003;21(2):74-81.
58. Knauf JA, Kuroda H, Basu S, Fagin JA. RET/PTC-induced dedifferentiation of thyroid cells is mediated through Y1062 signaling through SHC-RAS-MAP kinase. *Oncogene*. 2003;22(28):4406-12.
59. Knauf JA, Ma X, Smith EP, Zhang L, Mitsutake N, Liao XH, et al. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that

- undergo dedifferentiation. *Cancer Res.* 2005;65(10):4238-45.
60. Mesa C, Jr., Mirza M, Mitsutake N, Sartor M, Medvedovic M, Tomlinson C, et al. Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling. *Cancer Res.* 2006;66(13):6521-9.
 61. Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C, Jr., Zhang L, Fagin JA. Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. *Cancer Res.* 2005;65(6):2465-73.
 62. Cahill S, Smyth P, Denning K, Flavin R, Li J, Potratz A, et al. Effect of BRAFV600E mutation on transcription and post-transcriptional regulation in a papillary thyroid carcinoma model. *Mol Cancer.* 2007;6:21.
 63. Cahill S, Smyth P, Finn SP, Denning K, Flavin R, O'Reagan EM, et al. Effect of ret/PTC 1 rearrangement on transcription and post-transcriptional regulation in a papillary thyroid carcinoma model. *Mol Cancer.* 2006;5:70.
 64. Dong Q, Meng P, Wang T, Qin W, Qin W, Wang F, et al. MicroRNA let-7a inhibits proliferation of human prostate cancer cells in vitro and in vivo by targeting E2F2 and CCND2. *PLoS One.* 2010;5(4):e10147.
 65. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Miyogi T, Hosui A, et al. The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2010;52(5):698-704.
 66. Zhao Y, Deng C, Wang J, Xiao J, Gatalica Z, Recker RR, et al. Let-7 family miRNAs regulate estrogen receptor alpha signaling in estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010.
 67. Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Seignani C, Wentzel E, et al. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet.* 2006;38(9):1060-5.
 68. Lu Y, Thomson JM, Wong HY, Hammond SM, Hogan BL. Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung

epithelial progenitor cells. *Dev Biol.* 2007;310(2):442-53.

69. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 141(1):52-67.
70. Maeta H, Ohgi S, Terada T. Protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in papillary thyroid carcinomas. *Virchows Arch.* 2001;438(2):121-8.
71. Fiore AP, ZP RFJ, Raimundo SG, Kimura ET. Smurfs, TGF β pathway regulation ubiquitin ligases, are highly expressed in papillary thyroid carcinoma. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53:157.
72. Kimura ET, Matsuo SE, Ricarte-Filho JC. [TGF β , activin and SMAD signalling in thyroid cancer]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007;51(5):683-9.
73. Matsuo SE, Fiore AP, Siguematu SM, Ebina KN, Friguglietti CU, Ferro MC, et al. Expression of SMAD proteins, TGF β /activin signaling mediators, in human thyroid tissues. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010;54(4):406-12.
74. Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JA. Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocr Rev.* 2003;24(5):600-32.
75. Hua Z, Lv Q, Ye W, Wong CK, Cai G, Gu D, et al. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS One.* 2006;1:e116.
76. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, et al. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science.* 2009;324(5935):1710-3.
77. Doebele C, Bonauer A, Fischer A, Scholz A, Reiss Y, Urbich C, et al. Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Blood.* 115(23):4944-50.
78. Taguchi A, Yanagisawa K, Tanaka M, Cao K, Matsuyama Y, Goto H, et al. Identification of hypoxia-inducible factor-1 alpha as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster. *Cancer*

Res. 2008;68(14):5540-5.

79. Shan SW, Lee DY, Deng Z, Shatseva T, Jeyapalan Z, Du WW, et al. MicroRNA MiR-17 retards tissue growth and represses fibronectin expression. *Nat Cell Biol.* 2009; 11(8):1031-8.
80. Hossain A, Kuo MT, Saunders GF. Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol.* 2006;26(21):8191-201.
81. Yu Z, Willmarth NE, Zhou J, Katiyar S, Wang M, Liu Y, et al. microRNA 17/20 inhibits cellular invasion and tumor metastasis in breast cancer by heterotypic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.*107(18):8231-6.
82. Chen TR, Drabkowski D, Hay RJ, Macy M, Peterson W, Jr. WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29. *Cancer Genet Cytogenet.* 1987;27(1):125-34.
83. American Type Culture Collection :ATCC. Disponível em: <http://atcc.org>. [2010 jul 15].
84. Zito G, Richiusa P, Bommarito A, Carissimi E, Russo L, Coppola A, et al. In vitro identification and characterization of CD133(pos) cancer stem-like cells in anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *PLoS ONE.* 2008;3(10):e3544.
85. Landriscina M, Fabiano A, Altamura S, Bagala C, Piscazzi A, Cassano A, et al. Reverse transcriptase inhibitors down-regulate cell proliferation in vitro and in vivo and restore thyrotropin signaling and iodine uptake in human thyroid anaplastic carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(10):5663-71.
86. Omary MB, Ku NO, Strnad P, Hanada S. Toward unraveling the complexity of simple epithelial keratins in human disease. *J Clin Invest.* 2009;119(7):1794-805.
87. Moll R, Lowe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol.* 1992;140(2):427-47.
88. Augeron C, Laboisie CL. Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res.*

1984;44(9):3961-9.

89. Rezende E. Estudo da expressão de Arkadia, proteína E3 de ubiquitinação, em tumores de tiróide e sua relação com a via de sinalização de TGF·Beta. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009. 71 f.