Júlio Cezar Marques Ricarte Filho

Envolvimento dos oncogenes *BRAF*, *PIK3CA* e *AKT1* e do microRNA supressor de tumor let-7 na transformação maligna e progressão tumoral tiroidiana

Tese 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 Doutor em Ciências.

São Paulo

2009

Júlio Cezar Marques Ricarte Filho

**Envolvimento dos oncogenes *BRAF*, *PIK3CA* e *AKT1* e
do microRNA supressor de tumor let-7 na
transformação maligna e progressão tumoral tiroidiana**

*Tese 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 Doutor em Ciências.*

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Edna Teruko Kimura

São Paulo

2009

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

© reprodução total

Ricarte-Filho, Júlio César Marques.

Envolvimento dos oncogenes *BRAF*, *PIK3CA* e *AKT1* e do microRNA supressor de tumor let-7 na transformação maligna e progressão tumoral tireoidiana / Júlio César Marques Ricarte-Filho. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Edna Teruko Kimura.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Mecanismo molecular no câncer de tireóide.

Versão do título para o inglês: Involvement of BRAF, PIK3CA and AKT1 oncogenes and let-7 tumor supressor gene in malignant transformation and progression of thyroid cancer .

Descritores: 1. Câncer tireóide 2. Genotipagem por espectrometria de massa 3. *BRAF* 4. *AKT1* 5. RET/PTC 6. MicroRNA let-7 I. Kimura, Edna Teruko II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB087/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Júlio César Marques Ricarte-Filho.

Título da Tese: Envolvimento dos oncogenes *BRAF*, *PIK3CA* e *AKT1* e do
microRNA supressor de tumor let-7 na transformação
maligna e progressão tumoral tireoidiana.

Orientador(a): Edna Teruko Kimura.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2416 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **73** nas fls. **8** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Edna Teruko Kimura, Coordenadora da Linha de Pesquisa "**Controle da Proliferação da célula folicular da tireóide e câncer**" do qual participou o(s) aluno(s): **Silvia Emiko Matsuo, Suzana Garcia Leoni, Júlio Cezar Marques Ricarte Filho, Luciane Martins e Kátia Naomi Ebina**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **28.09.2004**.

São Paulo, 28 de setembro de 2004

Prof. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 020 nas fls. 43 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Júlio Cezar Marques Ricarte Filho** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**MicroRNAs em câncer de Tiróide**" do qual participou(aram) o(s) alunos **César Seiji Fuziwara, Daniela Martins, Murilo Vieira Geraldo e a pesquisadora Edna Teruko Kimura**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **17.04.2007**.

São Paulo, 17 de abril de 2007.

Prof. Dr. **UBIRATAN FABRES MACHADO**
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. **PATRÍCIA GAMA**
Secretária -Suplente
CEEA - ICB/USP

Aos meus pais Júlio e Heloisa

Obrigado pelo apoio, amor, valores e educação.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora, incentivadora e amiga Dra. Edna Kimura pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela difusão de seus conhecimentos, conselhos e pela dedicação depositada durante toda a fase do meu doutorado e amadurecimento científico.

Aos amigos do laboratório: Sílvia, Kátia, Denise, Suzana, Luciane, Chiquinho, Fabiana, Marlete, Ana, Eloiza, César, Murilo e Alex pelo apoio, amizade e pelas experiências de vida e de trabalho que compartilhamos.

Ao César, pela grande ajuda e colaboração no desenvolvimento do projeto de microRNAs.

James Fagin pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por seus ensinamentos.

Jeffrey Knauf pelos inúmeros conselhos e sugestões durante a fase do meu projeto no exterior.

Ronald Ghossein pela excelente trabalho que desenvolve na patologia do MSKCC e por toda sua colaboração.

Aos amigos do laboratório do Dr. Fagin: Roberta, Debyani, Rebecca, Mabel, Xu, Jacek, Tae, Kuan, Aime, Jackie, Emma e aos vizinhos de laboratório Yogindra e Jason.

Aos professores, alunos e funcionários do departamento e do ICB, pela amizade e ajuda.

À toda a minha família e amigos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o meu projeto no Brasil (Processo: 01/08044-0) e no exterior (BEX-0644/07-2).

A todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste estudo. Muito obrigado!!

*I do not know what I may appear to the
world; but to myself I seem to have been only
like a boy playing on the seashore, and
diverting myself in now and then finding of a
smoother pebble or a prettier shell than
ordinary, whilst the great ocean of truth lay
all undiscovered before me.*

Sir Isaac Newton (1642-1727) English physicist, mathematician

RESUMO

Ricarte-Filho JCM. Envolvimento dos oncogenes *BRAF*, *PIK3CA* e *AKT1* e do microRNA supressor de tumor let-7 na transformação maligna e progressão tumoral tiroidiana [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

O câncer de tiróide derivado de células foliculares representa a grande maioria das malignidades tiroidianas. Apesar do prognóstico usualmente favorável deste câncer, pacientes com carcinoma de tiróide pouco diferenciado (PDTC), anaplásico (ATC) ou diferenciado refratário ao tratamento com iodo radioativo (RAIR) apresentam elevada mortalidade, especialmente em casos positivos para tomografia por emissão de pósitrons com fluordesoxiglucose F18 (FDG-PET). Desta forma, o delineamento das alterações moleculares em oncogenes, supressores de tumor e microRNAs torna-se importante para elucidação das vias que representam alvos potenciais em futuras terapias. Para obtermos uma ampla gama de informação genética no câncer avançado da tiróide, desenhamos ensaios de espectrometria de massa para detecção de 111 mutações nos genes *RET*, *BRAF*, *NRAS*, *HRAS*, *KRAS*, *PIK3CA*, *AKT1* e outros genes recentemente associados ao câncer. Avaliamos 31 linhagens celulares, 52 tumores primários (34 PDTC e 18 ATC) e 55 recidivas e metástases refratárias ao iodo radioativo, FDG-PET positivas de 42 pacientes. Através desta análise, mostramos que PDTC com mutações *BRAF* ou *RAS* apresentam comportamentos clínicos e biológicos distintos. As mutações *BRAF* são altamente prevalentes em câncer metastático RAIR, FDG-PET positivo. Mutações de *PIK3CA* e *AKT1*, esta última sendo reportada pela primeira vez no câncer de tiróide, são relativamente freqüentes nos carcinomas avançados, particularmente em recidivas e metástases. As mutações *BRAF* são concordantes entre os tumores primários e metastáticos, ao contrário de mutações de *PIK3CA* e *AKT1*, que foram geralmente discordantes nas amostras de um mesmo paciente. Em adição, avaliamos a função do microRNA (miRNA) let-7 neste câncer. Trabalhos prévios relatam a capacidade deste pequeno RNA em inibir os níveis protéicos de RAS, agindo como um gene supressor tumoral. Aqui, mostramos que a ativação do rearranjo oncogênico RET/PTC3 em células de tiróide de rato PCCl3 marcadamente reduzem a expressão de let-7. Além disso, a transfecção estável deste miRNA em células TPC-1, que apresentam o rearranjo RET/PTC1, inibe a fosforilação de ERK, efetor da via MAPK e mediador dos efeitos

biológicos deste oncogene. Com a introdução de let-7, também observamos a inibição do crescimento celular e modulação de genes do ciclo celular (*P21*, *CCND1*, *MYC*) e diferenciação (*TTF1*, *TG*). Desta forma, os nossos resultados contribuem na aplicação de terapias dirigidas a efetores das vias fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) que poderiam favorecer os carcinomas metastáticos RAIR, além de salientar o envolvimento do miRNA let-7 como um gene supressor no câncer de tiróide.

Palavras-chave: Genotipagem; Espectrometria de massa; BRAF; PIK3CA; AKT1; Câncer de tiróide; RET/PTC; let-7; microRNA; proliferação; diferenciação.

ABSTRACT

Ricarte-Filho JCM. Involvement of *BRAF*, *PIK3CA* and *AKT1* oncogenes and let-7 tumor suppressor microRNA in malignant transformation and progression of thyroid cancers [Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Thyroid cancer derived from the follicular epithelial cells account for the great majority of all thyroid malignancies. Despite the favorable prognosis of this cancer, patients with poorly differentiated (PDTC), anaplastic (ATC) and radioactive iodine-refractory (RAIR) differentiated thyroid cancers have a high mortality, particularly if positive on 18F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography (FDG-PET). Therefore, the discrimination of the molecular alterations in oncogenes, tumor suppressor and microRNAs genes is important to elucidate the main pathways representing potential targets in future therapies. To obtain comprehensive genetic information on advanced thyroid cancers, we designed an assay panel for mass spectrometry genotyping encompassing the most significant oncogenes in this disease: 111 mutations in *RET*, *BRAF*, *NRAS*, *HRAS*, *KRAS*, *PIK3CA*, *AKT1* and other related genes were surveyed in 31 cell lines, 52 primary tumors (34 PDTCs and 18 ATCs) and 55 RAIR, FDG-PET positive recurrences and metastases from 42 patients. We show that PDTC with *BRAF* and *RAS* mutations have distinct biological and clinical behaviors. *BRAF* mutations are highly prevalent in FDG-PET-positive RAIR metastatic thyroid cancers. Mutations of *PIK3CA* and *AKT1*, the latter not previously described in this disease, are comparatively frequent in advanced thyroid cancers, particularly in metastatic or recurrent lesions. *BRAF* mutations are concordant between primary and metastatic specimens, yet this is not the case for *PIK3CA* or *AKT1*. In addition, we evaluated the role of let-7 microRNA (miRNA) in this cancer. Previous studies report that this small RNA acts as a tumor suppressor gene by reducing the levels of RAS protein. Here, we show that *RET/PTC3* activation in PCCl3 rat thyroid cells markedly reduced let-7 expression. Moreover, stable transfection of let-7 miRNA in TPC-1 cells, which harbor *RET/PTC1* rearrangement, inhibited MAPK activation. The inhibition of the pathway was accompanied by reduced cell growth and modulation of cell cycle genes (*P21*, *MYC*, *CCND1*) and differentiation genes (*TITF1* and *TG*). These findings are important to understand how we may apply

the mutational information on patient management, using therapies directed at MAPK and PI3K effectors and to highlight the function of let-7 as tumor suppressor gene in thyroid cancer.

Keywords: Genotyping; Mass spectrometry; PIK3CA; AKT1; BRAF; Thyroid Cancer; let-7; microRNA; RET/PTC; proliferation; differentiation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Alterações genéticas no câncer de tiróide	14
1.2 MicroRNAs no câncer de tiróide.....	18
2 OBJETIVOS.....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Avaliação de mutações genéticas por espectrometria de massa.	26
<i>3.1.1 Análise histopatológica dos casos de carcinomas de tiróide estudados</i>	<i>26</i>
<i>3.1.2 Tecidos e linhagens celulares de carcinomas tiroidianos estudados</i>	<i>26</i>
<i>3.1.3 Linhagens celulares de carcinomas tiroidianos s</i>	<i>27</i>
<i>3.1.4 Extração de Ácido Nucléico</i>	<i>27</i>
<i>3.1.5 Genotipagem por espectrometria de massa.....</i>	<i>28</i>
<i>3.1.6 Sequenciamento</i>	<i>29</i>
<i>3.1.7 Clonagem e Transformação dos fragmentos de PCR</i>	<i>30</i>
<i>3.1.8 Rearranjos RET/PTC e PAX8/PPARγ.....</i>	<i>30</i>
<i>3.1.9 Métodos estatísticos</i>	<i>32</i>
3.2 Avaliação da função do miRNA let-7 no câncer de tiróide	32
<i>3.2.1 Cultura de células</i>	<i>32</i>
<i>3.2.2 Transfecção</i>	<i>33</i>
<i>3.2.3 Teste MTT</i>	<i>33</i>
<i>3.2.4 Western Blotting</i>	<i>33</i>
<i>3.2.5 Análise da expressão dos genes de diferenciação.....</i>	<i>34</i>
<i>3.2.6 Quantificação do microRNA Let-7 maduro.....</i>	<i>35</i>
<i>3.2.7 Análise estatística.....</i>	<i>36</i>

4 RESULTADOS	37
<i>4.1 Avaliação de mutações genéticas por espectrometria de massa</i>	37
<i>4.1.1 Detecção de alterações genéticas em linhagens celulares e tecidos humanos de câncer de tiróide</i>	37
<i>4.1.2 Genotipagem de PDTC e ATC primários</i>	41
<i>4.1.3 Histologia e genótipo de recidivas e metástases de câncer de tiróide RAIR</i>	47
<i>4.1.4 Histologia e genótipo de recidivas/metástases de pacientes apresentando câncer de tiróide RAIR, FDG-PET positivo</i>	47
<i>4.1.5 Correlações histopatológicas e moleculares em pacientes com múltiplos tumores</i>	51
<i>4.1.6 Mutações oncogênicas de PIK3CA e AKT1 em câncer de tiróide</i>	53
<i>4.2 Avaliação da função do miRNA let-7 no câncer de tiróide</i>	56
<i>4.2.1 Efeito de RET/PTC3 na expressão de let-7 em células de tiróide de rato PCCL3</i>	56
<i>4.2.2 Efeitos de let-7 na via de sinalização MAPK em células TPC-1</i>	57
<i>4.2.3 Efeito do miRNA let-7 no crescimento celular de TPC-1</i>	59
<i>4.2.4 Efeitos de let-7 na expressão de genes específicos da tiróide</i>	60
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÕES	67
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXO A - Principais ensaios de genotipagem utilizados neste estudo	
ANEXO B - Publicações em que esta tese foi baseada	

1 INTRODUÇÃO

A tiróide é constituída de dois tipos distintos de células: as células foliculares de origem epitelial, que são responsáveis pela produção dos hormônios tiroidianos triiodotironina (T3) e tiroxina (T4); e as células C originárias da crista neural, responsáveis pela produção do hormônio calcitonina (Kondo *et al.*, 2006). A maioria dos cânceres de tiróide (95%) é derivada das células foliculares. No entanto, uma minoria também pode se desenvolver a partir de células parafoliculares C (câncer medular da tiróide), tecidos moles, ou do sistema linforreticular da glândula tiróide (Hundahl *et al.*, 1998; Kondo *et al.*, 2006). Apesar de originarem-se de uma mesma célula progenitora, os carcinomas tiroidianos de origem folicular demonstram grande diversidade morfológica sendo caracterizados por um espectro contínuo de subtipos tumorais que vão desde os indolentes carcinomas bem diferenciados: papilífero (PTC, do inglês *papillary thyroid cancer*) e folicular (FTC, do inglês *follicular thyroid cancer*) (90-99% dos pacientes apresentam 20 anos de sobrevida) para carcinomas pouco diferenciados da tiróide (PDTC, do inglês *poorly differentiated thyroid cancer*, 20-40%: 20 anos de sobrevida) para carcinomas anaplásicos (ATC, do inglês *anaplastic thyroid cancer*, 5%: 1 ano de sobrevida). A prevalência destes diferentes subtipos de câncer de tiróide é inversamente proporcional à sua agressividade, com os bem diferenciados PTC (70%-85% dos casos) e FTC (15%) sendo os mais comuns, seguidos por PDTC (5%) e ATC (5%) (Wreesmann e Singh, 2008).

A maioria dos pacientes com câncer de tiróide é tratada com êxito após cirurgia apropriada e terapia com radioiodo (I^{131}). A utilização do radioiodo após cirurgia primária auxilia a destruir quaisquer focos residuais microscópicos da doença. De fato, diferentes estudos retrospectivos mostram que a ablação por radioiodo é associada com uma redução de 50% na recidiva locorregional e, a longo prazo, da mortalidade específica causada por esta doença em pacientes com tumores primários que apresentam pelo menos 1 cm de diâmetro, são multicêntricos, ou que tenham invasão de tecidos moles na apresentação (Wong *et al.*, 1990; Mazzaferri e Jhiang, 1994; Vassilopoulou-Sellin *et al.*, 1996). O uso da tomografia por emissão de pósitrons com fluordesoxiglucose (FDG-PET, do inglês *fluorodeoxyglucose*

positron-emission tomography) também tem sido de extremo valor na detecção de casos de câncer metastático que são tiroglobulina positiva, mas que perdem a capacidade de captar iodo. Como a captação de fluordesoxiglucose pelas lesões metastáticas é inversamente associada à captação de iodo radioativo e diretamente associada à progressão mais rápida e aumento da mortalidade, a positividade do FDG-PET é uma potencial ferramenta para identificar pacientes que apresentam tumores refratários ao iodo radioativo (RAIR, do inglês *radioactive iodine refractory*) (Robbins *et al.*, 2006).

Apesar do prognóstico favorável dos carcinomas tireoidianos diferenciados, 2 a 5% destes tumores progridem para estágios mais avançados da doença, tornando-se RAIR, apresentando positividade no PET scan e com sobrevida de 3 a 5 anos (Pittas *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Um estudo prévio analisando a histologia de 70 pacientes com câncer como os acima mencionados em sítios primários e suas metástases mostrou a seguinte prevalência histológica: 50% de PDTC, 20% de variante de células altas do carcinoma papilífero da tiróide (TCV-PTC, do inglês *tall cell variant-papillary thyroid cancer*) e 23% de PTC (Rivera *et al.*, 2008). O carcinoma anaplásico da tiróide, apesar de raro, e invariavelmente RAIR, é associado a uma sobrevida média de 6 meses (Kebebew *et al.*, 2005). Além da refratariedade ao iodo radioativo, quimioterapia convencional e radioterapia externa apresentam raros benefícios para estes carcinomas avançados, enfatizando a importância do desenvolvimento de novas terapias (Pfister e Fagin, 2008).

O câncer resulta de um complexo acúmulo de alterações em oncogenes, genes supressores de tumor e, mais recentemente descobertos, microRNAs (Croce, 2008). Estas alterações resultam em vantagens essenciais na promoção tumoral como aumento da proliferação e angiogênese, inibição da apoptose, maior capacidade de invasão e metástase, entre outras (Hanahan e Weinberg, 2000). O recente progresso no entendimento das alterações genéticas envolvidas nas etapas de promoção tumoral do carcinoma tireoidiano abriu caminho para a terapia individualizada de pacientes através do desenvolvimento de drogas específicas para os genes que causam a doença. Desta forma, o conhecimento das alterações genéticas destes tumores torna-se extremamente importante para esta nova geração de terapias.

1.1 Alterações genéticas no câncer de tiróide

Nos últimos anos, houve um enorme avanço na elucidação dos eventos genéticos responsáveis pela iniciação e progressão do câncer de tiróide. Em PTC, mutações dos genes *RET*, *NTRK*, *RAS* e *BRAF*, que codificam efetores que ativam a via MAPK (do inglês *mitogen-activated protein kinase*), são encontrados em cerca de 70% dos casos (Kimura *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2003; Frattini *et al.*, 2004). Mutações do gene *RAS* também são encontradas em 50% dos carcinomas foliculares da tiróide, e, juntamente com os rearranjos gênicos *PAX8/PPAR γ* , compreendem 85% dos casos deste câncer (Nikiforova *et al.*, 2003). PDTC e ATC podem surgir de neoplasias bem diferenciadas preexistentes da tiróide (WDTC, do inglês *well differentiated thyroid cancer*), particularmente a partir de PTC. De fato, mutações de genes considerados eventos precoces no desenvolvimento do WDTC também são comumente encontradas em PDTC e ATC. Rearranjos do gene *RET* e mutações pontuais de *RAS* e *BRAF* são encontrados em PDTC (13%, 46-55% e 12-17%, respectivamente), enquanto as duas últimas também são detectadas em ATC (6-52% e 25 -29%) (Santoro *et al.*, 2002; Garcia-Rostan *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2007; Santarpia *et al.*, 2008). Alterações de efetores da via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K, do inglês *phosphatidylinositol 3-kinase*), como *PIK3CA* e *PTEN*, também são relativamente comuns no câncer de tiróide. Em contraste com as alterações da via MAPK, estas são comumente associadas a fases avançadas na progressão maligna, sendo mais frequentes em ATC (16% e 14%, respectivamente) do que em carcinomas bem diferenciados PTC (2%, 2%) e FTC (8%, 7%) (Paes e Ringel, 2008). Além disso, a inativação do supressor de tumor *TP53* e a ativação de *CTNNB1* (β -catenina) parecem desempenhar um importante papel na progressão do carcinoma tireoidiano, já que as mutações destes genes são praticamente restritas aos cânceres menos diferenciados como PDTC (~28 e 25%, respectivamente) e ATC (~64 e 65.5%, respectivamente) (Sobrinho-Simoes *et al.*, 2008) (Figura 1).

Figura 1. Modelo de progressão tumoral do câncer de tireóide. Considerando-se os aspectos clínicos, histológicos e moleculares, há diferentes vias propostas para a progressão tumoral da célula folicular da tireóide. As alterações genéticas que resultam na ativação de *BRAF*, *NTRK*, *RAS* e rearranjos de *RET* e *PAX8* representam eventos precoces no carcinoma tireoidiano envolvidos na iniciação de PTC e FTC. A maioria dos carcinomas pouco diferenciados e indiferenciados são considerados derivações dos carcinomas bem diferenciados da tireóide através de alterações genéticas, das quais as mais bem estabelecidas até o momento são as alterações de *TP53* e β -catenina e *PIK3CA* e *PTEN*.

Recentemente, uma mutação no domínio PH (do inglês *pleckstrin homology*) do gene *AKT1* foi detectada em cânceres de mama, cólon, ovário e pulmão (Carpten *et al.*, 2007; Bleeker *et al.*, 2008; Stemke-Hale *et al.*, 2008). Esta oncoproteína apresentou capacidade de se ligar à membrana plasmática, estimular a via de sinalização AKT e induzir transformação maligna *in vitro* e *in vivo* (Carpten *et al.*, 2007). Até o momento, não existem estudos prévios analisando a prevalência de mutações dos genes *PIK3CA* e *AKT1* em PDTC. Além disso, um único estudo investigando mutações de *AKT1* em FTC e ATC rendeu resultados negativos (Liu *et al.*, 2008).

Dada a importância das vias PI3K e MAPK no câncer humano, vários compostos foram especificamente desenhados para bloquear a função de oncoproteínas nestas cascatas ou seus efetores para impedir a proliferação da célula cancerosa. Muitas destas drogas estão atualmente em diferentes fases de desenvolvimento pré-clínico e clínico (Faivre *et al.*, 2006; Pratilas e Solit, 2007; Nikiforov, 2008). Além disso, diversos estudos têm destacado a importância do conhecimento das mutações presentes no tumor para determinar a probabilidade da eficácia terapêutica. Um trabalho recente demonstrou que linhagens celulares de

câncer humano apresentando mutações *BRAF* são particularmente sensíveis aos inibidores de MEK, proteína efetora da via de sinalização MAPK (Solit *et al.*, 2006). A ação específica desta droga também foi observada em linhagens celulares de câncer de tiróide apresentando mutação *BRAF* (Ball *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Leboeuf *et al.*, 2008) (Figura 2).

Figura 2. Valores de IC₅₀ para o inibidor de MEK em linhagens celulares de câncer humano (esquerda) e câncer de tiróide (direita). A. Linhagens celulares de diferentes cânceres apresentando mutações no gene *BRAF* apresentam sensibilidade específica ao inibidor de MEK CI-1040. Células negativas para mutações dos genes *BRAF* ou *RAS* (*RAS/RAF-WT*) são resistentes ao mesmo composto. Linhagens celulares com mutação no gene *NRAS* apresentam uma resposta variada. B. Resposta ao inibidor de MEK (AZD6244) em linhagens celulares de câncer de tiróide. Células com mutação *BRAF* apresentam resposta específica ao inibidor (Adaptado de Solit, 2006 e Leboeuf, 2008).

O desenvolvimento de drogas dirigidas à via de sinalização PI3K/AKT/mTOR também tem mostrado efeitos terapêuticos promissores em várias neoplasias, incluindo as de tiróide. Tratamento de linhagens celulares de câncer da tiróide com o inibidor de AKT, KP372-1, diminui a proliferação celular e induz apoptose (Mandal *et al.*, 2005). O inibidor de mTOR, RAD001, mostrou eficaz inibição do crescimento tumoral tireoidiano em camundongos com mutações inativadoras do gene *PTEN* (Furuya *et al.*, 2007; Yeager *et al.*, 2008). Além disso, perda de expressão de *PTEN* e mutações de *PIK3CA* foram associadas à resistência a inibidores específicos de quinases (por exemplo, de EGFR) em outros cânceres e podem ser importantes alterações na predição da resposta terapêutica (Berns *et al.*, 2007; Mellinghoff *et al.*, 2007). Portanto, a implementação de tecnologias capazes de

mapear as alterações genéticas específicas portadas por cada paciente com câncer está se tornando cada vez mais necessária para auxiliar a determinar o modo pelo qual eles devem ser tratados. No câncer de tiróide, isto é particularmente importante em pacientes apresentando recidivas ou metástases refratárias ao tratamento com iodo radioativo, ainda mais naqueles que são também PET positivos, uma vez que estes pacientes apresentam alta mortalidade e são os que mais necessitam de novas opções de terapia. Apenas um estudo prévio analisou até o momento anormalidades genéticas em tumores RAIR, e este se limitou unicamente à análise de alterações do oncogene *BRAF* (Mian *et al.*, 2008).

Neste trabalho, utilizamos a tecnologia de espectrometria de massa MALDI-TOF (do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*) para gerar uma plataforma dedicada ao câncer de tiróide para genotipagem de um conjunto abrangente de mutações previamente reportadas, assim como algumas alterações ainda não descritas neste câncer. Neste método, uma reação de PCR utilizando *primers* que amplificam fragmentos de cerca de 100 pb contendo a mutação de interesse é conduzida para várias mutações. Múltiplas reações de PCR podem ser realizadas em um único poço de uma placa de PCR (multiplex), proporcionando um método rápido e eficiente para a genotipagem em larga escala. Após a realização do PCR para amplificar as regiões potencialmente mutadas de diversos genes, a reação de extensão é conduzida. Nesta etapa, os *primers* de extensão, que são adjacentes aos sítios de mutação, ditam a extensão de um único nucleotídeo, que depende da sequência molde. A diferença de massa entre os produtos potenciais (diferentes nucleotídeos) permite a distinção entre o alelo selvagem e o alelo mutante após análise pelo espectrômetro de massa (Figura 3).

Figura 3. Esquema detalhando as etapas de genotipagem por espectrometria de massa.

Após extração do DNA genômico, primers específicos são utilizados em reações de PCR para amplificar a região do gene contendo a mutação (1). Após a obtenção do produto de PCR, o primer de extensão é desenhado de forma a conter seu último nucleotídeo 3' imediatamente a montante do sítio mutado. A reação de extensão é realizada com ddNTPs (dideoxynucleotídeos: deoxinucleotídeos modificados que não possuem o grupo 3'-OH e, desta forma, não permitem a adição de um próximo nucleotídeo à cadeia de DNA), permitindo que a DNA polimerase acrescente um único ddNTP ao primer, que é complementar à sequência-alvo. Como os diferentes nucleotídeos (selvagem ou mutado) apresentam diferentes massas, a espectrometria de massa é capaz de determinar qual nucleotídeo foi adicionado, evidenciando diferentes picos após análise pelo software Typer 4.0 (Sequenom®).

Além disso, esta técnica tem demonstrado ser mais sensível para a detecção de alterações genéticas quando comparada ao sequenciamento convencional pelo método Sanger (Thomas *et al.*, 2007; Vivante *et al.*, 2007). Isso pode ser particularmente importante para a detecção de mutações nos cânceres avançados de tireóide que são geralmente entremeados em estroma e apresentam extensa infiltração de macrófagos associados ao tumor (Ryder *et al.*, 2008).

1.2 MicroRNAs no câncer de tireóide

MicroRNAs (miRNAs) são moléculas de RNA fita simples de 19-25 nucleotídeos, não codificadoras de proteínas, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais (Kim, 2005). Lin-4 (do inglês *lineage-deficient-4*), foi descoberto em 1993 como o primeiro miRNA, sendo

nesta época associado à regulação do desenvolvimento larval em *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993). Até o momento, 706 miRNAs diferentes foram identificados em humanos e estudos bioinformáticos estimam que este número supere 1000 miRNAs, constituindo uma das maiores classes de reguladores gênicos (Berezikov *et al.*, 2005). Os miRNAs exercem seus efeitos regulatórios ligando-se à região 3' não traduzida de RNAs alvos. Este mecanismo de atuação permite a redução dos níveis protéicos de seus genes alvos, raramente afetando o nível de expressão transcricional (Kim, 2005). Apesar de não terem suas funções totalmente esclarecidas, a descoberta dos miRNAs atraiu a comunidade científica pelas evidências sugestivas de que estas moléculas apresentam papel fundamental em diversos processos biológicos. Em mamíferos, estes pequenos RNAs foram associados à regulação da proliferação, apoptose, diferenciação, hematopoiese, entre outras funções (Brennecke *et al.*, 2003; Esau *et al.*, 2004; Chen e Lodish, 2005). Diversos estudos enfatizam a importância destas moléculas ao relatar alterações na expressão dos miRNAs em diferentes patologias humanas.

A biogênese do miRNA, esquematizada na figura 4, inicia-se com a transcrição de seu gene pela RNA polimerase II, gerando um longo transcrito de miRNA primário (pri-miRNA) contendo cap 5' e cauda poli(A) (Lee *et al.*, 2004). O pri-miRNA apresenta uma estrutura *hairpin* em seu arcabouço que é clivada ainda no núcleo pela RNase III, Drosha, e seu cofator DGCR8 (do inglês *DiGeorge syndrome critical region gene 8*), gerando uma molécula precursora do miRNA maduro denominada pré-miRNA, com cerca de 70 nucleotídeos (Lee *et al.*, 2003). Em seguida, o pré-miRNA é transportado rapidamente ao citoplasma pela exportina-5 (Exp5), proteína de exportação nuclear que utiliza Ran-GTP como cofator (Lund *et al.*, 2004). No citoplasma, o pré-miRNA é processado pela RNase III, Dicer, gerando um miRNA fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos (Bernstein *et al.*, 2001). Este produto é incorporado a um complexo multimérico denominado RISC (do inglês *RNA-induced silence complex*), que inclui as proteínas Argonautas como principais componentes. Apenas uma das fitas do *duplex* de miRNA permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes alvos (Schwarz *et al.*, 2003). A expressão alterada de componentes da maquinaria de biogênese dos miRNAs como Drosha, Dicer e Argonautas tem sido associada a

diferentes tumores humanos, destacando a importância desta via no funcionamento celular adequado (Esquela-Kerscher e Slack, 2006).

Figura 4. Via de biogênese dos miRNAs. O gene de miRNA é transcrito pela RNA polimerase II. O transcrito primário (pri-miRNA) apresenta uma estrutura *hairpin* que é processada pela enzima RNase III, Drosha, formando o miRNA precursor (pré-miRNA) de ~70 nucleotídeos. A proteína exportina-5 leva este produto ao citoplasma para ser processado pela RNase III, Dicer, gerando um miRNA fita dupla de ~22 nucleotídeos. Uma das fitas do *duplex* de miRNA é degradada enquanto a outra permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes alvos.

A regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs na região 3' não traduzida depende do grau de complementaridade com o RNAm alvo, podendo

ocorrer por inibição traducional ou degradação do RNAm. O pareamento de modo imperfeito com o RNAm acarreta a inibição traducional do alvo, sendo o mecanismo principal de atuação dos miRNAs em mamíferos. Em função dos miRNAs possuírem seqüências pequenas e agirem sem a necessidade de pareamento completo, um único miRNA pode regular muitos RNAm alvos além de cooperarem no controle de um único RNAm (Brennecke *et al.*, 2005). Alguns estudos indicam que um miRNA possa regular 200 RNAs apresentando funções totalmente diversas. Desta forma, os miRNAs constituem uma enorme e complexa rede regulatória da sinalização celular. Em plantas, a regulação dos miRNAs ocorre principalmente através de sua interação perfeita com o RNAm, levando-o à degradação (mecanismo de iRNA). No entanto, já se têm exemplos da ocorrência deste silenciamento gênico também em mamíferos (Valencia-Sanchez *et al.*, 2006). Apesar de estarmos apenas começando a entender a biologia dos miRNAs, o crescente número de trabalhos vem revelando importante desempenho destes pequenos RNAs em diversos processos biológicos. Além disso, através da regulação global da expressão gênica celular e associação a diferentes funções, torna-se evidente que os miRNAs possam alterar a progressão de diversas patologias.

A expressão alterada de miRNAs vem sendo relacionada a diversos tipos tumorais, podendo funcionar como oncogenes ou genes supressores de tumor. Em humanos, 50% dos genes de miRNAs estão localizados em sítios genômicos associados ao câncer (Calin *et al.*, 2004). Os genes miR-15 e miR-16 estão situados no cromossomo 13q14, uma região deletada em mais da metade das leucemias linfocíticas crônicas (LLC) de células B (Calin *et al.*, 2002). Além disso, observou-se uma mutação germinativa no locus gênico de miR-15/miR-16 que diminui a expressão destes miRNAs maduros em células de LLC (Calin *et al.*, 2005). Estes miRNAs também estão menos expressos em adenomas hipofisários, sendo esta expressão inversamente correlacionada com o tamanho do tumor (Bottoni *et al.*, 2005). Estes achados sugerem que miR-15 e miR-16 atuem como genes supressores tumorais no câncer humano. Interessantemente, miR-15 e miR-16 mostraram regular negativamente *BCL2*, um oncogene anti-apoptótico que se apresenta superexpresso em diversos cânceres humanos, incluindo leucemias e linfomas (Cimmino *et al.*,

2005). Os níveis dos miRNAs maduros de miR-143 e miR-145 estão significativamente diminuídos em tumores colorretais e linhagens celulares de câncer linfóide, mama, próstata e colo uterino sugerindo que possam atuar como supressores nestes tipos tumorais (Michael *et al.*, 2003; Iorio *et al.*, 2005).

Por outro lado, alguns miRNAs exercem ação oncogênica nas células. MiR-155 apresenta expressão aumentada em linfomas e células de câncer de mama sugerindo que possa agir como oncogene (Metzler *et al.*, 2004; Eis *et al.*, 2005; Iorio *et al.*, 2005; Kluiver *et al.*, 2005). A análise da expressão global de miRNAs em carcinoma papilífero da tiróide revelou um grande aumento na expressão de três miRNAs: miR-221, miR-222 e miR-146, relacionando-os como possíveis oncogenes neste tipo tumoral (He, H. *et al.*, 2005). Além disso, miR-21 apresenta expressão aumentada em tumores de mama e glioblastoma, tumor cerebral altamente maligno (Chan *et al.*, 2005; Iorio *et al.*, 2005). O *knockout* deste miRNA em cultura de células de glioblastoma leva à indução de apoptose (Chan *et al.*, 2005).

O padrão de expressão de miRNAs por microarray em câncer humano pode ser utilizado eficientemente na classificação tumoral. Num painel de mais de 200 cânceres humanos, dados de expressão de 217 miRNAs foram mais eficientes na definição do tipo de câncer do que 16,000 RNAs (Lu *et al.*, 2005). Estes achados indicam que o perfil de expressão de miRNA poderá ter extrema utilidade no diagnóstico de câncer.

Os miRNAs pertencentes à família let-7 (do inglês *lethal-7*), que inclui doze homólogos em humanos, também estão inseridos no grupo de miRNAs supressores tumorais. Let-7 é um dos dois stRNAs (do inglês *small temporal RNAs*) inicialmente descobertos em *C. elegans*. Devido em parte à sua natureza altamente conservada, mesmo em humanos, let-7 foi o primeiro miRNA identificado em mamíferos (Grosshans e Slack, 2002). Em *C. elegans*, let-7 inibe a expressão de let-60, um ortólogo da família do oncogene *RAS* em humanos. De fato, a família let-7 de miRNAs mostrou regular negativamente a expressão das isoformas do oncogene *RAS* através de múltiplos sítios complementares à região 3' não traduzida destes RNAs (Johnson *et al.*, 2005). Diversos estudos demonstram um papel supressor tumoral de let-7 no câncer de pulmão (Johnson *et al.*, 2007). A expressão deste miRNA mostrou-se reduzida em 50% de tumores pulmonares, quando comparada com

tecidos normais adjacentes. Neste mesmo estudo, a redução de let-7 foi associada à menor sobrevida em câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC, do inglês *non-small cell lung cancer*) (Takamizawa *et al.*, 2004b). A diminuição da expressão de let-7 também foi correlacionada com um acentuado aumento nos níveis de RAS, outro marcador biológico indicativo de menor sobrevida em NSCLC (Nemunaitis *et al.*, 1998). Estudos *in vitro* ainda mostraram que a expressão forçada de let-7a e let-7f, duas das isoformas predominantes da família let-7, em células de câncer de pulmão A549 reduz a capacidade desta em formar colônias *in vitro* (Takamizawa *et al.*, 2004b). Por outro lado, a inibição da função de let-7 leva a um aumento na divisão celular de A549 e da linhagem celular de hepatoma HepG2, provavelmente devido a um bloqueio da transição de G1/S no ciclo celular (Johnson *et al.*, 2007). A perda de let-7 também foi relacionada com resistência à radiação *in vitro*, sugerindo que a alteração da expressão de let-7 causa provável impacto na resposta terapêutica de uma célula de câncer (Weidhaas *et al.*, 2007). Além disso, a atividade supressora de let-7 também foi observada em outros tumores humanos, incluindo cólon (Akao *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2007) fígado (Zhang *et al.*, 2007), estômago (Guo *et al.*, 2006) e ovário (Park *et al.*, 2007). Apesar de sua conhecida atuação sobre os níveis de expressão de RAS, a função supressora de let-7 também pode vir de sua atuação sobre outros oncogenes. A perda dos sítios de ligação de let-7 na região 3' não traduzida do RNAm de *HMGA2* foi associada com o desenvolvimento de lipomatose abdominal, linfomas, adenomas hipofisários e adenomas pulmonares (Mayr *et al.*, 2007). Em cânceres hematopoiéticos apresentando desregulação de *MYC*, tais como linfoma de Burkitt, a expressão de let-7 foi inversamente correlacionada com a do RNAm de *MYC* (Koscianska *et al.*, 2007; Sampson *et al.*, 2007). A transfecção do pré-miRNA de let-7a diminui a expressão de *MYC* e seus genes alvos, e reduz a proliferação de células de linfomas. Estes resultados ilustram a importância de let-7 em cânceres de diferentes tipos histológicos, através da inibição de distintos alvos oncogênicos.

Como mencionado anteriormente, ~ 70% dos PTCs apresentam alterações genéticas em *RET*, *RAS* e *BRAF* com praticamente nenhuma sobreposição, fornecendo evidências genéticas de que a ativação constitutiva desta sinalização ao longo do eixo RET-RAS-BRAF-ERK é fundamental para seu desenvolvimento

(Kimura *et al.*, 2003; Xing, 2007). Em particular, rearranjos do gene *RET* gene ocorrem em até 43% dos PTCs (Fusco e Santoro, 2007). Eles causam a recombinação do domínio quinase de RET e a porção N-terminal de genes heterólogos, gerando os rearranjos oncogênicos *RET/PTC*. Efeitos biológicos mediados por este rearranjo oncogênico incluem a indução da proliferação, desdiferenciação e dependem da ativação do eixo RET/PTC-RAS-BRAF-ERK (Trovisco *et al.*, 2007). Este requisito de ativação da via MAPK tem suporte nas evidências experimentais demonstrando que a depleção de um dos componentes da via, como RAS ou BRAF, é capaz de interferir a fosforilação de ERK induzida por RET/PTC (Melillo *et al.*, 2005; Mitsutake *et al.*, 2006).

Em função do importante papel de let-7 no controle de oncogenes, este miRNA apresenta interessante potencial como supressor tumoral também em câncer de tiróide, especialmente nos casos em que o tumor torna-se dependente da sinalização de RAS (casos com ativação de tirosino-quinases como RET/PTC ou do próprio RAS). A investigação de uma provável função supressora de let-7 nos cânceres de tiróide, seja esta dependente ou independente de RAS, pode abrir novas perspectivas para o uso destas moléculas no diagnóstico, prognóstico e futuras terapias em tumores tiroidianos que apresentam perda de expressão de let-7 (Figura 5).

Figura 5. Esquema da sinalização MAPK evidenciando as principais alterações genéticas nestes tumores (X). Os efeitos biológicos mediados pelo oncogene *RET/PTC* dependem da ativação constitutiva desta via (RET/PTC→RAS→BRAF→ERK) para ativar os genes alvos que irão mediar seus efeitos biológicos, incluindo o aumento da proliferação e perda de diferenciação. Let-7 apresenta potencial efeito supressor deste sinal oncogênico por apresentar RAS como um de seus genes alvos.

2 OBJETIVOS

- 1)** Utilizar a tecnologia de espectrometria de massa MALDI-TOF para genotipar genes com mutações previamente descritas no câncer, principalmente de componentes das vias de sinalização MAPK e PI3K, em câncer avançado de tireóide, incluindo:
 - a)** carcinomas pouco diferenciados primários;
 - b)** carcinomas anaplásicos primários;
 - c)** recidivas e metástases refratárias ao iodo radioativo e PET-positivas.
- 2)** Avaliar a potencial função do microRNA let-7 como supressor tumoral no câncer de tireóide e seus efeitos no crescimento celular e diferenciação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Avaliação de mutações genéticas por espectrometria de massa

3.1.1 Análise histopatológica dos casos de carcinomas de tiróide estudados

Dois patologistas certificados com especial interesse em carcinomas da tiróide (Ronald Ghossein e Michael Rivera) analisaram as lâminas histológicas dos tumores provenientes de pacientes com câncer RAIR, PET-positivos. Os outros casos foram examinados por RG. Os tumores foram classificados de acordo com critérios da Organização Mundial da Saúde 2004, com exceção dos TCV-PTC e PDTC. Os tumores foram classificados como TCV quando continham $\geq 50\%$ de células altas. PDTC foram definidos de acordo com suas características proliferativas: ≥ 5 mitoses/10 campos de alta potência e/ou necrose tumoral, independentemente do padrão arquitetural (Hiltzik *et al.*, 2006). Diferentemente da definição de PDTC utilizado neste trabalho, a recente proposta de Turim exige um padrão de crescimento sólido/trabecular/insular e da presença de um dos seguintes: aumento da taxa mitótica, necrose tumoral e núcleos convolutos (Volante *et al.*, 2007). Desta forma, a definição de PDTC segundo a proposta de Turim é baseada em uma combinação da arquitetura e classificação proliferativa, enquanto a nossa definição é baseada unicamente em classificação proliferativa. O tipo predominante de células tumorais presentes no PDTC foi classificado como papilífero, folicular-símile, ou célula oncocítica alta. O padrão de crescimento dos PDTC (folicular, papilífero, sólido/trabecular) e sua extensão também foram registrados. Além disso, os seguintes parâmetros histopatológicos foram registrados no tumor primário: tamanho do tumor, presença de cápsula, invasão vascular, invasão da cápsula do tumor e extensão extra-tiroidiana.

3.1.2 Tecidos e linhagens celulares de carcinomas tiroidianos estudados

Um total de 52 tumores primários (34 PDTC e 18 ATC), 55 recidivas e metástases nodais e/ou distantes de 42 pacientes com carcinoma de tiróide RAIR,

FDG-PET positivos foram estudados. Todos os casos foram diagnosticados entre 1983 e 2007 no Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. Previamente, 70 pacientes com carcinoma de tiróide primário ou metastático RAIR, PET-positivos foram caracterizados histologicamente (Rivera *et al.*, 2008). Quarenta e dois destes 70 pacientes apresentavam tecido disponível para a caracterização molecular e são o foco do atual estudo. Estes pacientes tiveram seus PET scans realizados entre 1996 e 2003. Pacientes foram considerados RAIR quando apresentaram uma elevação sérica de tiroglobulina com doença estrutural na presença de um diagnóstico negativo na varredura de corpo inteiro com radioiodo. Pacientes foram incluídos no estudo se: 1) apresentavam recidiva/metástase de câncer de tiróide não captante de iodo, 2) a biópsia ou remoção cirúrgica das recidivas/metástases corresponde a uma lesão identificada como PET-positiva, dentro do período de 2 anos da remoção cirúrgica do tecido. Um total de 55 amostras foram estudadas: 19 metástases a distância nos seguintes locais: osso (5), pulmão (5), linfonodo mediastinal (3), cérebro (2), pele (2), parede torácica (1) e tecidos moles da pelve (1); 22 metástases em linfonodos cervicais; 14 recidivas: tecidos moles do pescoço (11) e traquéia/esôfago (3). O estudo foi analisado e aprovado pelo Conselho de Revisão Institucional do Memorial Sloan-Kettering Cancer Center.

3.1.3 Linhagens celulares de carcinomas tireoidianos

Utilizamos um painel de 31 linhagens celulares de câncer da tiróide neste estudo. Estas foram selecionadas a partir de um grupo inicial de 52, que foram previamente analisadas por SNP-CGH (do inglês *single nucleotide polymorphism-comparative genomic hybridization*) ou pequenas repetições em tandem (STR, do inglês *short tandem repeat*) e verificadas como sendo exclusivas (Schweppe *et al.*, 2008). Todas as linhagens celulares foram cultivadas de acordo com as recomendações dos fornecedores e mantidas em 5% de CO₂ a 37 °C.

3.1.4 Extração de Ácido Nucléico

DNA genômico foi extraído de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE, do inglês *formalin-fixed paraffin-embedded*) utilizando-se PUREGene Genomic DNA purification kit (Gentra, Inc., Minneapolis, MN). Quando necessário, as amostras foram microdissecadas manualmente para conter pelo menos 50% de células tumorais. O DNA foi extraído de linhagens celulares usando Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Maryland, USA) e o RNA foi isolado utilizando-se PrepEase™ RNA Spin Kit (USB, Cleveland, OH). DNA e RNA de tecidos congelados foram isolados por AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen). RNA de amostras FFPE foi isolado utilizando RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Austin, TX), de acordo com o protocolo do fabricante, incluindo uma incubação do RNA eluído a 70 °C durante 20 minutos para quebrar ligações cruzadas, como descrito anteriormente (Li *et al.*, 2008). A transcrição reversa foi realizada com 1 µg de RNA total de cada tecido/célula e hexâmeros randômicos. A qualidade do DNA/RNA de cada amostra foi verificada por espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000 seguido por PCR com *primers* específicos para o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

3.1.5 Genotipagem por espectrometria de massa

Seleção de alterações genéticas no carcinoma tireoidiano

Uma lista de alterações genéticas clinicamente relevantes no câncer de tireóide foi selecionada utilizando-se as seguintes bases de dados: catálogo de mutações somáticas do câncer humano (COSMIC, www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/) e Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/). Alterações genéticas incluíram mutações somáticas de sentido incorreto (missense) e pequenas inserções e deleções nas regiões codificantes dos genes selecionados. Ensaios de genotipagem, incluindo *primers* para PCR e extensão foram desenhados utilizando o Sequenom MassARRAY Assay Design 3.1 Software baseando-se nas seqüências derivadas do UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>). Dois ou mais ensaios independentes foram desenhados para genotipagem das mutações mais relevantes. No total, 107 ensaios para genotipagem foram desenhados para interrogar 111 alterações únicas na região codificadora de 16 diferentes genes: *BRAF*, *RET*, *NRAS*,

HRAS, *KRAS*, *PIK3CA*, *AKT1*, *TEM*, *MAP2K1*, *IKBKB*, *PIK3R5*, *PRKCZ*, *RHEB*, *RPS6KA3*, *RPS6KB1*, *FRAP1*. A lista completa dos ensaios, incluindo todas as mutações interrogadas neste estudo é mostrada no anexo A. Como os ensaios de espectrometria de massa para genotipagem dos códons 12 e 13 do gene *HRAS* não foram suficientemente informativos, nós desenhamos *primers* para analisar estas alterações específicas nos tumores e linhagens celulares.

Genotipagem PCR e espectrometria de massa

PCR multiplex foi realizado em 5 µl contendo 0,1 U de Taq polimerase HotStart (Kapa Biosystems, Cidade do Cabo, África do Sul), 10 ng de DNA genômico, 2,5 pmol de cada *primer* e 2,5 mmol de dNTP. A termociclagem foi realizada a 95 °C por 15 min seguidos de 45 ciclos de 95 °C por 20 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 30 s. dNTPs não incorporados foram inativados utilizando-se 0,3 U de fosfatase alcalina de camarão a 37 °C por 40 min, seguido de inativação térmica de 85 °C por 5 min.

A reação de extensão foi realizada utilizando-se 5,4 pmol de cada *primer* de extensão, 50 mmol de ddNTP e 0,5 unidades de Thermosequenase DNA polimerase (enzima iPlex). O programa utilizado foi o seguinte: 5 ciclos de denaturação a 94 °C, anelamento a 52 °C por 5 s e extensão a 80 °C por 5 s. Em seguida, 94 °C para denaturação por 5 s e mais 5 ciclos de anelamento e extensão. As cinco etapas de anelamento e extensão com um único passo de desnaturação são repetidas 40 vezes, ou seja, um total de 200 ciclos. A extensão final é feito em 72 °C por três minutos e, em seguida, a amostra é resfriada a 4 °C. Após a adição de uma resina de troca catiônica para remover o sal residual das reações, 7 nl da reação de extensão purificada foram carregados no SpectroCHIP (Sequenom). SpectroCHIPS foram analisados usando um espectrômetro de massa Bruker BIFLEX III MALDI-TOF (SpectroREADER, Sequenom). Todos os resultados foram inspecionados manualmente, utilizando o Typer 4.0 software.

3.1.6 Seqüenciamento

O DNA genômico foi analisado para mutações por PCR seguido de seqüenciamento direto. Cinquenta a 100 ng de DNA genômico foram amplificados

utilizando Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) nas condições otimizadas para cada *primer*. A qualidade do PCR foi confirmada em gel de agarose 2%. Os produtos de PCR foram purificados utilizando QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA). O seqüenciamento pelo método Sanger foi realizado utilizando-se ABI BigDye Terminator e o seqüenciador capilar ABI 3730 (Applied Biosystems).

3.1.7 Clonagem e Transformação dos fragmentos de PCR

As amostras de DNA foram amplificadas por PCR utilizando-se High Fidelity Taq DNA polimerase (Invitrogen, San Diego, USA) e *primers* específicos para amplificar a região da mutação gênica a ser analisada. Os produtos de PCR purificados foram ligados no vetor pJET1.2 usando CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e os clones recombinantes foram transformados em células bacterianas competentes DH5 α . Colônias positivas foram selecionadas por PCR de colônia utilizando High Fidelity Taq DNA polimerase (Invitrogen) nas seguintes condições: 95 °C por 3 min e 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, seguidos de extensão final de 72 °C por 5 min. Os produtos do PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% e aqueles de tamanho esperado foram seqüenciados bidirecionalmente utilizando *primers* específicos complementares ao vetor pJET1.2.

3.1.8 Rearranjos *RET/PTC* e *PAX8/PPAR γ*

A expressão do gene *RET* é restrita nas células derivadas da crista neural. Na célula folicular tireoidiana, a ativação de *RET* ocorre quando há um rearranjo intracromossomal entre o domínio quinase de *RET* e a porção N-terminal de genes heterólogos. Doze diferente isoformas do rearranjo oncogênico de *RET* foram encontradas até o momento, mas 3 isoformas, *RET/PTC1*, *RET/PTC2* e *RET/PTC3*, são as mais prevalentes (Castellone e Santoro, 2008). Para determinar a presença de rearranjos do gene *RET* nos tumores duplo-negativos para *BRAF* e *RAS*, utilizamos cDNA como *template* em reações de PCR quantitativo para a análise da expressão relativa entre os éxons 10/11 e 12/13 de *RET*, que ladeiam o ponto de quebra do

rearranjo no intron 11 (Figure 6). Esta análise permite a identificação de todos os potenciais rearranjos do gene *RET* reportados em câncer de tiróide. As amostras com expressão 12/13 > 10/11 foram selecionados para confirmação de eventos recombinantes específicos de RET utilizando *primers* envolvendo o ponto de fusão das isoformas mais comuns: RET/PTC1, RET/PTC2 e RET/PTC3 (Imkamp *et al.*, 2007).

Figura 6. Primers utilizados para detecção de rearranjos do gene *RET*. A. Esquema dos éxons 10-11-12-13 do gene *RET*. *Primers* (setas) para os éxons 12-13 foram utilizados para detecção destes rearranjos nas linhagens de celulares de câncer da tiróide. Nas amostras tumorais de pacientes, devido a presença de diversas outras células que podem ou não expressar RET, a detecção de rearranjos é avaliada pela expressão relativa dos éxons 12-13 e 10-11. Amostras com rearranjos RET, devem apresentar aumento na expressão dos éxons 12-13 em relação aos éxons 10-11. B. Para as amostras que apresentam expressão dos éxons 12-13 > 10-11, *primers* específicos foram utilizados para análise de RET/PTC1, RET/PTC2 e RET/PTC3.

Para determinar a presença do rearranjo do gene *RET* em linhagens celulares, a expressão do RNAm de *RET* foi simplesmente analisada utilizando os *primers* para os éxons 12/13. cDNAs de TPC1 (linhagem de carcinoma papilífero da tiróide expressando o rearranjo RET/PTC1), células PCCL3 expressando RET/PTC2 e uma amostra tumoral de paciente expressando RET/PTC3 foram utilizadas como controles positivos.

Para detecção de rearranjos *PAX8-PPARγ*, *primers* para todas as possíveis isoformas do rearranjo foram desenhados e utilizados em reações de RT-PCR (Nikiforova *et al.*, 2002). cDNA derivado de amostras de FTC expressando os diferentes rearranjos foram utilizados como controle positivo. *GAPDH* foi utilizado

como controle interno. Os produtos de PCR foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose 2% e casos selecionados foram seqüenciados. *PAX8-PPAR γ* foi analisado em todas as linhagens celulares e tumores primários, e em lesões metastáticas que eram do tipo selvagem para mutações em *BRAF* e *RAS*.

3.1.9 Métodos estatísticos

As análises estatísticas foram realizadas usando SPSS 14,0 para Windows. Variáveis descontínuas foram analisadas utilizando teste exato de Fischer e as variáveis contínuas foram analisadas utilizando-se teste T. Análise de sobrevida foi realizada pelo método Kaplan-Meier e teste log-rank. Significância foi definida como $p < 0,05$.

3.2 Avaliação da função do miRNA let-7 no câncer de tiróide

3.2.1 Cultura de células

Células PTC3-5 e PCCL-BRAF foram obtidas a partir de células PCCL3 de tiróide de rato para obter expressão induzida dos oncogenes *RET/PTC3* e *BRAF_T1799A*, respectivamente. Essas células foram mantidas em meio Ham's F12 suplementado com 5% de soro bovino fetal, 1 mIU/ml de TSH bovino (Sigma, St. Louis, MO), 10 μ g/ml de insulina (Sigma, St. Louis, MO, St. Louis, MO), 5 μ g/ml de apotransferrina (Sigma, St. Louis, MO), 10 nM de hidrocortisona (Sigma, St. Louis, MO), 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina (Invitrogen Life Technologies), 1 μ g/ml de anfotericina (Invitrogen) em 5% de CO₂ a 37 °C. A expressão de *RET/PTC3* e *BRAF*^{V600E} foi induzida após o tratamento com 1 μ g/ml de doxíciclina (Calbiochem, San Diego, CA) por 72h. Células cultivadas na ausência de doxíciclina foram utilizadas como controle. TPC-1, linhagem celular humana de carcinoma papilífero da tiróide que expressa espontaneamente o rearranjo *RET/PTC1*, foi mantida em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 5% de soro bovino fetal, 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina e 1 μ g/ml de anfotericina em uma incubadora com 5% de CO₂ a 37

°C. Este estudo está de acordo com as orientações do Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas (nº20/F43/L2) da Universidade de São Paulo.

3.2.2 Transfecção

Células TPC-1 foram cultivadas até confluência de 80-90% e transfectadas com plasmídeos pH1-RNApuro-controle ou pH1-RNApuro-let-7 utilizando-se Lipofectamine 2000TM (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Linhagens com expressão estável de let-7 foram selecionadas utilizando-se puromicina 1 µg/ml por 2 a 3 semanas (Calbiochem, San Diego, CA). Clones estáveis superexpressando let-7 foram avaliados por PCR quantitativo e selecionados para utilização em experimentos posteriores. Plasmídeos pH1-RNApuro-controle e pH1-RNApuro-let-7 foram generosamente doados por Dr. Takashi Takahashi (Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan).

3.2.3 Teste MTT

8 x 10³ células/poço foram plaqueadas em uma placa de 96 poços. Após as células atingirem semi-confluência, MTT (0.125 mg/mL) (Amresco, Solon, OH) foi adicionado ao meio. Após 3 h, o meio foi removido e as células foram solubilizadas em 100 µL HCl 0.04 M em isopropanol e o produto da reação foi medido em espectrofotômetro a 595 nm.

3.2.4 Western Blotting

Células foram lavadas com PBS gelado por duas vezes e raspadas com tampão RIPA (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, desoxicolato de sódio 0,5%, EDTA 1 mM e SDS 0,1%), contendo inibidor de protease 10% (Sigma, St. Louis, MO). Medição da concentração protéica foi feita usando Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), e 50 µg de cada amostra foram fracionadas em SDS-PAGE 10% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido). Sítios de ligação não

específicos foram bloqueados através da incubação com TTBS-leite 5%. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-ERK1 (K23), anti- ERK fosforilado (E4), anti-H-RAS (C20), anti-K-RAS (F234) e anti- α -tubulin (B7) (Santa Cruz Biotechnology). O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado usando anticorpo secundário conjugado à peroxidase e o sistema ECL (do inglês *enhanced chemiluminescence*) (Amersham Biosciences).

3.2.5 Análise da expressão dos genes de diferenciação

Reação de Transcrição Reversa

RNA total foi isolado usando o reagente Trizol (Invitrogen). Os cDNAs foram gerados pela reação de transcrição reversa (RT), a partir de 3 μ g do RNA total, para cada reação com volume total de 20 μ L, na presença de 200 ng de hexâmeros randômicos (Invitrogen), 10U de inibidor de RNase (10U/ μ L), 0,1mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP mix 10 mM) e 400U de transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen). A reação foi levada ao termociclador a 21 °C por 10 min, 42 °C por 30 min e 99 °C por 10 min para geração do cDNA.

PCR quantitativo

Oligonucleotídeos foram desenhados com base no programa Primer Express (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA): *CCND1* (ciclina D1): 5'-CTGTGCATCTACACCGACAACCTC e 5'-CCAGGTTCCACTTGAGCTTGTT; *CDKN1A* (P21): 5'-CTGGAGACTCTCAGGGTCGAA e 5'-GGCGTTTGGAGTGGTAGAAATCT; *MYC*: 5'-TTCGGGTAGTGGAAAACCAG e 5'-TCCTGTTGGTGAAGCTAACG; *NKX2-1* (TITF1): 5'-GCCTGTCCACCTGAACT e 5'-ATAGCAAGGTGGAGCAGGACAT; *TG*: 5'-CCTGCTGGCTCCACCTTGTTT e 5'-CCTTGTTCTGAGCCTCCCATCGTT; *RPL19*: 5'-CTCATGGAACACATCCACAA e 5'-TGGTCAGCAGGAGCTTCTT.

Cada conjunto de *primers* senso e antisenso foi escolhido em éxons distintos para evitar a amplificação de DNA genômico. PCR foi realizado em triplicata com cDNA, 200 ou 300 nM de cada primer e SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) em termociclador Gene Amp ® 7300 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems). A expressão de cada gene

estudado foi normalizada com o gene *RPL19*. Os dados foram calculados com base programa QGENE (Simon, 2003).

3.2.6 Quantificação do microRNA *Let-7* maduro

A análise quantitativa de miRNAs maduros por PCR quantitativo foi utilizada de acordo com um estudo prévio (Raymond *et al.*, 2005). Na primeira etapa, um *primer* específico para o microRNA let-7 que apresenta uma cauda de sequência conhecida foi utilizado para converter o RNA em cDNA nas seguintes condições: 50 °C por 30 min e 85 °C por 5 min (5'-CATGATCAGCTGGGCCAAGAAACTATAC; sequência da cauda sublinhada). Posteriormente, o cDNA foi quantificado por PCR quantitativo utilizando-se uma combinação de um *primer* específico para o miRNA let-7f contendo ácidos nucleicos “trancados” (LNA, do inglês *locked nucleic acid*) (5'-T+GA+GGTAGTAGATTG, nucleotídeos trancados são precedidos por “+” na sequência), e um *primer* universal que é complementar a cauda (5'-CATGATCAGCTGGGCCAAGA). A modificação LNA estabiliza a conformação do grupo açúcar aumentando a afinidade de hibridização dos primers contendo a modificação (Petersen e Wengel, 2003). A amplificação deste cDNA quimérico foi monitorada por PCR quantitativo usando SYBR green nas seguintes condições: 50°C por 2 min, 95 °C por 15 min e 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 54 °C por 30 s e 72 ° por 30 s (Figura 7).

Figura 7. Esquema ilustrando o método utilizado para avaliar a expressão do microRNA let-7f1 maduro. A. No primeiro passo, o cDNA é sintetizado a partir do RNA total utilizando-se um *primer* específico para o microRNA let-7 (PGE, *primer* gene-específico) e que apresenta uma cauda de sequência conhecida. B. Esta molécula quimérica pode então ser quantificada a partir da combinação de um *primer* que é complementar a cauda (PU, *primer* universal) em conjunto com um *primer* específico para o microRNA (PA, *primer* antisense). Este *primer* antisense apresenta modificações LNA, que aumentam a sua especificidade (Adaptado de Raymond, 2005).

3.2.7 Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão e foram submetidas a análise de variância seguida de teste-t de Bonferroni. Diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação de mutações genéticas por espectrometria de massa

4.1.1 Detecção de alterações genéticas em linhagens celulares e tecidos humanos de câncer de tireóide

Espectrometria de massa foi utilizada para interrogar 111 mutações previamente associadas ao câncer em 16 diferentes genes. Além disso, os rearranjos gênicos *RET/PTC* e *PAX8/PPAR γ* foram avaliados por PCR quantitativo utilizando cDNA como *template*. A análise consistiu de 31 linhagens celulares de câncer de tireóide, 52 carcinomas primários (34 PDTC e 18 ATC) e 55 recidivas/metástases de 42 pacientes com carcinoma de tireóide refratário a iodo radioativo. Um total de 122 alterações genéticas foram encontradas correspondendo a 22 das 31 (71%) linhagens celulares, 26 dos 34 (76%) PDTC, 13 dos 18 (72%) ATC e 44 das 55 (80%) recidivas/metástases, incluindo rearranjos do gene *RET* e mutações pontuais nas regiões codificadoras de *RET*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *AKT1* e *MET*. Muitas das mutações encontradas pela análise de espectrometria de massa (9 *PIK3CA*, 9 *AKT1* e uma fração das linhagens e tumores *RAS* e *BRAF*-positivos) também foram analisados por sequenciamento Sanger. No geral, sequenciamento e espectrometria de massa foram concordantes em 100% para mutações *BRAF* e *RAS*. As mutações *PIK3CA* e *AKT1*, por outro lado, foram repetidamente perdidas quando analisadas por sequenciamento em 11% e 54% das amostras, respectivamente, indicando que a genotipagem utilizando MALDI-TOF foi mais sensível na busca por mutações. Produtos de PCR de amostras com mutações de *AKT1* e *PIK3CA* que foram perdidas pela abordagem de sequenciamento Sanger foram subclonados, transformados e cerca de 20 a 30 clones de cada produto foram sequenciados. Esta análise permitiu demonstrar que a mutação estava de fato presente nestas amostras e que a espectrometria de massa foi capaz de detectar até 8% (2 de 24 clones) de células mutantes em uma amostra (Figura 8).

Figura 8. Espectrometria de massa (esquerda) e sequenciamento Sanger (direita) de amostras com mutações de *NRAS*, *AKT1* e *PIK3CA*. Notar os picos selvagem e mutante de *NRAS* apresentando dimensão comparável, o que também se reflete no eletroferograma do sequenciamento convencional. Em contrapartida, os picos mutantes de *AKT1* e *PIK3CA* são relativamente menores, e perdidos pelo sequenciamento Sanger. Subclonagem e sequenciamento detectou 8 clones de 27 (29%) e 2 clones de 24 (8%) como sendo mutados para *AKT1* e *PIK3CA*, respectivamente. WT: selvagem; MUT: mutante.

Muitas das alterações encontradas nas linhagens celulares foram reportadas anteriormente, sendo úteis como controles positivos para a validação de ensaios mutacionais de nossa plataforma (Tabela 1).

Tabela 1. Alterações genéticas nas 31 linhagens celulares de câncer de tireóide estudadas.

Linhagem	RET/PTC	RET	BRAF	NRAS	HRAS	KRAS	PIK3CA	MET	Origem
TPC-1	RET/PTC1								PTC
TT		1902C>G (C634W)							MTC
MZCRC1		2753T>C (M918T)							MTC
T235			1799T>A (V600E) ⁺						ATC
T238			1799T>A (V600E) ⁺				1624G>A (E542K) ⁺		ATC
8505C			1799T>A (V600E)						ATC
OCUT-1			1799T>A (V600E)				3140A>G (H1047R)		ATC
SW1736			1799T>A (V600E)						ATC
Hth-104			1799T>A (V600E)						ATC
BHT101			1799T>A (V600E)						ATC
KTC-2			1799T>A (V600E) ⁺						ATC
BCPAP			1799T>A (V600E)						PTC
K1			1799T>A (V600E)				1633G>A (E545K)		PTC
KTC-1			1799T>A (V600E)						PTC
ACT-1				181C>A (Q61K)					ATC
Hth7				182A>G (Q61R) ⁺					ATC
TT2609-C02				182A>G (Q61R) ⁺					FTC
C643						37G>C (G13R)			ATC
Hth-112						181C>A (Q61K) ⁺			ATC
Hth-83						182A>G (Q61R)			ATC
Cal-62							34G>C (G12R)		ATC
ML1								3029C>T (T1010I) +	FTC
FTC133									FTC
FTC236									FTC
FTC238									FTC

Tabela 1.
(continuação)

Linhagem	<i>RET/PTC</i>	<i>RET</i>	<i>BRAF</i>	<i>NRAS</i>	<i>HRAS</i>	<i>KRAS</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>MET</i>	Origem
T241									ATC
T351									PDTC
FRO									ATC
Hth-74									ATC
KAT-18									ATC
TTA1									ATC

MTC: Carcinoma Medular da Tiróide (do inglês *medullary thyroid cancer*)
+ Alterações genéticas não reportadas previamente.

Mutações nas linhagens celulares não reportadas previamente na literatura incluem: *BRAF*_T1799A em T235, T238 e KTC2; *NRAS*_A182G em Hth7 e TT2609-C02; *HRAS*_C181A em Hth-112, *MET*_C3029T em ML1 e *PIK3CA*_G1624A em T238. Além de TPC-1, que conhecidamente apresenta o rearranjo *RET/PTC1*, e das linhagens de câncer medular de tiróide, TT e MZCRC1, que apresentam expressão endógena de *RET*, nenhuma outra célula apresentou expressão deste gene, indicando a ausência de rearranjos nas linhagens estudadas (Figura 9).

Figura 9. Avaliação da expressão do RNAm de RET em linhagens celulares de câncer de tiróide por PCR quantitativo para detecção de rearranjos *RET/PTC*. A expressão de RNAm de RET foi determinada por PCR quantitativo com *primers* amplificando éxons 12/13 do gene (comum a do tipo selvagem e rearranjos RET). A expressão de *RET* é elevada em células TPC1, que apresentam o rearranjo *RET/PTC1* e em linhagens celulares de câncer medular de tiróide, TT e MZCRC1, que têm níveis elevados de expressão endógena de *RET*. Nenhuma outra linhagem celular expressa RNAm de *RET*, indicando a ausência de rearranjos.

Vinte e uma das 31 (68%) linhagens de tiróide apresentaram uma alteração genética na via MAPK (para simplicidade, consideramos *RET*, *RAS* e *BRAF* como genes que codificam efetores da via MAPK, embora seja compreensível que *RET* e *RAS* também sinalizem através de outras vias), com *BRAF_T1799A* sendo a mais comum (11/31, 35%). As alterações MAPK foram mutuamente exclusivas nas linhagens celulares. Também encontramos 3 mutações do gene *PIK3CA* em linhagens celulares, que coincidiram com a mutação *BRAF* em todos os casos. Uma mutação *MET_C3029T* foi encontrada na linhagem de carcinoma folicular da tiróide ML1 e em um caso de ATC. A consequência funcional desta alteração no domínio justa-membrana de MET é controversa, uma vez que tem sido relatada como uma mutação somática que confere oncogenicidade e também como um polimorfismo germinativo (Schmidt *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2003). Duas linhagens celulares de mesotelioma pleural maligno apresentando esta mesma mutação foram especificamente sensíveis ao inibidor da tirosina quinase MET, SU11274, quando comparadas a células sem esta mutação (Jagadeeswaran *et al.*, 2006). Para testar se *MET_C3029T* é importante no crescimento celular de ML1, estas células foram tratadas com uma gama de concentrações de SU11274 ao longo de 7 dias. No entanto, a linhagem ML1 apresentou resistência a SU11274 ($IC_{50} > 10 \mu M$ (dados não mostrados)).

Recentemente, uma mutação ativadora de MEK1 (K57N) foi encontrada em 1% dos cânceres de pulmão. Esta mutação demonstrou capacidade de ativar a via MAPK e de conferir sensibilidade ao inibidor de MEK AZD6244 (Marks *et al.*, 2008). Nenhuma das linhagens celulares, tumores primários ou metastáticos apresentou essa mutação. Uma parcela das amostras (13 linhagens celulares de câncer de tiróide e 36 PDTC primários e metastáticos) também foram interrogados por mutações em 11 sítios adicionais nos éxons 11 e 15 de *BRAF*, bem como 26 alterações de *KIT* anteriormente encontrados em outros cânceres. Nenhuma destas mutações foi encontrada na análise, sugerindo que sejam ausentes ou incomuns neste tipo de câncer.

4.1.2 Genotipagem de PDTC e ATC primário

As alterações genéticas encontradas em PDTC e ATC primários são ilustradas na Figura 10.

A tabela 2 evidencia as alterações genéticas e derivações/fenótipos de ATC e PDTC.

Figura 10. Frequência mutacional de *BRAF*, *RET/PTC*, *NRAS*, *HRAS*, *KRAS* e *PIK3CA* em PDTC e ATC primários. Mutações *H-K-N-RAS* foram muito mais prevalentes em PDTC (44%) do que as mutações no gene *BRAF* (12%, $P = 0,002$). O histotipo mais agressivo (ATC) apresentou maior frequência de mutações *BRAF* (44%) do que PDTC (12%, $P = 0,02$). Rearranjos *RET/PTC* foram analisados nos casos selvagens para mutações de *BRAF* e *RAS*.

Tabela 2. Alterações genéticas encontradas em PDTC e ATC primários.

	<i>BRAF</i>	<i>NRAS</i>	<i>HRAS</i>	<i>KRAS</i>	<i>RET/PTC</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>MET</i>	Diagnóstico	Derivação/ Fenótipo
1	1799T>A (V600E)							ATC	TCV
2	1799T>A (V600E)							ATC	Desconhecido
3	1799T>A (V600E)							ATC	PTC
4	1799T>A (V600E)							ATC	TCV
5	1799T>A (V600E)							ATC	Desconhecido
6	1799T>A (V600E)							ATC	PTC
7	1799T>A (V600E)							ATC	TCV
8	1799T>A (V600E)					1633G>A (E545K)		ATC	TCV
9		182A>G (Q61R)						ATC	Desconhecido
10		182A>G (Q61R)						ATC	Desconhecido
11		182A>G (Q61R)						ATC	Desconhecido

Tabela 2. (continuação)

	<i>BRAF</i>	<i>NRAS</i>	<i>HRAS</i>	<i>KRAS</i>	<i>RET/PTC</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>MET</i>	Diagnóstico	Derivação/ Fenótipo
12			37G>C (G13R)					ATC	Desconhecido
13							3029C>T (T1010I)	ATC	Desconhecido
14								ATC	TCV
15								ATC	Desconhecido
16								ATC	PTC
17								ATC	Desconhecido
18								ATC	Desconhecido
1	1799T>A (V600E)					1624G>A (E542K)		PDTC	TCV
2	1799T>A (V600E)							PDTC	TCV
3	1799T>A (V600E)							PDTC	PTC
4	1799T>A (V600E)							PDTC	PTC
5		181C>A (Q61K)						PDTC	PTC
6		181C>A (Q61K)						PDTC	FTC
7		182A>G (Q61R)						PDTC	PTC
8		182A>G (Q61R)						PDTC	PTC
9		182A>G (Q61R)						PDTC	PTC
10		182A>G (Q61R)						PDTC	FTC
11		182A>G (Q61R)						PDTC	PTC
12		182A>G (Q61R)						PDTC	PTC
13		182A>G (Q61R)						PDTC	PTC
14			181C>A (Q61K)					PDTC	PTC
15			181C>A (Q61K)					PDTC	PTC
16			182A>G (Q61R)					PDTC	FTC
17				182A>G (Q61R)				PDTC	PTC

Tabela 2. (continuação)

	<i>BRAF</i>	<i>NRAS</i>	<i>HRAS</i>	<i>KRAS</i>	<i>RET/PTC</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>MET</i>	Diagnóstico	Derivação/ Fenótipo
18				182A>G (Q61R)				PDTC	FTC
19				182A>G (Q61R)				PDTC	HTC
20					RET/PTC			PDTC	PTC
21					RET/PTC3			PDTC	PTC
22					RET/PTC			PDTC	PTC
23					RET/PTC			PDTC	HTC
24					RET/PTC			PDTC	PTC
25					RET/PTC			PDTC	PTC
26						3140A>G (H1047R)		PDTC	PTC
27								PDTC	FTC
28								PDTC	PTC
29								PDTC	HTC
30								PDTC	PTC
31								PDTC	FTC
32								PDTC	HTC/PTC
33								PDTC	FTC
34								PDTC	PTC

(conclusão)

Oito dos 18 ATC eram derivados de PTC (4 TCV e 4 WD), enquanto 10 eram de origem desconhecida. O fenótipo dos PDTC foi o seguinte: 23/34 PTC (2 TCV e 21 WD), 7/34 FTC, 3/34 carcinoma de células Hürthle (HCC, do inglês *hurthle cell carcinoma*) e 1/34 misto HCC/PTC (Tabela 2). Alterações da via MAPK estavam presente em 25 dos 34 (74%) PDTC e em 12 dos 18 (67%) ATC. As mutações *H-K-N-RAS* foram muito mais prevalentes em PDTC (44%) do que as mutações do gene *BRAF* (12%, $P = 0,002$). Além disso, pacientes com PDTC positivos para as mutações de *RAS* apresentaram uma sobrevida média de 6,6 anos em comparação com 3,3 anos de pacientes com mutações *BRAF* ($P = 0,08$). De acordo, PDTC com mutações em *BRAF* foram associados com extensão extra-tiroidiana ($P = 0,04$), enquanto mutações *RAS* apresentaram robusta associação com ausência de extensão extra-tiroidiana ($P = 0,002$), coerente com um papel oposto destes oncogenes no prognóstico de PDTC. Embora pacientes com ATC apresentem sobrevida diminuta independentemente do genótipo, mutações *BRAF* foram mais comuns neste histotipo agressivo (44%) do que em PDTC (12%, $P = 0,02$). Seis dos 34 (17%) PDTC apresentaram aumento na expressão dos éxons 12/13 quando comparados aos éxons 10/11. Em um dos casos a presença de um rearranjo *RET/PTC3* foi confirmada, enquanto os outros provavelmente apresentam rearranjos do gene *RET* diferentes de *RET/PTC1*, *RET/PTC2* ou *RET/PTC3* (Figura 11).

Tumores apresentando rearranjos do gene *RET* não foram associados com diferenças na sobrevida em comparação com outros grupos, embora tenham sido associados à extensão extra-tiroidiana ($P = 0,01$). Cinco casos positivos para *RET/PTC* eram provenientes de PTC e um de carcinoma de células Hürthle. Nenhum dos ATC mostrou rearranjos do gene *RET* e nenhum dos PDTC ou ATC apresentou rearranjos *PAX8/PPAR γ* .

Figura 11. Avaliação da expressão de RNAm de *RET* em PDTC e ATC primários por PCR quantitativo para detecção de rearranjos *RET/PTC*. **A.** Expressão relativa dos éxons 10/11 e 12/13 de *RET*, que ladeiam o ponto de quebra do rearranjo no intron 11, para avaliar a presença de rearranjos *RET/PTC* em tumores de tiróide. Conforme esperado, não houve diferença na expressão relativa dos éxons 10/11 e 12/13 em tecido normal (N106), bócio (T324) ou nas linhagens de câncer medular da tiróide (TT e MZCRC1). No entanto, a expressão desequilibrada é observada em uma amostra tumoral derivada de camundongo imunodeficiente injetado com células TPC-1. **B.** Seis PDTC apresentaram expressão desequilibrada de *RET* (éxons 10/11 < éxons 12/13; P14, F32, P40, F7, F20 e F9), indicando a presença do rearranjo.

4.1.3 Histologia e genótipo de recidivas e metástases de câncer de tireóide RAIR

Cinquenta e cinco recidivas e metástases de 42 pacientes com doença RAIR foram analisadas. Estas foram subdivididas histologicamente como se segue: PDTC: 32/55 (58%); TCV-PTC: 12/55 (22%); WD-PTC: 7/55 (13%); HCC: 3/55 (5%) e ATC: 1/55 (2%). Trinta e três dos 42 (79%) pacientes e 44 das 55 (80%) amostras tinham pelo menos uma mutação. Mutação no gene *BRAF* foi a mais freqüente, sendo encontrada isoladamente ou associada a outras mutações em 62% das amostras, seguida por *AKT1* (16%), *RAS* (13%), *PIK3CA* (5%) e *RET/PTC* (4%). A freqüência de cada mutação nas amostras de recidivas/metástases e o subtipo histológico são mostrados na Tabela 3. Mutação no gene *BRAF* foi a alteração genética mais comum em PDTC (15/32, 47%) e PTC (18/19, 95%), este último incluindo WD-PTC e TCV-PTC. A comparação dos genótipos de recorrências ou metástases nodais com metástases distantes não revelou nenhuma diferença significativa.

4.1.4 Histologia e genótipo de recidivas/metástases de pacientes apresentando câncer de tireóide RAIR, FDG-PET positivo

A Tabela 4 mostra o histotipo e o genótipo das 35 recidivas/metástases RAIR que foram FDG-PET positivos (PET scan feito dentro de 2 anos após biópsia/ressecção). Essas amostras eram provenientes de 35 diferentes pacientes. Nas recidivas/metástases PET positivas, *BRAF* foi a mutação genética mais freqüente, estando presente em 19/35 (54%) das amostras, seguido por *RAS* (11%). Mutações *BRAF* foram detectadas em todos os 9 (100%) PTC e em 9 dos 23 (39%) PDTC recorrentes/metastáticos PET positivos. Todas as 13 (100%) recidivas/metástases PET positivas que contêm quantidade significativa de células altas (TCV-PTC e PDTC com células altas) apresentavam mutações *BRAF*, enquanto apenas 6 dos 22 (27%) dos tumores FDG-PET positivos sem lesões características de células altas exibiram mutações *BRAF* ($p = 0,00002$). Uma inversão na freqüência de mutações *BRAF* e *RAS* foi observada ao comparar-se PDTC primário com os PDTC metastáticos RAIR, FDG-PET positivos. Como mencionado anteriormente, mutações

RAS são mais de 3 vezes mais comuns em PDTC primários que *BRAF* (44% contra 12%, $P = 0,002$). Em contrapartida, mutações *BRAF* são 3 vezes mais frequentes que *RAS* nos PDTC PET positivos (39% contra 13%, $P = 0,04$) (Figura 12). Um rearranjo *RET/PTC2* e um *RET/PTC3* foram encontradas entre os PDTC PET positivos. Estas foram as únicas alterações encontradas de *RET* em todos as 55 recidivas/metástases RAIR (Figura 13).

Figura 12. Frequência mutacional de *BRAF*, *RET/PTC*, *NRAS*, *HRAS*, *KRAS*, *AKT1* e *PIK3CA* em 34 PDTC primários e 23 PDTC recorrentes/metastáticos RAIR, FDG-PET positivos. Mutações *RAS* são significativamente mais prevalente do que as *BRAF* nos PDTC primários ($P = 0,002$). Mutações *BRAF* são mais prevalentes do que as *RAS* nos PDTC RAIR PET positivo ($p = 0,04$). Rearranjos *RET/PTC* foram analisados nos casos negativos para alterações de *BRAF* e *RAS*.

Figura 13. Avaliação da expressão de RNAm de *RET* em lesões recorrentes/metastáticas por PCR quantitativo para detecção de rearranjos *RET/PTC*. Análise da expressão relativa dos éxons 10/11 e 12/13 de *RET*, que ladeiam o ponto de quebra do rearranjo no intron 11, para avaliar a presença de rearranjos *RET/PTC* em tumores de tiróide. A expressão desequilibrada foi observada em 2 amostras de PDTC RAIR, PET positivos (M11 and M37), indicando a presença do rearranjo.

Tabela 3. Histologia e genótipo de 55 amostras de recidivas/metástases derivadas de 42 pacientes com carcinomas tireoidiano RAIR

<i>Histotipo</i>		<i>BRAF</i>	<i>BRAF-AKT1</i>	<i>BRAF-PIK3CA</i>	<i>BRAF-NRAS</i>	<i>BRAF Total</i>	<i>NRAS</i>	<i>HRAS</i>	<i>RET/PTC</i>	<i>AKT1</i>	<i>Desconhecido</i>
WD-PTC	7 (13%)	4 (57%)	-	1 (14%)	1 (14%)	6 (85%)	1 (14%)	-	-	-	-
TCV-PTC	12 (22%)	10 (83%)	2 (17%)	-	-	12 (100%)	-	-	-	-	-
HCC	3 (5%)	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (33%)	2 (67%)
PDTC	32 (58%)	9 (28%)	5 (16%)	1 (3%)	-	15 (47%)	3 (9%)	2 (6%)	2 (6%)	1 (3%)	9 (28%)
ATC	1 (2%)	-	-	1 (100%)	-	1 (100%)	-	-	-	-	-
Total	55 (100%)	23 (42%)	7 (13%)	3 (5%)	1 (2%)	34 (62%)	4 (7%)	2 (4%)	2 (4%)	2 (4%)	11 (20%)

Tabela 4. Histologia e genótipo de 35 amostras de recidivas/metástases derivadas de 35 pacientes com carcinoma tireoidiano RAIR PET positivo

Histotipo		<i>BRAF</i>	<i>BRAF-AKT1</i>	<i>BRAF-PIK3CA</i>	<i>BRAF-NRAS</i>	<i>BRAF Total</i>	<i>NRAS</i>	<i>HRAS</i>	<i>RET/PTC</i>	<i>AKT1</i>	Desconhecido
WD-PTC	4 (11%)	3 (75%)	-	-	1 (25%)	4 (100%)	-	-	-	-	-
TCV-PTC	5 (14%)	5 (100%)	-	-	-	5 (100%)	-	-	-	-	-
HCC	2 (6%)	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (50%)	1 (50%)
PDTC	23 (66%)	6 (26%)	3 (13%)	-	-	9 (39%)	2 (9%)	1 (4%)	2 (9%)	1 (4%)	8 (35%)
ATC	1 (3%)	-	-	1 (100%)	-	1 (100%)	-	-	-	-	-
Total	35 (100%)	14 (40%)	3 (8%)	1 (3%)	1 (3%)	19 (54%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (6%)	2 (6%)	9 (26%)

WD: Bem diferenciado; PTC: Carcinoma papilífero da tireóide; TCV: Variante de células altas; HCC: Carcinoma de células de Hurthle; PDTC: Carcinoma pouco diferenciado da tireóide, ATC: Carcinoma anaplásico de tireóide.

4.1.5 Correlações histopatológicas e moleculares em pacientes com múltiplos tumores

Doze pacientes tiveram múltiplas amostras genotipadas e a distribuição de seus histotipos/genótipos é mostrada na Tabela 5.

Tabela 5. Histotipo and genótipo de 12 pacientes com múltiplos tumores

Paciente	Idade, sexo	Primary	Rec/met #1	Rec/met #2	Rec/met #3	BRAF/RAS	PIK3CA/AKT1
1	65, F	PDTC <i>BRAF1799T>A</i>	PDTC <i>BRAF1799T>A</i>	PDTC <i>BRAF1799T>A</i>	NA	Concordante	NA
2	78, F	PDTC <i>BRAF1799T>A</i>	PDTC <i>BRAF1799T>A</i>	PDTC <i>BRAF1799T>A</i>	NA	Concordante	NA
3	49, M	TCV PTC <i>BRAF1799T>A</i>	TCV PTC <i>BRAF1799T>A</i>	TCV PTC <i>BRAF1799T>A</i>	NA	Concordante	NA
4	85, F	TCV PTC <i>BRAF1799T>A</i>	PDTC <i>BRAF1799T>A</i>	TCV PTC <i>BRAF1799T>A</i>	NA	Concordante	NA
5	61, M	NA	HCC <i>AKT149G>A</i>	HCC Sem mutações	NA	NA	Discordante
6	81, F	NA	PDTC <i>BRAF1799T>A</i> <i>AKT149G>A</i>	PDTC <i>BRAF1799T>A</i> <i>AKT149G>A</i>	NA	Concordante	Concordante
7	67, F	NA	PDTC <i>NRAS182A>G</i>	PDTC <i>NRAS182A>G</i>	NA	Concordante	NA
8	65, F	NA	PDTC Sem mutações	PDTC Sem mutações	NA	NA	NA
9	58, M	NA	PDTC <i>BRAF1799T>A</i> <i>PIK3CA1624G>A</i> ¶	TCV PTC <i>BRAF1799T>A</i>	NA	Concordante	Discordante
10	49, F	NA	TCV PTC <i>BRAF1799T>A</i>	TCV PTC <i>BRAF1799T>A</i> <i>AKT149G>A</i>	NA	Concordante	Discordante
11	25, M	NA	WD PTC <i>BRAF1799T>A</i> <i>PIK3CA1624G>A</i>	TCV PTC <i>BRAF1799T>A</i>	NA	Concordante	Discordante
12	25, F	NA	PDTC <i>HRAS37G>T</i>	PDTC <i>RET/PTC2</i>	PDTC <i>BRAF1799T>A</i> <i>AKT149G>A</i>	Discordante	Discordante

WD: Bem diferenciado; PTC: Carcinoma papilífero da tireóide; TCV: Variante de células altas; HCC: Carcinoma de células de Hurthle; PDTC: Carcinoma pouco diferenciado da tireóide; NA: Não se aplica.

Para confirmar que amostras do mesmo paciente derivadas de múltiplos sítios tumorais foram propriamente categorizadas e pertenciam de fato ao mesmo indivíduo, o DNA genômico das diferentes amostras foi submetido a um painel de 42 SNPs para tipagem do DNA utilizando-se espectrometria de massa. Amostras de um mesmo paciente apresentando diferentes tipagens foram removidas do estudo.

Se considerarmos apenas alterações dos genes que codificam efetores da via MAPK, 9 dos 10 (90%) pacientes tinham genótipo concordante entre as diferentes amostras. Um paciente teve a mesma mutação *RAS* em dois sítios metastáticos. Mutações *BRAF* estavam presentes em 9 pacientes. Em 8 destes (89%), as mutações *BRAF* estavam presentes em todos os sítios tumorais testados (Figura 14).

Figura 14. Genótipo de múltiplos sítios tumorais tireoidianos derivados de um paciente com câncer de tireóide RAIR, FDG-PET positivo. **A.** Histologia do tumor primário mostrando TCV-PTC. **B.** Histologia de TCV-PTC metastático no pulmão 15 meses após o diagnóstico. **C.** Histologia de TCV-PTC metastático no linfonodo supraclavicular direito desenvolvido 10 anos após a remoção do tumor primário. **D, E, F.** Análise por espectrometria de massa evidenciando o pico mutante (setas) de *BRAF* no tumor primário (A), primeira (B) e segunda (C) reincidência. **G.** FDG-PET scan da segunda reincidência mostrando lesão PET positiva (seta vermelha) na região supraclavicular direita correspondente à foto C.

Curiosamente, o único paciente que apresentou genótipos discordantes em efetores da via MAPK nos múltiplos tumores analisados, tinha 3 alterações genéticas distintas nos 3 diferentes sítios testados: *HRAS_G37T*, *BRAFT_1799A* e *RET/PTC2*. Quatro dos 12 pacientes com múltiplas amostras também tinham amostras do tumor primário. Todos os

Ensaio de genotipagem para análise de mutações específicas na via PI3K, previamente descobertas como parte do resequenciamento sistemático de genomas de outros cânceres, foram desenhados para avaliar um potencial envolvimento destas no câncer de tiróide: (RHEB_E139K, RPS6KA3_I416V, RPS6KB1_G289E, PIK3R5_R28C, PRKCB_S514F, IKBKB_A360S, IKBKB_Q611, FRAP1_P2476L, FRAP1_S2215Y) (Greenman *et al.*, 2007; Wood *et al.*, 2007). Nenhuma das amostras apresentou mutações nestes sítios específicos. A tabela 6 resume todas as informações com relação as alterações genéticas, histologia, PET *status* e sítio tumoral das 55 recidivas/metástases de 42 pacientes com câncer de tiróide RAI.

Tabela 6. Alterações genéticas, histologia, PET *status* e sítio tumoral de 55 recidivas e metástases de 42 pacientes com câncer de tiróide RAI.

	<i>BRAF</i>	<i>NRAS</i>	<i>HRAS</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>AKT1</i>	<i>RET/PTC</i>	Histologia	FDG-PET*	Local da Recidiva/Metástase
1	1799T>A (V600E)			1633G>A (E545K)			ATC	Positivo	Recidiva no tecido mole do pescoço
2							HCC	Positivo	Pulmão
3					49G>A (E17K)		HCC	Positivo	Recidiva no tecido mole do pescoço
							HCC		Recidiva no tecido mole do pescoço
4			182A>G (Q61R)				PDTC	Positivo	Osso
5					49G>A (E17K)		PDTC	Positivo	Recidiva no tecido mole do pescoço
6	1799T>A (V600E)				49G>A (E17K)		PDTC com células altas	Positivo	Recidiva na traquéia
7						RET/PTC2	PDTC	Positivo	Linfonodo cervical
			37G>T (G13C)				PDTC		Linfonodo mediastinal
	1799T>A (V600E)				49G>A (E17K)		PDTC		Linfonodo cervical
8							PDTC	Positivo	Parede torácica
9							PDTC	Positivo	Osso
10	1799T>A (V600E)				49G>A (E17K)		PDTC com células altas	Positivo	Recidiva no tecido mole do pescoço
	1799T>A (V600E)				49G>A (E17K)		PDTC com células altas		Pele
11							PDTC	Positivo	Recidiva no tecido mole do pescoço
12		182A>G (Q61R)					PDTC		Recidiva na traquéia
		182A>G (Q61R)					PDTC	Positivo	Linfonodo mediastinal

Tabela 6. (continuação)

13			PDTC PDTC	Positivo	Pulmão Cérebro
14	1799T>A (V600E)		PDTC com células altas	Positivo	Linfonodo cervical
15			PDTC	Positivo	Linfonodo cervical
16	1799T>A (V600E)		PDTC		Pulmão
17	1799T>A (V600E)	49G>A (E17K)	PDTC	Positivo	Osso
18	1799T>A (V600E)		PDTC com células altas		Pele
	1799T>A (V600E)		PDTC com células altas	Positivo	Linfonodo cervical
19	1799T>A (V600E)		PDTC com células altas	Positivo	Recidiva no tecido mole do pescoço
	1799T>A (V600E)		PDTC com células altas		Linfonodo cervical
20			PDTC	Positivo	Linfonodo cervical
21		RET/PTC3	PDTC	Positivo	Recidiva no tecido mole do pescoço
22	1799T>A (V600E)		PDTC com células altas	Positivo	Linfonodo cervical
	1799T>A (V600E)		TCV-PTC		Linfonodo cervical
23	1799T>A (V600E)		PDTC com células altas	Positivo	Recidiva no esôfago
24	1799T>A (V600E)		PDTC com células altas	Positivo	Linfonodo cervical
25	182A>G (Q61R)		PDTC	Positivo	Recidiva no tecido mole do pescoço
26			PDTC	Positivo	Linfonodo cervical
27			PDTC	Positivo	Linfonodo cervical
28	1801*>G (K601E)		WD-PTC	Positivo	Osso
29	1799T>A (V600E)		TCV-PTC		Linfonodo cervical
30	1799T>A (V600E)		WD-PTC		Cérebro
31	182A>G (Q61R)		WD-PTC		Linfonodo cervical
32	1799T>A (V600E)		WD-PTC	Positivo	Linfonodo mediastinal
33	1799T>A (V600E)	181C>A (Q61K)	WD-PTC	Positivo	Tecido mole da pélvis
	1799T>A (V600E)		WD-PTC	Positivo	Linfonodo cervical
34	1799T>A (V600E)	49G>A (E17K)	TCV-PTC		Linfonodo cervical

	1799T>A (V600E)	1624G>A (E542K)	WD-PTC		Linfonodo cervical
35	1799T>A (V600E)		TCV-PTC	Positivo	Linfonodo cervical
36	1799T>A (V600E)		TCV-PTC	Positivo	Pulmão
37	1799T>A (V600E)		TCV-PTC		Linfonodo cervical
	1799T>A (V600E)		TCV-PTC	Positivo	Recidiva no tecido mole do pescoço
38	1799T>A (V600E)		TCV-PTC	Positivo	Recidiva no tecido mole do pescoço
39	1799T>A (V600E)	1624G>A (E542K)	PDTC com células altas		Linfonodo cervical
	1799T>A (V600E)		TCV-PTC		Linfonodo cervical
40	1799T>A (V600E)		TCV-PTC	Positivo	Linfonodo cervical
41	1799T>A (V600E)		TCV-PTC		Osso
42	1799T>A (V600E)	49G>A (E17K)	TCV-PTC		Pulmão
(conclusão)					

4.2 Avaliação da função do miRNA let-7 no câncer de tiróide

4.2.1 Efeito de *RET/PTC3* na expressão de *let-7* em células de tiróide de rato *PCCL3*

Para determinar se a expressão do miRNA let-7 é modulada pelo oncogene *RET/PTC*, utilizamos a linhagem PTC3-5, células de tiróide de rato PCCL3 modificadas para obter expressão de *RET/PTC3* após indução por doxíciclina. O tratamento das células PTC3-5 com doxíciclina por 72 horas foi eficaz na indução da expressão de *RET/PTC* (Figura 16A). Adicionalmente, observamos que a indução da expressão deste oncogene em células PTC3-5 leva à uma acentuada redução (76%) na expressão do miRNA let-7 (Figura 16B). Por outro lado, a indução do oncogene *BRAF* após tratamento com doxíciclina por 72 horas em células PCCL3 (Fig. 17A) não modulou a expressão do miRNA let-7 (Figura 17B).

Figura 16. Efeito da ativação constitutiva do oncogene *RET/PTC3* na expressão do miRNA let-7. A. Foto representativa mostrando a indução do RNAm de *RET/PTC3* após tratamento com doxíciclina por 72 horas. B. A indução de *RET/PTC3* reduz a expressão do miRNA let-7 em células PTC3-5.

Figura 17. Efeito da ativação constitutiva do oncogene *BRAF* na expressão do miRNA let-7. A. Indução de *BRAF* em células PCCL3 após tratamento com doxíciclina por 72 horas. B. Expressão de let-7 não é modulada após indução de *BRAF*.

4.2.2 Efeitos de let-7 na via de sinalização MAPK em células TPC-1

A constatação de que a expressão de let-7 é diminuída após a indução de *RET/PTC* nos levou a explorar a possível contribuição da expressão forçada deste miRNA em células de carcinoma papilífero da tireóide. Células TPC-1, que apresentam espontaneamente a expressão de *RET/PTC1*, foram transfectadas com um vetor de expressão contendo o miRNA maduro de let-7f1, sob o controle do promotor H1-RNA polimerase III (Takamizawa *et al.*, 2004a). PCR quantitativo foi realizado para avaliar a expressão do miRNA let-7f maduro em clones estáveis de TPC-1 controle (CTR) e TPC-1 let-7. Let-7 apresentou uma expressão basal nas

células TPC-1 CTR que foi substancialmente aumentada após a transfecção de let-7f (Figura 18A). Em função dos efeitos biológicos mediados por *RET/PTC* dependerem da ativação sequencial da via *RET/PTC>RAS>BRAF>ERK*, os níveis de fosforilação de ERK foram avaliados. Como esperado, a indução de let-7 foi capaz de diminuir a fosforilação da proteína ERK nas células TPC-1 (Figura 18B). Curiosamente, a avaliação dos níveis protéicos de KRAS e HRAS, conhecidos alvos deste miRNA, não foram alterados após indução de let-7 (Figura 18B).

Figura 18. Expressão forçada do miRNA let-7 em células TPC-1 e efeitos na expressão de efetores da via MAPK. **A.** Dados de PCR quantitativo mostrando a expressão do miRNA let-7 em células TPC-1 após transfecção estável com pH1-RNApuro-CTR e pH1-RNApuro-let-7f-1. **B.** Expressão protéica de KRAS, HRAS, ERK fosforilado (p-ERK), ERK1/2 total and tubulina- α . A fosforilação de ERK é diminuída após indução de let-7. A expressão de HRAS e KRAS não apresentou mudanças significativas.

4.2.3 Efeito do miRNA let-7 no crescimento celular de TPC-1

Teste MTT foi realizado a fim de analisar uma potencial associação de let-7 com o crescimento celular de TPC1. A expressão forçada de let-7 inibiu marcadamente a proliferação das células TPC-1 em 55% (Figura 19). A avaliação da expressão de genes envolvidos no ciclo celular revelou que let-7 foi capaz de inibir a expressão do RNAm de genes estimuladores do ciclo celular como *MYC* (17%) e *CCND1* (14%). Por outro lado, este pequeno RNA aumentou os níveis de RNAm de *CDKN1A* (18%), um gene que funciona como inibidor do ciclo celular (Figura 20).

Figura 19 – Efeito do miRNA let-7 na proliferação das células TPC-1. 8×10^3 células CTR ou Let-7 foram plaqueadas e mantidas em crescimento até atingirem semi-confluência, e posteriormente incubadas com MTT por 3 horas. Células TPC-1 let-7 apresentaram redução no crescimento celular quando comparadas às células CTR.

Figura 20. Efeito do miRNA let-7 na expressão de genes do ciclo celular. Células TPC-1 Let-7 apresentaram uma redução na expressão de estimuladores do ciclo celular *CCND1* e *MYC* e aumento na expressão do inibidor do ciclo, *CDKN1A* (p21).

4.2.4 Efeitos de let-7 na expressão de genes específicos da tiróide

A expressão de marcadores moleculares da diferenciação tiroidiana, *TITF1*, *TG* e *NIS* foi avaliada. Let-7 induziu um aumento de 3 vezes na expressão do RNAm de *TITF1* e também um ligeiro aumento na expressão transcricional de *TG* quando comparada as células controle (Figura 21). A expressão de *NIS*, no entanto, não foi detectada mesmo com a superexpressão de let-7 (dados não mostrados).

Figura 21. Efeito do miRNA let-7 na expressão de genes de diferenciação tiroidianos. Células TPC-1 Let-7 apresentaram aumento na expressão do fator de transcrição tiroidiano *TITF1* e um ligeiro aumento do gene específico da tiróide, *TG*. A expressão de *NIS* não foi detectada.

5 DISCUSSÃO

A caracterização genética de amostras tumorais de pacientes para mutações de genes envolvidos na patogênese do câncer fornece informações prognósticas e, em alguns casos, prediz resposta a terapias específicas. Com este fim, a viabilidade da utilização de espectrometria de massa MALDI-TOF para genotipagem em larga escala foi recentemente demonstrado em um estudo de vários tipos tumorais (Thomas *et al.*, 2007). O perfil oncogênico de mutações no carcinoma bem diferenciado da tiróide tem sido estudado extensivamente. Em contrapartida, existem poucos estudos caracterizando alterações genéticas das formas mais avançadas da doença, PDTC e ATC. Além disso, o perfil mutacional de amostras de câncer de tiróide primário e metastático que são refratários a radioiodoterapia, e FDG-PET positivos, são os tipos de tumor com maior probabilidade de necessitar de tratamento com inibidores de quinase. Estes cânceres avançados frequentemente apresentam características que alteram a sensibilidade da detecção da mutação, tais como alterações de ploidia, infiltração com estroma ou células imunitárias, que em PDTC e ATC podem ser bastante extensa (Ryder *et al.*, 2008). Neste trabalho nós mostramos que alterações genéticas presentes em pelo menos 8% das células em uma amostra tumoral foram detectáveis por espectrometria de massa, embora não tenham sido alcançadas por seqüenciamento convencional. Assim, este método permitiu a detecção de um grande número de alterações genéticas encontradas no câncer da tiróide com alta capacidade e sensibilidade melhorada, produzindo uma visão mais abrangente das anormalidades oncogênicas presentes em formas avançadas da doença.

A definição histológica de PDTC é controversa, e os poucos estudos tentando esclarecer as alterações moleculares nesta doença mostram informações conflitantes. A nossa análise mostra que PDTC com mutações *BRAF* ou *RAS* apresentam comportamento biológicos e clínicos distintos. Está bem estabelecido que a mutação do gene *BRAF* está associada com pior prognóstico no câncer de tiróide bem diferenciado (revisto em (Xing, 2007)), e agora, nós demonstramos que isso também se aplica a PDTC. Análises prévias de mutações no gene *RAS* em WDTC e PDTC mostram uma associação deste oncogene com pior prognóstico e comportamento agressivo (Garcia-Rostan *et al.*, 2003). Apesar deste trabalho não ter estudado mutações em *BRAF*, o prognóstico negativo associado a *RAS* em PDTC não é coerente com a nossa observação. Este estudo constatou uma alta prevalência de mutações

no gene *KRAS* em PDTC, enquanto a maioria das mutações *RAS* em nosso estudo fora, encontradas na isoforma *NRAS*. Consideramos os resultados de nossos experimentos consistentes, uma vez que três ensaios independentes interrogando a alteração *NRAS_Q61R* foram utilizados, e muitos casos positivos foram também seqüenciados. Além disso, a maioria dos testes de genotipagem para *KRAS* códons 12 (G12V, G12D, G12A, G12S, G12R) e 13 (G13D) foram testados em um grande conjunto de tumores colorretais com controles positivos para estas alterações. Os resultados do nosso grupo são compatíveis com a predileção de mutações *NRAS*, em oposição a *KRAS*, no câncer da tireóide, compilada no banco de dados de mutações somáticas no câncer: COSMIC. O prognóstico diferencial de pacientes portadores de câncer com mutações *BRAF* e *NRAS* também foi observada em melanomas, que também apresentam uma alta prevalência de mutações *BRAF* e *NRAS* (Ugurel *et al.*, 2007). Apesar de mutações no gene *RAS* indicarem um melhor prognóstico para PDTC, estes pacientes ainda apresentam uma sobrevida média relativamente curta (6,6 anos) e, portanto, as estratégias terapêuticas contra *RAS* nesta doença são claramente necessárias. Estudos clínicos em andamento para cânceres *RAS*-positivos têm utilizado inibidores de farnesiltransferase para impedir a prenilação desta oncoproteína, evento necessário para sua associação à membrana. No entanto, *NRAS*, a isoforma mais comumente envolvida em câncer de tireóide, e *KRAS* apresentam recursos alternativos de associação à membrana que podem contornar a ação deste inibidor. Além disso, diferentes trabalhos já mostraram que células de tireóide com mutações de *RAS* apresentam resposta limitada para inibidores de MEK (Bedogni *et al.*, 2006; Downward, 2008). Esta resposta limitada pode ser adquirida por mutações adicionais em outras vias de sinalização ou pelo fato de que o próprio *RAS* seja capaz de ativar a via PI3K. De fato, estudos pré-clínicos recentes demonstraram que a combinação de inibidores das vias MAPK e PI3K/AKT/mTOR é mais eficaz no tratamento tumoral do que simples quimioterapia, abrindo novas e promissoras estratégias terapêuticas para pacientes portadores dessas mutações (Bedogni *et al.*, 2006; Engelman *et al.*, 2008).

As mutações do gene *BRAF* constituem o evento oncogênico mais freqüente em pacientes com recidiva e carcinoma metastático da tireóide RAIR, estando presente em 62% das amostras tumorais neste estudo. Mutação *BRAF* também foi encontrada na maioria (19/35, 54%) das recidivas/metástases RAIR, FDG-PET positivas. Exceto por uma amostra com uma alteração K601E, todas as mutações *BRAF* envolveram o nucleotídeo T1799 (mutação V600E), congruente com a vasta literatura sobre o assunto. A diferença na

prevalência de mutações *BRAF* entre tumores RAIR e carcinomas da tiróide, em geral, é ainda mais acentuada quando se comparam estes 2 grupos por histotipo. Na verdade, 100% dos PTC RAIR, FDG-PET positivos neste estudo foram *BRAF* positivo. Essa frequência representa um grande aumento, quando comparado com os 45% das mutações *BRAF* encontrados em PTC em geral, e sugere que a mutação *BRAF* apresenta relação causal no desenvolvimento de refratariedade à radioiodoterapia em PTC. A elevada proporção de mutações *BRAF* encontradas neste estudo é coerente com as conclusões de um estudo anterior, de 13 casos de PTC RAIR, em que 10 dos 13 (77%) apresentavam essa mutação (Mian *et al.*, 2008). A prova de causalidade é apoiada pelo fato de que a ativação condicional de *BRAF*^{V600E} diminui a expressão do gene *NIS* (transportador responsável pela captação do iodeto para o interior do tirócito) em células da tiróide, *in vitro* (Mitsutake *et al.*, 2005). Além disso, câncer de tiróide com mutações *BRAF* demonstram uma redução drástica do RNAm de *NIS* quando comparados com tumores sem alterações genéticas identificáveis ou mesmo apresentando outras mutações (Durante *et al.*, 2007). Desta forma, nosso trabalho é o primeiro relato de uma alta prevalência de mutações no gene *BRAF* em tumores com evidência de perda funcional da avidéz por iodo radioativo. Em PDTC RAIR, FDG-PET positivo as mutações do gene *BRAF* foram identificadas em 39% das amostras, enquanto *BRAF* é significativamente menos frequente (12%) nos PDTC primários, que mais comumente apresentam mutações do gene *RAS* (44%). Independentemente dos mecanismos responsáveis pela reduzida captação do iodo radioativo em tumores *BRAF*-positivos, a alta frequência desta mutação em tumores RAIR, FDG-PET positivos posicionam *BRAF* como um alvo atraente para a terapia, seja para induzir a morte celular e/ou restaurar a captação de radioiodo. O potencial sucesso terapêutico dessa estratégia é dependente de que todos os tumores metastáticos ou recorrentes no mesmo paciente apresentem este mesmo defeito genético. Há boas evidências de que mutações *BRAF* sejam eventos precoce no desenvolvimento do câncer de tiróide (revisto em (Fagin, 2004)), e provável que sejam necessárias para a viabilidade de todos os subclones do tumor primário. No entanto, indícios de heterogeneidade genética no câncer da tiróide foram recentemente relatados, especialmente entre diferentes tumores primários em PTC multifocais (Zhu *et al.*, 2006; Giannini *et al.*, 2007), bem como entre tumores primários e metástases linfonodais regionais (Oler *et al.*, 2005). Tentamos abordar esta questão no câncer de tiróide RAIR analisando pacientes do qual tivemos vários espécimes tumorais. Oito de 9 pacientes com câncer apresentando mutações de *BRAF* tinham a mesma mutação *BRAF* em todos os tumores

testados. Quatro destes 9 pacientes também tinham tumores primários, e em todos eles a mutação *BRAF* encontrada no tumor primário também esteve presente em todas as metástases analisadas. A presença da mutação *BRAF* em múltiplas amostras de pacientes com doença avançada fornece evidência adicional de que esta alteração é um evento inicial na carcinogênese da tiróide e aumenta a probabilidade de que esses tumores sejam “viciados” em *BRAF*. Um estudo anterior analisando tumores primários e seus linfonodos, mutações *BRAF* foram encontradas em metástases nodais quando o tumor primário não apresentava a mutação (Oler *et al.*, 2005). No entanto, devido à freqüente multifocalidade dos tumores primários da tiróide, os tumores nos linfonodos podem ter sido originados a partir de um tumor primário microscópico que não foi avaliado.

A grande maioria dos cânceres de tiróide com rearranjos *RET/PTC* são PTC diferenciados, e há um consenso na literatura que essas oncoproteínas não são associadas a formas agressivas da doença. Nossos resultados são compatíveis com este, já que apenas duas recidivas/metástases de pacientes com doença RAIR apresentaram oncogenes *RET/PTC*. No entanto, esta informação pode revelar um valor clínico, já que a escolha de tratamento se torna mais refinada e individualizada, desde que multiquinases com potente ação inibitória da atividade quinase de RET estão entrando na clínica (Santoro e Carlomagno, 2006). Os ensaios para rearranjos do gene *RET* foram realizados através de RT-PCR convencional. No entanto, é teoricamente possível desenvolver ensaios de espectrometria de massa para estes oncogenes utilizando-se cDNA como *template*. Ao contrário de *BRAF*, para o qual as alterações primárias e lesões metastáticas foram altamente concordantes, mutações de *PIK3CA* ou *AKT1* foram freqüentemente discordantes entre amostras de metástases dos mesmos indivíduos, em coerência com uma aquisição tardia deste evento oncogênico no decurso do desenvolvimento tumoral. As mutações de *AKT1* e *PIK3CA* foram mutuamente exclusivas em todos os casos. Para nosso conhecimento, este é o primeiro relato de mutações *AKT1* nessa doença. A mutação *AKT1_G49A* foi inicialmente detectada em cânceres de mama, cólon, ovário e pulmão. Esta mutação ativa constitutivamente a sinalização AKT e induz leucemia em camundongos (Carpten *et al.*, 2007). A ativação da AKT1 e a sua localização foram previamente associadas com invasão tumoral em câncer papilífero e folicular da tiróide (Vasko *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). Além disso, a ativação da via PI3K-AKT foi previamente relatada como sendo importante no desenvolvimento de metástases em FTC em

modelo de camundongos TR β PV/PV, que têm mutações em homozigose inativadoras do receptor do hormônio tireoideano β (Kim *et al.*, 2005).

Mutações dos genes *PIK3CA/AKT1* quase sempre coexistiram com mutações *BRAF* (15/18 (83%)) em nosso estudo, apontando para uma forte cooperação entre estas oncoproteínas e, conseqüentemente, do processo de co-ativação das vias MAPK e PI3K na progressão da doença. As alterações *PIK3CA* encontradas estão dentro dos conhecidos *hotspots* (E542K, E545K, H1047R), que foram previamente relatados como sendo capazes de induzir a fosforilação de AKT e de possuir um forte potencial oncogênico (Gymnopoulos *et al.*, 2007). Nós não encontramos alterações concomitantes de *RAS* e *PIK3CA*. No entanto, esta associação foi relatada em um subconjunto de cânceres anaplásicos (Garcia-Rostan *et al.*, 2005), mas com base na atual análise são eventos relativamente raros.

É importante ressaltar que existem diversas drogas em diferentes fases de desenvolvimento clínico para efetores da via PI3K-AKT-mTOR, e, de acordo com nossos dados, uma forte justificativa para a sua utilização em combinação com inibidores de RAF ou MEK em pacientes com doença avançada que têm co-ativação dessas vias.

Recentemente, alguns estudos associaram as principais alterações genéticas do câncer de tireóide (*RET/PTC* and *BRAF*) a mudanças globais na expressão de miRNAs (He, L. *et al.*, 2005; Cahill *et al.*, 2006; Pallante *et al.*, 2006a; Cahill *et al.*, 2007). Estes trabalhos abriram uma nova perspectiva nos mecanismos de regulação gênica na etiopatogênese do PTC. Apesar de todas as informações relativas às mudanças de expressão dos miRNAs em câncer da tireóide, as funções destas moléculas na tumorigênese tireoideana ainda são pouco compreendidas. Neste estudo, demonstramos pela primeira vez a associação funcional do miRNA let-7 no câncer de tireóide. A família let-7 de miRNAs inclui 14 isômeros, que na maioria dos casos, se localizam em cromossomos diferentes (Griffiths-Jones, 2004). Entre eles, centramos nossos estudos em let-7f, que está localizado no cromossomo 9q22.3, uma vez que esta isoforma mostrou uma relação causal na inibição da proliferação de células do câncer de pulmão (Takamizawa *et al.*, 2004b). Células com ativação de *RET/PTC3*, mas não *BRAF*, apresentaram redução na expressão do miRNA let-7f, sugerindo que esta alteração como um evento importante durante a transformação maligna mediada pelo oncogene *RET/PTC*. De acordo, um estudo anterior avaliando o perfil de expressão de miRNA na tireóide de pacientes com carcinoma papilífero mostrou que let-7f é diminuído neste câncer (Pallante *et al.*, 2006b). Para esclarecer a função de let-7 neste cenário, nós superexpressamos

let-7f nas células TPC-1, que expressam o rearranjo RET/PTC1. Transfecção de let-7 reprimiu a fosforilação de ERK, sustentando que a cascata RET/PTC-RAS-BRAF-ERK é inibida pela ativação deste miRNA. No entanto, não observamos significativa modulação das proteínas KRAS e HRAS em TPC-1 após expressão de let-7. É importante destacar que, além de RAS, let-7 tem outras alvos na perspectiva do câncer, incluindo o oncogene *HMGA2* (John *et al.*, 2004). No entanto, como a ativação da via MAPK é de particular importância nos PTC positivos para *RET/PTC* e let-7 mostrou ser capaz de inibir a fosforilação de ERK, acreditamos que os efeitos deste miRNA em TPC-1 devam ser, principalmente, através de sua atuação inibitória nesta via. Ainda permanece em aberto se let-7 de fato interage ou não com outros RNAm para mediar os seus efeitos em TPC-1. De qualquer modo, a repressão da via MAPK aliada à modulação de genes relacionados ao ciclo celular pode explicar, ao menos em parte, o reduzido crescimento das células TPC-1 let-7.

Durante a progressão maligna, o câncer de tiróide perde diferenciação, tornando-se mais agressivo e menos responsivo a tratamentos. Diversos estudos mostram que o sinal oncogênico de *RET* depende da ativação da via MAPK para diminuir a expressão de genes de diferenciação tireoidiana, como *TG*, *TPO*, *NIS*, *TSHR* e seus respectivos fatores de transcrição *TITF1* e *PAX8* (De Vita *et al.*, 1998; Portella *et al.*, 1999; Knauf *et al.*, 2003). Células TPC-1 let-7 apresentaram expressão três vezes maior de *TITF1*, um dos principais reguladores da diferenciação tireoidiana. Portanto, torna-se evidente que let-7 é fundamental para a regulação apropriada do crescimento e diferenciação celular da tiróide.

Até o momento, alguns estudos têm associado alterações de miRNAs a PTCs, especialmente através de estudos de expressão gênica, identificando principalmente alguns miRNAs com potencial oncogênico como miR-146, miR-221 e miR-222 e miR-181b, com altos níveis de expressão no tecido canceroso em comparação com tecidos normais (He, H. *et al.*, 2005; Pallante *et al.*, 2006a). Além disso, as principais alterações genéticas de PTC, a mutação BRAF^{V600E} e rearranjos RET/PTC, têm efeitos profundos sobre o perfil de expressão global dos miRNAs (Cahill *et al.*, 2006; Cahill *et al.*, 2007).

Nossos estudos indicam uma importante participação dos oncogenes *BRAF*, *PIK3CA* e *AKT1* e do miRNA supressor tumoral let-7 na transformação maligna e progressão tumoral da tiróide. O entendimento dos mecanismos pelos quais os oncogenes e microRNAs associados ao câncer de tiróide atuam é de extrema importância para o desenvolvimento de terapias específicas baseadas nestes eventos genéticos.

6 CONCLUSÕES

Demonstramos a viabilidade da aplicação de uma plataforma dedicada ao câncer tireoidiano com o propósito de interrogar grande parte das alterações genéticas nesta doença, muitas das quais transmitem importantes informações prognósticas.

PDTC apresentando mutações no gene *RAS* ou *BRAF* apresentam comportamentos biológicos e clínicos distintos. Mutações de *BRAF* são altamente prevalentes nos cânceres metastáticos ou recorrentes RAI, FDG-PET positivos, colocando esta oncoproteína como um alvo terapêutico primordial nas formas avançadas da doença.

As mutações de *PIK3CA* e *AKT1*, esta última descrita pela primeira no câncer de tireóide, são mais frequentes em cânceres avançados da tireóide, especialmente em lesões recorrentes e metastáticas. Mutações *BRAF* mostraram concordância entre tumores primários e suas metástases, diferentemente das mutações *PIK3CA* e *AKT1*. Estes achados apresentam implicações para a nossa compreensão da sequência de eventos envolvidos na patogênese do câncer de tireóide, e, oportunamente, sobre o modo pelo qual podemos aplicar estas informações na conduta de pacientes portadores desta doença.

A expressão reduzida de let-7 está associada à transformação maligna de RET/PTC. A reexpressão de let-7 é capaz de atenuar os efeitos mediados por este oncogene, limitando a ativação da cascata MAPK e seus efeitos biológicos, tais como a proliferação e desdiferenciação. Nossos dados suportam let-7 como um miRNA supressor da função tumoral em câncer de tireóide, revelando esta molécula como um potencial alvo terapêutico em pacientes com câncer que apresentam o oncogene *RET/PTC*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2006 May;29(5):903-6.
- Ball DW, Jin N, Rosen DM, Dackiw A, Sidransky D, Xing M, et al. Selective growth inhibition in BRAF mutant thyroid cancer by the mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007 Dec;92(12):4712-8.
- Bedogni B, Welford SM, Kwan AC, Ranger-Moore J, Saboda K, Powell MB. Inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase and mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 prevents melanoma development and promotes melanoma regression in the transgenic TP Ras mouse model. *Molecular cancer therapeutics*. 2006 Dec;5(12):3071-7.
- Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*. 2005 Jan 14;120(1):21-4.
- Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*. 2007 Oct;12(4):395-402.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001 Jan 18;409(6818):363-6.
- Bleeker FE, Felicioni L, Buttitta F, Lamba S, Cardone L, Rodolfo M, et al. AKT1(E17K) in human solid tumours. *Oncogene*. 2008 May 26.
- Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, Luchin A, Zatelli MC, degli Uberti EC. miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol*. 2005 Jul;204(1):280-5.
- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*. 2003 Apr 4;113(1):25-36.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 2005 Mar;3(3):e85.
- 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.

*De acordo com: Norma Vancouver

Cahill S, Smyth P, Finn SP, Denning K, Flavin R, O'Regan 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.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15524-9.

Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005 Oct 27;353(17):1793-801.

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 Mar 2;101(9):2999-3004.

Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):439-44.

Castellone MD, Santoro M. Dysregulated RET signaling in thyroid cancer. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2008 Jun;37(2):363-74, viii.

Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005 Jul 15;65(14):6029-33.

Chen CZ, Lodish HF. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. *Semin Immunol*. 2005 Apr;17(2):155-65.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 27;102(39):13944-9.

Croce CM. Oncogenes and cancer. *The New England journal of medicine*. 2008 Jan 31;358(5):502-11.

De Vita G, Zannini M, Cirafici AM, Melillo RM, Di Lauro R, Fusco A, et al. Expression of the RET/PTC1 oncogene impairs the activity of TTF-1 and Pax-8 thyroid transcription factors. *Cell Growth Differ*. 1998 Jan;9(1):97-103.

Downward J. Targeting RAS and PI3K in lung cancer. *Nature medicine*. 2008 Dec;14(12):1315-6.

Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, Morisi R, Moretti S, Bruno R, et al. BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007 Jul;92(7):2840-3.

Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 8;102(10):3627-32.

Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, et al. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nature medicine*. 2008 Dec;14(12):1351-6.

Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 2004 Dec 10;279(50):52361-5.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 Apr;6(4):259-69.

Fagin JA. Challenging dogma in thyroid cancer molecular genetics--role of RET/PTC and BRAF in tumor initiation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004 Sep;89(9):4264-6.

Faivre S, Djelloul S, Raymond E. New paradigms in anticancer therapy: targeting multiple signaling pathways with kinase inhibitors. *Seminars in oncology*. 2006 Aug;33(4):407-20.

Fang WJ, Lin CZ, Zhang HH, Qian J, Zhong L, Xu N. Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in colorectal cancer: a single-centre experience from China. *The Journal of international medical research*. 2007 Sep-Oct;35(5):716-23.

Frattini M, Ferrario C, Bressan P, Balestra D, De Cecco L, Mondellini P, et al. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene*. 2004 Sep 23;23(44):7436-40.

Furuya F, Lu C, Willingham MC, Cheng SY. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase delays tumor progression and blocks metastatic spread in a mouse model of thyroid cancer. *Carcinogenesis*. 2007 Dec;28(12):2451-8.

Fusco A, Santoro M. 20 years of RET/PTC in thyroid cancer: clinico-pathological correlations. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007 Jul;51(5):731-5.

Garcia-Rostan G, Costa AM, Pereira-Castro I, Salvatore G, Hernandez R, Hermsem MJ, et al. Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer research*. 2005 Nov 15;65(22):10199-207.

Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J, et al. ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2003 Sep 1;21(17):3226-35.

Giannini R, Ugolini C, Lupi C, Proietti A, Elisei R, Salvatore G, et al. The heterogeneous distribution of BRAF mutation supports the independent clonal origin of distinct tumor foci in multifocal papillary thyroid carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007 Sep;92(9):3511-6.

Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*. 2007 Mar 8;446(7132):153-8.

Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 1;32(Database issue):D109-11.

Grosshans H, Slack FJ. Micro-RNAs: small is plentiful. *The Journal of cell biology*. 2002 Jan 7;156(1):17-21.

Guo Y, Chen Y, Ito H, Watanabe A, Ge X, Kodama T, et al. Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. *Gene*. 2006 Dec 15;384:51-61.

Gymnopoulos M, Elsliger MA, Vogt PK. Rare cancer-specific mutations in PIK3CA show gain of function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 27;104(13):5569-74.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.

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 Dec 27;102(52):19075-80.

He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):828-33.

Hiltzik D, Carlson DL, Tuttle RM, Chuai S, Ishill N, Shaha A, et al. Poorly differentiated thyroid carcinomas defined on the basis of mitosis and necrosis: a clinicopathologic study of 58 patients. *Cancer*. 2006 Mar 15;106(6):1286-95.

Hou P, Liu D, Shan Y, Hu S, Studeman K, Condouris S, et al. Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 Feb 15;13(4):1161-70.

Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995 [see comments]. *Cancer*. 1998 Dec 15;83(12):2638-48.

Imkamp F, von Wasielewski R, Musholt TJ, Musholt PB. Rearrangement analysis in archival thyroid tissues: punching microdissection and artificial RET/PTC 1-12 transcripts. *The Journal of surgical research*. 2007 Dec;143(2):350-63.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005 Aug 15;65(16):7065-70.

Jagadeeswaran R, Ma PC, Seiwert TY, Jagadeeswaran S, Zumba O, Nallasura V, et al. Functional analysis of c-Met/hepatocyte growth factor pathway in malignant pleural mesothelioma. *Cancer research*. 2006 Jan 1;66(1):352-61.

John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol.* 2004 Nov;2(11):e363.

Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, et al. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer research.* 2007 Aug 15;67(16):7713-22.

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 Mar 11;120(5):635-47.

Kebebew E, Greenspan FS, Clark OH, Woeber KA, McMillan A. Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors. *Cancer.* 2005 Apr 1;103(7):1330-5.

Kim CS, Vasko VV, Kato Y, Kruhlak M, Saji M, Cheng SY, et al. AKT activation promotes metastasis in a mouse model of follicular thyroid carcinoma. *Endocrinology.* 2005 Oct;146(10):4456-63.

Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 May;6(5):376-85.

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 research.* 2003 Apr 1;63(7):1454-7.

Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S, et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol.* 2005 Oct;207(2):243-9.

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 Jul 10;22(28):4406-12.

Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nature reviews.* 2006 Apr;6(4):292-306.

Koscianska E, Baev V, Skreka K, Oikonomaki K, Rusinov V, Tabler M, et al. Prediction and preliminary validation of oncogene regulation by miRNAs. *BMC molecular biology.* 2007;8:79.

Leboeuf R, Baumgartner JE, Benezra M, Malaguarnera R, Solit D, Pratilas CA, et al. BRAFV600E Mutation Is Associated with Preferential Sensitivity to Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Inhibition in Thyroid Cancer Cell Lines. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2008 Jun;93(6):2194-201.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):843-54.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):415-9.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J*. 2004 Oct 13;23(20):4051-60.

Li J, Smyth P, Cahill S, Denning K, Flavin R, Aherne S, et al. Improved RNA quality and TaqMan Pre-amplification method (PreAmp) to enhance expression analysis from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) materials. *BMC Biotechnol*. 2008;8:10.

Liu D, Liu Z, Jiang D, Dackiw AP, Xing M. Inhibitory effects of the mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor CI-1040 on the proliferation and tumor growth of thyroid cancer cells with BRAF or RAS mutations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007 Dec;92(12):4686-95.

Liu Z, Hou P, Ji M, Guan H, Studeman K, Jensen K, et al. Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/akt and mitogen-activated protein kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008 Aug;93(8):3106-16.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):834-8.

Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004 Jan 2;303(5654):95-8.

Ma PC, Kijima T, Maulik G, Fox EA, Sattler M, Griffin JD, et al. c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer research*. 2003 Oct 1;63(19):6272-81.

Mandal M, Kim S, Younes MN, Jasser SA, El-Naggar AK, Mills GB, et al. The Akt inhibitor KP372-1 suppresses Akt activity and cell proliferation and induces apoptosis in thyroid cancer cells. *Br J Cancer*. 2005 May 23;92(10):1899-905.

Marks JL, Gong Y, Chitale D, Golas B, McLellan MD, Kasai Y, et al. Novel MEK1 mutation identified by mutational analysis of epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in lung adenocarcinoma. *Cancer research*. 2008 Jul 15;68(14):5524-8.

Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science (New York, NY)*. 2007 Mar 16;315(5818):1576-9.

Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *The American journal of medicine*. 1994 Nov;97(5):418-28.

Melillo RM, Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Cirafici AM, Salvatore G, et al. The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest*. 2005 Apr;115(4):1068-81.

Mellinghoff IK, Cloughesy TF, Mischel PS. PTEN-mediated resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2007 Jan 15;13(2 Pt 1):378-81.

Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004 Feb;39(2):167-9.

Mian C, Barollo S, Pennelli G, Pavan N, Rugge M, Pelizzo MR, et al. Molecular characteristics in papillary thyroid cancers (PTCs) with no ¹³¹I uptake. *Clinical endocrinology*. 2008 Jan;68(1):108-16.

Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*. 2003 Oct;1(12):882-91.

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 research*. 2005 Mar 15;65(6):2465-73.

Mitsutake N, Miyagishi M, Mitsutake S, Akeno N, Mesa C, Jr., Knauf JA, et al. BRAF mediates RET/PTC-induced mitogen-activated protein kinase activation in thyroid cells: functional support for requirement of the RET/PTC-RAS-BRAF pathway in papillary thyroid carcinogenesis. *Endocrinology*. 2006 Feb;147(2):1014-9.

Nemunaitis J, Klemow S, Tong A, Courtney A, Johnston W, Mack M, et al. Prognostic value of K-ras mutations, ras oncoprotein, and c-erb B-2 oncoprotein expression in adenocarcinoma of the lung. *American journal of clinical oncology*. 1998 Apr;21(2):155-60.

Nikiforov YE. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Mod Pathol*. 2008 May;21 Suppl 2:S37-43.

Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll TG, Nikiforov YE. PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *The American journal of surgical pathology*. 2002 Aug;26(8):1016-23.

Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, 2nd, Tallini G, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003 May;88(5):2318-26.

Oler G, Ebina KN, Michaluart P, Jr., Kimura ET, Cerutti J. Investigation of BRAF mutation in a series of papillary thyroid carcinoma and matched-lymph node metastasis reveals a new mutation in metastasis. *Clinical endocrinology*. 2005 Apr;62(4):509-11.

Paes JE, Ringel MD. Dysregulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in thyroid neoplasia. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2008 Jun;37(2):375-87, viii-ix.

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 Jun;13(2):497-508.

Park SM, Shell S, Radjabi AR, Schickel R, Feig C, Boyerinas B, et al. Let-7 prevents early cancer progression by suppressing expression of the embryonic gene HMGA2. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2007 Nov 1;6(21):2585-90.

Petersen M, Wengel J. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol*. 2003 Feb;21(2):74-81.

Pfister DG, Fagin JA. Refractory Thyroid Cancer: A Paradigm Shift in Treatment Is Not Far Off. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 9.

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 Mar;10(3):261-8.

Portella G, Vitagliano D, Borselli C, Melillo RM, Salvatore D, Rothstein JL, et al. Human N-ras, TRK-T1, and RET/PTC3 oncogenes, driven by a thyroglobulin promoter, differently affect the expression of differentiation markers and the proliferation of thyroid epithelial cells. *Oncol Res*. 1999;11(9):421-7.

Pratilas CA, Solit DB. Therapeutic strategies for targeting BRAF in human cancer. *Reviews on recent clinical trials*. 2007 May;2(2):121-34.

Raymond CK, Roberts BS, Garrett-Engle P, Lim LP, Johnson JM. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. *Rna*. 2005 Nov;11(11):1737-44.

Rivera M, Ghossein RA, Schoder H, Gomez D, Larson SM, Tuttle RM. Histopathologic characterization of radioactive iodine-refractory fluorodeoxyglucose-positron emission tomography-positive thyroid carcinoma. *Cancer*. 2008 Jul 1;113(1):48-56.

Robbins RJ, Wan Q, Grewal RK, Reibke R, Gonen M, Strauss HW, et al. Real-time prognosis for metastatic thyroid carcinoma based on 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose-positron emission tomography scanning. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006 Feb;91(2):498-505.

Ryder M, Ghossein RA, Ricarte-Filho JC, Knauf JA, Fagin JA. Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*. 2008 Dec;15(4):1069-74.

Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, et al. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer research*. 2007 Oct 15;67(20):9762-70.

Santarpia L, El-Naggar AK, Cote GJ, Myers JN, Sherman SI. Phosphatidylinositol 3-kinase/akt and ras/raf-mitogen-activated protein kinase pathway mutations in anaplastic thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008 Jan;93(1):278-84.

Santoro M, Carlomagno F. Drug insight: Small-molecule inhibitors of protein kinases in the treatment of thyroid cancer. *Nature clinical practice*. 2006 Jan;2(1):42-52.

Santoro M, Papotti M, Chiappetta G, Garcia-Rostan G, Volante M, Johnson C, et al. RET activation and clinicopathologic features in poorly differentiated thyroid tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002 Jan;87(1):370-9.

Schmidt L, Junker K, Nakaigawa N, Kinjerski T, Weirich G, Miller M, et al. Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene*. 1999 Apr 8;18(14):2343-50.

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003 Oct 17;115(2):199-208.

Schweppe RE, Kloppper JP, Korch C, Pugazhenthii U, Benezra M, Knauf JA, et al. DNA Profiling Analysis of 40 Human Thyroid Cancer Cell Lines Reveals Cross-Contamination Resulting in Cell Line Redundancy and Misidentification. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008 Aug 19.

Simon P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics*. 2003 Jul 22;19(11):1439-40.

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 Jul 17;22(29):4578-80.

Sobrinho-Simoes M, Maximo V, Rocha AS, Trovisco V, Castro P, Preto A, et al. Intragenic mutations in thyroid cancer. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2008 Jun;37(2):333-62, viii.

Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, Sawai A, Getz G, Basso A, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature*. 2006 Jan 19;439(7074):358-62.

Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer research*. 2008 Aug 1;68(15):6084-91.

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 Jun 1;64(11):3753-6.

Thomas RK, Baker AC, Debiasi RM, Winckler W, Laframboise T, Lin WM, et al. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nature genetics.* 2007 Mar;39(3):347-51.

Trovisco V, Soares P, Preto A, Castro P, Maximo V, Sobrinho-Simoes M. Molecular genetics of papillary thyroid carcinoma: great expectations. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007 Jul;51(5):643-53.

Ugurel S, Thirumaran RK, Bloethner S, Gast A, Sucker A, Mueller-Berghaus J, et al. B-RAF and N-RAS mutations are preserved during short time in vitro propagation and differentially impact prognosis. *PLoS ONE.* 2007;2(2):e236.

Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* 2006 Mar 1;20(5):515-24.

Vasko V, Saji M, Hardy E, Kruhlak M, Larin A, Savchenko V, et al. Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *Journal of medical genetics.* 2004 Mar;41(3):161-70.

Vassilopoulou-Sellin R, Schultz PN, Haynie TP. Clinical outcome of patients with papillary thyroid carcinoma who have recurrence after initial radioactive iodine therapy. *Cancer.* 1996 Aug 1;78(3):493-501.

Vivante A, Amariglio N, Koren-Michowitz M, Ashur-Fabian O, Nagler A, Rechavi G, et al. High-throughput, sensitive and quantitative assay for the detection of BCR-ABL kinase domain mutations. *Leukemia.* 2007 Jun;21(6):1318-21.

Volante M, Collini P, Nikiforov YE, Sakamoto A, Kakudo K, Katoh R, et al. Poorly differentiated thyroid carcinoma: the Turin proposal for the use of uniform diagnostic criteria and an algorithmic diagnostic approach. *The American journal of surgical pathology.* 2007 Aug;31(8):1256-64.

Wang W, Larson SM, Fazzari M, Tickoo SK, Kolbert K, Sgouros G, et al. Prognostic value of [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomographic scanning in patients with thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2000 Mar;85(3):1107-13.

Weidhaas JB, Babar I, Nallur SM, Trang P, Roush S, Boehm M, et al. MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer research.* 2007 Dec 1;67(23):11111-6.

Wong JB, Kaplan MM, Meyer KB, Pauker SG. Ablative radioactive iodine therapy for apparently localized thyroid carcinoma. A decision analytic perspective. *Endocrinology and metabolism clinics of North America.* 1990 Sep;19(3):741-60.

Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* (New York, NY. 2007 Nov 16;318(5853):1108-13.

Wreesmann VB, Singh B. Clinical impact of molecular analysis on thyroid cancer management. *Surgical oncology clinics of North America*. 2008 Jan;17(1):1-35, vii.

Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev*. 2007 Dec;28(7):742-62.

Yeager N, Brewer C, Cai KQ, Xu XX, Di Cristofano A. Mammalian target of rapamycin is the key effector of phosphatidylinositol-3-OH-initiated proliferative signals in the thyroid follicular epithelium. *Cancer research*. 2008 Jan 15;68(2):444-9.

Zhang HH, Wang XJ, Li GX, Yang E, Yang NM. Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2007 May 28;13(20):2883-8.

Zhu Z, Ciampi R, Nikiforova MN, Gandhi M, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006 Sep;91(9):3603-10.

ANEXO A - Principais ensaios de genotipagem utilizados neste estudo.

1	AKT1_E17K_c.49G-A	
2	BRAF_G469R_c.1405G-A	
3	BRAF_V600_K601del_c.1799_1801delTGA	Detecta BRAF_K601E_c.1801A>G
4	BRAF_V600E_c.1799T-A	
5	BRAFV600E_c.1799T-A	
6	BRAFV600E_c.1799T-A	
7	FRAP1_P2476L_c.7427C-T	
8	FRAP1_S2215Y_c.6644C-A	
9	HRAS_A11S_c.31G-T	
10	HRAS_Q61H_c.183G-C_A	
11	HRAS_Q61H_c.183G-C	
12	HRAS_Q61K_c.181C-A	
13	HRAS_Q61K_c.181C-A	
14	HRAS_Q61K_c.181C-A	
15	HRAS_Q61R-P-L_c.182A-G_C_T	
16	HRAS_Q61R-P-L_c.182A-G_C_T	
17	HRAS_S17G_c.49A-G	
18	HRASG13D_V_c.38G-A_T	
19	IKBKB_A360S_c.1078G-T	
20	IKBKB_Q611_c.1831C-T	
21	KRAS_G12S_R_C_c.34G-A_C_T	
22	KRAS_G12S-R-C_c.34G-A_C_T	
23	KRAS_G12V_D_A_c.35G-T_A_C	
24	KRAS_G13D-A_c.38G-A_C	
25	KRAS_G13D-A_c.38G-A_C	
26	KRAS_G13S_R_c.37G-A_C	
27	KRAS_Q61P-R_c.182A-C_G	
28	MAP2K1_K57N_c.171G-T	
29	MET_T1010I_c.3029C-T	
30	NRAS_G12C_c.34G-T	
31	NRAS_G12C_c.34G-T	
32	NRAS_G13C_c.37G-T	
33	NRAS_G13D-A_c.38G-A_C	
34	NRAS_Q61H_c.183A-T_C	
35	NRAS_Q61K-E_c.181C-A_G	
36	NRAS_Q61K-E_c.181C-A_G	
37	NRAS_Q61R_c.181_182CA-AG	
38	NRAS_Q61R-L_c.182A-G_T	
39	NRAS_Q61R-L_c.182A-G_T	
40	PIK3CA_C420R_c.1258T-C	
41	PIK3CA_L1001I_c.3001C-A	
42	PIK3CA_D1001N_c.3002T-A	

43 PIK3CA_G1007D_c.3020G-A
44 PIK3CA_G1009E_c.3026G-A
45 PIK3CA_M1010I_c.3030G-A
46 PIK3CA_P1011S_c.3031C-T
47 PIK3CA_F1016L_c.3046T-C
48 PIK3CA_K1030E_c.3088A-G
49 PIK3CA_T1031I_c.3092C-T
50 PIK3CA_F1039L_c.3115T-C
51 PIK3CA_K1041N_c.3123A-T
52 PIK3CA_M1043I_c.3129G-T
53 PIK3CA_H1047R-L_c.3140A-G_T
54 PIK3CA_G1049S-R_c.3145G-A_C
55 PIK3CA_G1050D_c.3149G-A
56 PIK3CA_T1052I_c.3155C-T
57 PIK3CA_D1056G_c.3167A-G
58 PIK3CA_I1062V_c.3184A-G
59 PIK3CA_D520N_c.1558G-A
60 PIK3CA_N521S_c.1562A-G
61 PIK3CA_E522K_c.1564G-A
62 PIK3CA_D538G_c.1613A-G
63 PIK3CA_P539R_c.1616C-G
64 PIK3CA_E542K_c.1624G-A
65 PIK3CA_E545Q-K_c.1633G-C_A
66 PIK3CA_E545A-G_c.1634A-C_G
67 PIK3CA_F550S_c.1649T-C
68 PIK3CA_E982G_c.2945A-G
69 PIK3CA_D1018N_c.3052G-A
70 PIK3CA_E542K_Q_c.1624G-A_C
71 PIK3CA_E545A_G_c.1634A-C_G
72 PIK3CA_E545K_Q_c.1633G-A_C
73 PIK3CA_G1050D_c.3149G-A
74 PIK3CA_H1047Y_c.3139C-T
75 PIK3CA_N345K_c.1035T-A
76 PIK3CA_Q546K_E_c.1636C-A_G
77 PIK3CA_Q546P_R_c.1637A-C_G
78 PIK3CA_R88_c.263G-A
79 PIK3R5_R28C_c.82C-T
80 PRKCZ_S514F_c.1541C-T
81 RET_C634R_c.1900T-C
82 RET_C634W_c.1902C-G
83 RET_C634Y_c.1901G-A
84 RET_E768D_c.2304G-C
85 RET_E921K_c.2761G-A
86 RET_G911D_c.2732G-A

87 RET_M918T_c.2753T-C
88 RET_A883F_c.2646_2648AGC-TTT
89 RET_A883P_c.2647G-C
90 RET_A919V_c.2756C-T
91 RET_D898_E901del_c.2692_2703del
92 RET_D898_E901del_c.2694_2705del
93 RET_E632_L633-V_c.1895_1897delAGC
94 RET_E901K_c.2701G-A
95 RET_F612_C620del_c.1834_1860del
96 RET_G748C_c.2242G-T
97 RET_P766S_c.2296C-T
98 RET_R908K_c.2723G-A
99 RET_V778V_c.2334C-T
100 RET_V591I_c.1771G-A
101 RET_V591I_c.1771G-A
102 RET_V804M_L_c.2410G-A_T
103 RET_V804M_L_c.2410G-A_T
104 RET_V804M-L_c.2410G-A_T
105 RHEB_E139K_c.415G-A
106 RPS6KA3_I416V_c.1246A-G
107 RPS6KB1_G289E_c.866G-A

ANEXO B - Publicações em que esta tese foi baseada.

- **Ricarte-Filho J.C.**, Ryder M., Chitale D.A., Rivera M., Heguy A., Ladanyi M., Janakiraman M., Solit D, Knauf J.A, Tuttle M., Ghossein R.A., Fagin J.A. Mutational Profile Of Advanced Primary and Metastatic Radioactive Iodine-Refractory Thyroid Cancers Reveals Distinct Pathogenetic Roles for BRAF, PIK3CA and AKT1. **Cancer Research**, 2009.(No prelo)
- **Ricarte-Filho J.C.**, Fuziwara C.S., Yamashita A.S., da Silva M.J., Kimura E.T. Effects of let-7 microRNA on cell growth and differentiation of papillary thyroid cancer. **Translational oncogene**. (Submetido)
- Ryder M., Ghossein R.A., **Ricarte-Filho J.C.**, Knauf J.A., Fagin J.A. Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. **Endocrine Related Cancer**, 2008. v15. p.1069-74.
- **Ricarte-Filho, J.C.M.**, Kimura, E.T. MicroRNAs: novel class of gene regulators involved in endocrine function and cancer. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2006. v50. p.1102-7.