MURILO VIEIRA GERALDO

REGULAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE TGF-β PELO microRNA *miR-146b-5p* NO CÂNCER DE TIRÓIDE

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 2011

MURILO VIEIRA GERALDO

REGULAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE TGF-β PELO microRNA *miR-146b-5p* NO CÂNCER DE TIRÓIDE

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: Profa. Dra. Edna Teruko Kimura

Versão original

São Paulo 2011

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

© reprodução total

Geraldo, Murilo Vieira.

Regulação da via de sinalização de TGF-β pelo microRNA *miR-146b-5p* no câncer de tiróide. / Murilo Vieira Geraldo. -- São Paulo, 2011.

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: Biologia molecular da glândula tiróide.

Versão do título para o inglês: Regulation of TGF- β signaling pathway by microRNA *miR-146b-5p* in thyroid cancer.

Descritores: 1. Glândula tireóide 2. Neoplasias da tireóide 3. RNA 4. TGF- β 5. MicroRNA 6. Transdução de sinal celular 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/SBIB0179/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Murilo Vieira Geraldo.		
Título da Tese:	Regulação da via de TGF-beta pelo microRNA <i>miR-146b-5p</i> no câncer de tiróide.		
Orientador(a):	Edna Teruko Kimura.		
A Comissão Ju	Ilgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão		
public	a realizada a////, considerou		
	() Aprovado(a) () Reprovado(a)		
Examinador(a):	Assinatura: Nome completo: Instituição:		
Presidente:	Assinatura: Nome completo: Instituição:		



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 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 134 nas fls. 93 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Edna Teruko Kimura, Coordenador(a) da Linha de pesquisa MicroRNAs nos tumores de tiroide: influência na proliferação e ativação oncogênica da célula folicular tiroidiana do qual participam o(s) alunos Alex Shimura Yamashita, Ana Paula Zen Petisco Fiore, Cesar Seigi Fuziwara, Murilo Vieira Geraldo, Caio Henrique Bezerra Silva, Felipe Martins Elias, Luciana Machado Dzik, Marcelo Costa e Silva, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em 29.10.2010, com validade de 3 anos.

São Paulo, 04 de novembro de 2010.

Prof.Dr.Wothan Tavares de Lima Coordenador CEUA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA Secretária CEUA – ICB/USP

À minha mulher, minha companheirinha, Rita, por todo o amor, carinho e apoio incondicionais. À minha família, meus alicerces.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Edna Teruko Kimura, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa. Muito obrigado pela disponibilidade, pela confiança depositada, pelas oportunidades oferecidas e pela orientação, quesitos que resultaram em meu amadurecimento didático e científico.

Ao amigo Alex S. Yamashita, pela valiosa ajuda nos experimentos de indução e inibição da via MAPK, Western blot e microscopia confocal a laser, pelas inúmeras discussões para interpretação de resultados e sugestões sempre pertinentes e construtivas.

Ao amigo Dr. Julio C.M. Ricarte-Filho, pela amizade e recepção na minha chegada ao laboratório no início do doutorado e ajuda nos primeiros experimentos com biologia celular. Aprendi realmente a andar de metrô.

Aos colegas do laboratório Alex S. Yamashita, Aline Olivé, Ana Paula Z.P. Fiore, Cesar S. Fuziwara, Eloiza de Rezende, Felipe Martins, Julio C.M. Ricarte-Filho, Luciana Dzik e Marley J. da Silva pelo ambiente de trabalho.

A todos os amigos, funcionários e docentes do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento e do Programa de Pós-graduação em Biololgia Celular e Tecidual

Aos Drs. James Fagin, Massimo Santoro e Alison Colquhoun pela doação das linhagens celulares utilizadas neste trabalho. Aos Drs. Konstanti D. Taganov e Joan Massagué pela doação dos plasmídeos pcDNA-miR-146b e p3TP-Lux.

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

À FAPESP pelo responsável fomento à pesquisa no Estado de São Paulo e suporte financeiro durante a realização deste trabalho (processo 2007/51927-6).

À minha Ritoca, meu amor, pelo companheirismo e dedicação em todos estes anos de graduação e pós-graduação. À minha nova família Jorge, Maria e Cezar, pelo carinho e respeito.

À minha querida família, Ivaldir, Elvira e Nola pelo amor e amparo incondicionais. Vocês têm participação importantíssima em cada um dos meus passos até aqui.

A todos que direta ou indiretamente participaram dessa jornada,

Muito obrigado!



(...) Mais do que procurar a cura para o resfriado ou o câncer, nós cientistas devemos demonstrar ao público o valor do esforço pela busca do conhecimento sobre a natureza da vida, e incentivá-lo (...)

James D. Watson

RESUMO

Geraldo MV. Regulação da via de sinalização TGF-β pelo microRNA *miR-146b-5p* no câncer de tiróide. 112 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MicroRNAs (miRNA) são pequenos RNAs não codificadores de proteínas envolvidos na regulação pós-transcricional da expressão gênica, envolvidos no câncer, incluindo o câncer de tiróide. O câncer de tiróide é a neoplasia endócrina mais comum, sendo o carcinoma papilífero (PTC), seu subtipo mais prevalente. No PTC, as alterações genéticas caracterizadas até o momento incluem rearranjos cromossômicos RET/PTC e a mutação BRAFT1799A, que levam à ativação da via estimulatória da proliferação MAPK. Análises de expressão em larga escala identificaram o miR-146b-5p como um dos miRNAs mais altamente expressos no PTC, sendo um potente marcador molecular para este tipo de câncer. Através da ativação da via MAPK em linhagem de células foliculares normais PCCL3 e da inibição desta via em linhagens de PTC, demonstramos que esta via regula positivamente a expressão de miR-146b-5p. No entanto o papel de *miR-146b-5p* permanece não esclarecido. Uma biológico análise computacional apontou SMAD4, um membro importante da via de sinalização de TGF- β , como potencial alvo de *miR-146b-5p*. A via de TGF- β é uma potente via inibitória da proliferação da célula folicular tiroideana, contudo os mecanismos envolvidos no escape do sinal inibitório de TGF-β pelas células tumorais tiroideanas permanencem não esclarecidos. A expressão condicionada de miR-146b-5p na linhagem PCCL3 diminuiu os níveis de SMAD4, levando à interrupção da transdução do sinal de TGF-β. A super-expressão de miR-146b-5p em linhagem PCCL3 levou ao aumento da proliferação celular, mesmo na ausência de estimulação com TSH, e conferiu resistência à parada no ciclo celular induzida por TGF-β. A inibição de miR-146b-5p com oligonucleotídeo LNA aumentou os níveis protéicos de SMAD4 nas linhagens de PTC, TPC-1 e BCPAP, restaurando a resposta ao sinal antiproliferativo de TGF-β, e diminuindo a proliferação celular. Os dados obtidos neste trabalho revelam um papel oncogênico de miR-146b-5p como um regulador negativo da via de sinalização de TGF-β.

Palavras-chave: Glândula tireóide. Neoplasias da tireóide. RNA. TGF-β. microRNA. Transdução de sinal celular.

ABSTRACT

Geraldo MV. Regulation of TGF-β signaling pathway by the microRNA *miR-146b-5p* in thyroid câncer. 112 p. PhD thesis (Cell and Tissue Biology). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; São Paulo, 2011.

MicroRNAs (miRNA) are small non-coding RNAs involved in post-transcriptional gene regulation that have crucial roles in several types of tumors, including the thyroid cancer. Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy and the papillary carcinoma (PTC) is its most prevalent form. In PTCs, the genetic alterations so far characterized include RET/PTC chromosomic rearrangements and the BRAFT1799A mutation, both leading to the sustained activation of the cell proliferation pathway MAPK. Large-scale analyses revealed that *miR-146b-5p* is overexpressed in PTCs and is regarded as a relevant diagnostic marker for this type of cancer. By activating MAPK pathway in the normal thyroid follicular cell line PCCL3 and inhibiting this pathway in PTC cell lines we demonstrated that *miR*-146b-5p expression is positively regulated by MAPK pathway. Gene expression analisys revealed that the MAPK signaling pathway positively regulates *miR-146b*-5p levels. However, the biological role of miR-146b-5p in PTCs remains unclear. A computational search indicated SMAD4, an important member of the TGF-B signaling pathway, as a putative target of *miR-146b-5p*. The TGF- β pathway is a negative regulator of thyroid follicular cell growth, and the mechanism by which thyroid cancer cells evade its inhibitory signal is poorly understood. The conditional overexpression of *miR-146b-5p* in normal rat follicular PCCL3 cells decreased SMAD4 levels, disrupting TGF-β signal transduction. *MiR-146b-5p* overexpression in the PCCL3 cell line also significantly increased cell proliferation in the absence of TSH and conferred resistance to TGF-β-mediated cell-cycle arrest. Specific inhibition of miR-146b-5p with a locked nucleic acid-modified antimiR-146b oligonucleotide significantly increased SMAD4 levels in the human papillary carcinoma cell lines, TPC-1 and BCPAP, restoring the TGF-ß signal transduction and decreasing cell growth. Altogether, our data confirm the oncogenic role of *miR-146b-5p* as a negative regulator of TGF- β pathway. Keywords: Thyroid gland. Thyroid neoplasia. RNA. TGF-B. microRNA. Cellular signal transduction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - A biogênese dos miRNAs	D
Figura 2 - Família gênica <i>mir-146</i> 24	4
Figura 3 - A via de sinalização de MAPK no câncer de tiróide29	9
Figura 4 - A transdução do sinal de TGF-β30	D
Figura 5 - Contrução do vetor pUHG-146b3	7
Figura 6 - Construção dos vetores pmiRGlo-SMAD4-3'UTR-wt e -Mut	
para ensaio de gene reporter39	9
Figura 7 - Modelo de expressão gênica condicionada pela doxiciclina4	D
Figura 8 - Ensaio de Gene Reporter Luciferase para a validação	
funcional de alvos de miRNAs4	5
Figura 9 - Método Stem Loop para detecção da expressão de miRNAs	
por PCR quantitativo4	B
Figura 10 - Padronização da reação de PCR quantitativo	1
Figura 11 - Cálculo da expressão gênica relativa52	2
Figura 12 - A regulação da expressão de <i>miR-146b-5p</i> pela via MAPK58	B
Figura 13 - Análise in silico da região promotora do gene MIR146B59	9
Figura 14 - SMAD4 como um potencial alvo de <i>miR-146b-5p</i> 63	3
Figura 15 - Validação da ligação de <i>miR-146b-5p</i> à 3'UTR de SMAD464	4
Figura 16 - Regulação pós-transcricional de SMAD4 por <i>miR-146b-5p</i> na	
célula folicular6	5
Figura 17 - Regulação pós-transcricional de SMAD4 por <i>miR-146b-5p</i> no	
câncer de tiróide6	7
Figura 18 - Modulação de genes-alvo da via de TGF-β por <i>miR-146b-5p</i> na	
célula folicular69	9
Figura 19 - Modulação de genes-alvo da via de TGF-β por <i>miR-146b-5p</i> no	
câncer de tiróide69	9
Figura 20 - Modulação da transdução do sinal de TGF-β por <i>miR-146b-5p</i>	
no câncer de tiróide7	1
Figura 21 - Modulação da transdução do sinal de TGF-β por <i>miR-146b-5p</i>	
no câncer de tiróide72	2

Figura 22 - Influência de <i>miR-146b-5p</i> sobre os marcadores clássicos da	
diferenciação da célula folicular tiroideana	73
Figura 23 - <i>MiR-146b-5p</i> e sua influência sobre o ciclo celular	75
Figura 24 - <i>MiR-146b-5p</i> e progressão do ciclo celular na ausência de	
estimulação hormonal	77
Figura 25 - <i>MiR-146b-5p</i> e a progressão do ciclo celular sob o estímulo	
anti-proliferativo de TGF-β	78
Figura 26 - <i>MiR-146b-5p</i> e sua influência sobre a morte celular	79
Figura 27 - MiR-146b-5p e sua influência sobre a proliferação celular	80
Figura 28 - Modelo de atuação de miR-146b na regulação da via de	
TGF-β	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - MiRNAs altamente expressos no câncer da tiróide	23
Tabela 2 - <i>MiR-146b-5p</i> como um marcador molecular para o PTC	25
Tabela 3 - Linhagens celulares utilizadas	35
Tabela 4 - Oligonucleotídeos usados para análise da expressão gênica	49
Tabela 5 - Análise <i>in silico</i> da região promotora de <i>MIR146B</i>	60
Tabela 6 - Amostra representativa de alvos preditos para <i>miR-146b-5p</i> ,	
de acordo com os programas TargetScan e Pictar	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3011	Regiau 5 nau traduzida
Kb	Kilobase
kDa	Milodalton
mМ	Milimolar
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
pb	Pares de base
М	Molar
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μΜ	Micromolar
Abs	Absorbância
ATC	Carcinoma anaplásico da tiróide
BLAT	do ingles BLAST-like Alignment Tool
BLAST	do ingles Basic Local Alignment Sequence Tool
BSA	Albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
Ct	do inglês Cycle Threshold
ddH ₂ 0	Água destilada e deionizada
DEPC	Di-etil-pirocarbonato
DMEM	Do inglês Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DP	Desvio-padrão
DTT	Ditiotreitol
EUA	Estados Unidos da América
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FA	Adenoma folicular
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
	Kb kDa mM ng nM np nM pb M µg µL µB µL µM Abs ATC BLAT BLAST BSA cDNA Ct ddH₂0 DEPC DMEM DNASO DNA DNASO DNA DNASO DNA FA FA FA

FTC	Carcinoma folicular da tiróide		
HCI	Ácido clorídrico		
LNA	Ácido nucléico trancado		
M-MLV	Murine Moloney Leukemia Virus		
MAPK	Proteina kinase ativada por mitógeno		
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio		
MNG	Bócio multi-nodular		
mRNA	RNA mensageiro		
miRNA	MicroRNA		
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio		
NaCl	Cloreto de Sódio		
NaOH	Hidróxido de Sódio		
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida		
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase		
PDTC	Carcinoma pouco diferenciado da tiróide		
рН	Potencial hidrogeniônico		
PI	lodeto de propídeo		
pre-miRNA	precursor de miRNA		
pri-miRNA	miRNA primário		
PTC	Carcinoma papilífero da tiróide		
qPCR	PCR quantitativo em Tempo Real		
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA		
RNA	Ácido ribonucléico		
RNase	Ribonuclease		
RPMI	Do inglês Roswell Park Memorial Institute		
RT	Transcrição reversa		
RT-PCR	PCR de Transcrição reversa		
SDS	Dodecil sulfato de sódio		
SFB	Soro fetal bovino		
ΤβR	Receptor de TGF-β		
TBS	Tampão salino de tris		
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta		
UK	Reino Unido		
USA	Estados Unidos da América		

LISTA DE NOMENCLATURAS

mir-146familia gênicamir-146bprecursor de miR-146bmiR-146bmiR-146b-5p maduromiR-146b-5pmaduro proveniente do braço 5' do mir-146bmiR-146b-3pmiR-146b-5p maduro proveniente do braço 3' do mir-146bmiR-146b*fita passageira de mir-146b, com baixa expressão em relação ao
miRNA maduro guiaMIR146Bnome do gene miR-146b de acordo com o HGNC (HUGO Gene
Nomenclature Committee)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO
1.1 MicroRNAs
1.2 MicroRNAs e câncer21
1.3 O microRNA <i>miR-146b-5p</i> 23
1.4 O câncer da tiróide27
2 OBJETIVOS
2.1 Objetivo geral32
2.2 Objetivos específicos32
3 MATERIAL E MÉTODOS33
3.1 Análise da região promotora de <i>MIR146B</i> 33
3.2 Busca on-line por alvos preditos de <i>miR-146b-5p</i> 33
3.3 Cultura celular
3.4 Construções35
3.4.1 Construção do vetor pUHG-146b para expressão condicionada de
miR-146b-5p
3.4.2 Construção dos vetores pmiRGlo-SMAD4 3'UTR-wt e -Mut para ensaio
de gene repórter
3.5 Expressão condicionada de <i>miR-146b</i> regulada pela tetraciclina em
linhagem PCCL340
3.5.1 Transfecção do plasmídeo pUHG-146b em linhagem PC-rtTA41
3.5.2 Indução da expressão de miR-146b-5p41
3.6 Expressão condicionada dos oncogenes <i>RET/PTC3</i> e <i>BRAFT1799A</i>
em linhagem PCCL342
3.7 Modelo de expressão estável de <i>miR-146b-5p</i> em linhagem PCCl342
3.8 Tratamento das linhagens celulares de carcinoma papilífero TPC-1 e
BCPAP com inibidores da via MAPK43
3.9 Supressão transiente de <i>miR-146b-5p</i> endógeno nas linhagens
celulares de carcinoma papilífero de tiróide TPC-1 e BCPAP43
3.10 Ensaio de gene repórter Luciferase44
3.11 Tratamento das linhagens celulares com TGF-β1 recombinante46
3.12 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real46

3.12.2 Síntese de DNA complementar	46
3.12.3 PCR quantitativo em tempo real	48
3.12.4 Cálculo da expressão gênica diferencial	50
3.13 Análise da expressão protéica por Western blot	52
3.13.1 Extração de proteínas	52
3.13.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	52
3.13.3 Imunodetecção	53
3.14 Ensaio de imunofluorescência	54
3.15 Ensaios de proliferação celular	54
3.15.1 Curva de crescimento	54
3.15.2 Ensaio de MTT	55
3.16 Análise do ciclo celular	55
3.17 Análise de morte celular	56
3.18 Análise estatística	56
4 RESULTADOS	57
4.1 Influência da via MAPK sobre a expressão de <i>miR-146b-5p</i> em	
célula folicular normal e tumoral de tiróide	57
4.2 Busca por potenciais alvos de <i>miR-146b-5p</i>	60
4.3 Validação de SMAD4 como alvo de regulação pós-transcricional de	
miR-146b-5p	63
4.4 Regulação pós-transcricional de SMAD4 por <i>miR-146b-5p</i> em	
linhagens de células foliculares normal e tumoral de tiróide	65
4.5 Modulação da via de sinalização de TGF-β por <i>miR-146b-5p</i>	68
4.6 Influência de <i>miR-146-5p</i> na expressão dos marcadores da	
diferenciação tiroideana	73
4.7 MiR-146b-5p e sua influência na proliferação e morte celular	74
5 DISCUSSÃO	81
6 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	88
ANEXOS	99
Artigo publicado - MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction	
of TGF-beta by repressing SMAD4 in thyroid cancer	99

1 INTRODUÇÃO

Os microRNAs (miRNA) são pequenas moléculas de RNA fita simples, não codificadores de proteínas, que agem como potentes reguladores póstranscricionais da expressão gênica em plantas e animais. Por atuarem em diversas vias de sinalização controlando a diferenciação, proliferação e morte celular, os miRNAs foram rapidamente associados à tumorigênese (revisto em Garzon et al., 2009). A metodologia de análise da expressão gênica em larga escala tem sido utilizada para caracterizar o padrão de expressão de miRNAs no câncer. Neste contexto, o *miR-146b-5p* mostrou-se um miRNA diferencialmente expresso no carcinoma papilífero de tiróide (PTC), o histotipo mais prevalente de câncer de tiróide (He et al., 2005a; Pallante et al., 2010).

As alterações genéticas em vias de sinalização envolvidas no processo de transformação neoplásica da célula folicular tiroideana até hoje caracterizadas incluem rearranjos cromossômicos e mutações nos genes que codificam membros efetores da via MAPK (revisto em Xing, 2005). Por outro lado, alterações em vias de inibição da proliferação também podem contribuir de forma significativa na tumorigênese do PTC. De fato, o aumento da expressão de TGF-β1 e outros membros da via de TGF-β em tumores tiroideanos sugere a desregulação desta via de sinalização e a conseqüente insensibilidade da célula tumoral tiroideana ao seu sinal anti-proiferativo (Matsuo et al., 2010; Matsuo et al., 2006; Siegel e Massague, 2003). Recentes estudos têm descrito a participação desta via por miRNAs no câncer de tiróide ainda é incerta.

1.1 MicroRNAs

Os microRNAs foram originalmente descritos em 1993 por Lee et al. (1993) ao caracterizarem a regulação do desenvolvimento larval de *C. elegans* por um pequeno transcrito não codificador para proteína, o gene *lin-4*. Este gene origina um transcrito de 22 nucleotídeos que interage com a região 3' não traduzida (3'UTR) do gene *lin-14*, reprimindo sua síntese protéica. No entanto, apenas após a descoberta do miRNA *let-7* (Reinhart et al., 2000), quase uma

década depois, o número de miRNAs identificados aumentou exponencialmente. Desde então, de acordo com o miRBase (Griffiths-Jones, 2004), mais de 6000 miRNAs já foram identificados em mais de 150 espécies conhecidas, incluindo vírus, plantas, fungos e animais. Em humanos o número de miRNAs descritos até o momento ultrapassa 1400 (acesso em setembro de 2011).

Os miRNAs são RNAs não codificadores de proteínas, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais (Bartel, 2004). No genoma, os genes que codificam miRNAs apresentam peculiaridades. Uma fração dos genes que codificam miRNAs (cerca de 30%) podem se localizar em regiões intergênicas, os quais geram transcritos monocistrônicos não codificantes, possuindo sua própria unidade de transcrição, com região promotora e sítios de ligação para fatores de transcrição podendo ser regulados por metilação de sua região promotora (Garzon et al., 2009; Lujambio e Esteller, 2007). Por outro lado, grande parte dos genes de miRNAs situa-se em regiões intrônicas de genes hospedeiros, que podem ou não codificar para proteínas. Estes miRNAs dependem da unidade transcricional do mRNA hospedeiro, porém, interessantemente, são processados pela enzima DROSHA independentemente da realização do splicing do mensageiro hospedeiro, sem comprometer a transcrição deste (Kim e Kim, 2007). Uma fração menor dos miRNAs estão situados numa mesma região genômica, formando um cluster. Estes clusters são transcritos num único pri-miRNA, de forma policistrônica, que apresenta na mesma molécula as estruturas secundárias em forma de grampo correspondentes a cada miRNA membro do cluster. Cada membro é então processado pela enzima DROSHA para gerar pré-miRNA distintos. Como exemplo, temos o cluster mir-17-mir-92, composto por sete miRNAs (miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 e miR-92-1) e está localizado no cromossomo humano 13 (He et al., 2005b). Outro exemplo de localização genômica de miRNAs em cluster é o cluster mir-106a-mir-92, parálogo ao cluster mir-17-mir-92 e localizado no cromossomo X, composto por cinco miRNAs (miR-106a, miR-18b, miR-20b, *miR-19b-2, e miR-92-2*).

Na figura 1 encontra-se esquematizada a biogênese dos miRNAs. Os miRNAs são transcritos a partir do genoma pela RNA polimerase II, gerando

um transcrito de aproximadamente 1000 bp contendo *cap* 5' e cauda poli(A+), denominado miRNA primário ou pri-miRNA (Kim, 2005). Este, por sua vez, é processado ainda no núcleo pela enzima RNase III DROSHA, resultando num transcrito menor em forma de grampo, o miRNA precursor (pre-miRNA), de aproximadamente 70 nucleotídeos. O pre-miRNA é exportado para o citoplasma pelo complexo Exportina-5/ Ran-GTP, onde é clivado pela enzima DICER, gerando transcritos de fita dupla, de 19 a 25 nucleotídeos, denominados miRNAs maduros (He e Hannon, 2004). Este produto é incorporado a um complexo multimérico denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*), que inclui a proteína Argonauta como um de seus principais componentes. Apenas uma das fitas do *duplex* de miRNA permanece no RISC



Figura 1 - A biogênese dos miRNAs. Após sua transcrição pela enzima RNA polimerase II, o transcrito primário do miRNA (pri-miRNA) é clivado pela enzima RNase III DROSHA ainda no núcleo, gerando, assim, um transcrito menor, em forma de grampo (pre-miRNA), de aproximadamente 70 nucleotídeos. O pre-miRNA é exportado ao citoplasma pelo complexo Exportina-5/ Ran-GTP e processado pela enzima DICER, gerando transcritos de fita dupla (miRNA:miRNA), de 19 a 25 nucleotídeos. A incorporação deste duplex miRNA:miRNA ao complexo RISC libera uma das fitas do transcrito, deixando a outra incorporada ao complexo. Assim, o pareamento perfeito desta seqüência com o mRNA alvo provocará a degradação do mesmo. Já o pareamento imperfeito provocará o impedimento da tradução.

para o posterior pareamento com o mRNA-alvo. No entanto, recentes relatos na literatura indicam que a fita passageira, liberada do RISC pode exercer papel biológico (Guo e Lu, 2010).

O pareamento imperfeito dos miRNAs maduros com a 3'UTR de seus RNAs mensageiros alvos provoca o bloqueio da tradução e a subseqüente diminuição dos níveis da proteína. Por outro lado, o pareamento completo leva à degradação do mRNA através do recrutamento do complexo RISC (Bartel, 2004), fato mais freqüentemente observado em plantas. Em alguns casos, a ligação ao complexo RISC parece encaminhar o mRNA alvo a determinadas regiões na célula, denominadas "Corpos-P", onde há grande acúmulo de RNases, levando, assim, à diminuição dos níveis do mRNA (Eulalio et al., 2007). Devido ao seu tamanho reduzido, um único miRNA pode regular diversos mRNAs diferentes e, da mesma forma, diversos miRNAs podem regular um único mRNA alvo (Brennecke et al., 2003). Os miRNAs formam, assim, uma rede complexa de regulação pós-transcricional. Apesar da existência de programas computacionais que possibilitam a realização da predição dos possíveis alvos de qualquer miRNA, o número de miRNAs com função biológica estabelecida ainda é pequeno. Além disso, alguns estudos sugerem a regulação transcricional de genes alvo dirigida pela interação direta de miRNAs com sua região promotora no genoma (Suzuki e Kelleher, 2009).

1.2 MicroRNAs e câncer

Os miRNAs estão envolvidos no controle de muitos processos fisiológicos em diversos organismos, como o desenvolvimento de folhas e flores em plantas, metabolismo de ácidos graxos em *D. melanogaster* e a manutenção da diferenciação da linhagem hematopoiética em mamíferos (Bartel, 2004). De fato, a primeira conexão de miRNAs com o câncer foi estabelecida há quase uma década, quando Calin et al. (2002) demonstraram que a região genômica 13q14, freqüentemente deletada em leucemia linfocítica crônica, contém os *loci* gênicos dos miRNAs *miR-15* e *miR-16*. Neste tipo de câncer, os níveis de expressão dos miRNAs *miR-15* e *miR-16* são inversamente correlacionados com os níveis protéicos de seu alvo, BCL-2. Este estudo deflagrou uma intensa procura por miRNAs com participação em

patologias humanas. Novos estudos demonstraram a desregulação dos miRNAs *miR-155* e *let-7* em linfoma de burkitt e no câncer de pulmão, respectivamente (Kluiver et al., 2006; Metzler et al., 2004; Takamizawa et al., 2004). A validação experimental da regulação das três isoformas do oncogene *RAS* pelo *let-7* (Johnson et al., 2005) contribuiu para que este miRNA se tornasse um dos miRNAs mais estudados no câncer (Gregory e Shiekhattar, 2005; Hammond, 2006).

Em 2005, um estudo envolvendo um painel de 200 tumores humanos, analisou dados de expressão de 217 miRNAs, conhecidos naquela ocasião. O padrão de expressão deste pequeno grupo de miRNAs foi mais eficiente do que 16000 mRNAs na classificação de malignidade, agressividade e de diferentes tipos histológicos de tumores (Lu et al., 2005). A partir de então, a intensa busca por miRNAs diferencialmente expressos no câncer fez com que plataformas de *microarray* fossem adaptadas para o estudo de miRNAs, revelando a desregulação de miRNAs em uma larga gama de tumores (Munker e Calin, 2011), apontando seu padrão de expressão como potente ferramenta diagnóstica. Como exemplo, uma análise do padrão de expressão de 228 miRNAs revelou a alteração da expressão dos miRNAs *miR-21, miR-17-5p, miR-20a, miR-92, miR-106a* e *miR-155* num amplo espectro de tumores oriundos de diferentes tecidos (Volinia et al., 2006).

Nesse contexto, uma série de miRNAs emergiram como promissores marcadores moleculares para os diferentes tipos histológicos de tumores tiroideanos, predominantemente o PTC. A descrição do aumento da expressão de miRNAs em amostras de PTC também foi observada em estudos subseqüentes em larga escala, como por exemplo os miRNAs *miR-221*, *miR-222*, *miR-181b* e *miR-146b-5p* (He et al., 2005a; Pallante et al., 2006). Na tabela 1 mostramos uma série de estudos que detectaram a expressão aumentada de miRNAs no câncer de tiróide.

Neoplasia da Tiróide	miRNAs com expressão aumentada	Referência	
PTC			
-	146, 221, 222, 21, 220, 181a, 155	(He et al., 2005a)	
	222, 221, 181b, 220, 213	(Pallante et al., 2006)	
	34a, 96, 99a, 100, 125b, 128a, 128b, 130b, 139, 141, 142-3p, 146, 148, 185, 200a, 200b, 211, 213, 216, let- 7d	(Cahill et al., 2006)	
	128a, 128b, 135a, 141, 150, 185, 200a, 200b, 200c, 203, 213, 215, 330, 338, 34ª	(Cahill et al., 2007)	
	187, 221, 222, 146b, 155, 122a, 31, 205, 224	(Nikiforova et al., 2008)	
	146b, 221, 222	(Chen et al., 2008)	
	221, 222, 21, 31, 172, 34a, 213, 181b, 223, 224	(Tetzlaff et al., 2007)	
FTA			
Convencional	339, 224, 205, 210, 190, 328, 342	(Nikiforova et al., 2008)	
Variante oncocítica FTC	31, 339, 183, 221, 224, 203	(Nikiforova et al., 2008)	
Convencional	187, 224, 155, 222, 221, 146b	(Nikiforova et al., 2008)	
Variante oncocítica	187, 221, 339, 183, 222, 197	(Nikiforova et al., 2008)	
	192, 197, 328, 346	(Weber et al., 2006)	
PDTC			
	187, 221, 129, 222, 146b, 339, 183	(Nikiforova et al., 2008)	
ATC			
	302c, 205, 137, 187, 214, 155, 224, 222, 221	(Nikiforova et al., 2008)	
	21, 146b, 221, 222	(Mitomo et al., 2008)	
	17-5p, 17-3p, 18a, 19a, 20a, 19b, 92-1, 106a, 106b	(Takakura et al., 2008)	
	542-5p,146a, 146b, 342,200a	(Pacifico et al., 2010)	
MTC			
	183, 182, 375, 551	(Abraham et al., 2011)	

Tabela 1 - MiRNAs altamente expressos no câncer da tiróide.

FONTE: modificado de Pallante et al. (2010) PTC: carcinoma papilífero da tiróide;

PDTC: carcinoma pouco diferenciado da tiróide;

FTC: carcinoma folicular da tiróide;

ATC: carcinoma anaplásico da tiróide;

MTC: carcinoma medular da tiróide.

1.3 O microRNA miR-146b-5p

Os primeiros estudos de análise da expressão de miRNAs em larga escala no PTC já apontavam o grande aumento de expressão de *miR-146* (Cahill et al., 2006; He et al., 2005a). A família gênica de *mir-146* compreende duas isoformas, localizadas em diferentes *loci* gênicos: *MIR146A* na região 5q34, e *MIR146B* na região 10q24.32. Nos anos que se seguiram foi verificado que a isoforma *miR-146b* está predominantemente expressa no PTC (Chen et al., 2008; Chou et al., 2010; Mazeh et al., 2011; Nikiforova et al., 2008; Schwertheim et al., 2009; Sheu et al., 2009; 2010a; 2010b), enquanto a isoforma *miR-146a* aparentemente associa-se ao ATC (Pacifico et al., 2010). Mais recentemente foi descrita a desregulação da expressão da fita passageira do *miR-146b*, proveniente do braço 3' do precursor *mir-146b*, no entanto com

papel biológico ainda não caracterizado (Patnaik et al., 2010; Ragusa et al., 2010). De acordo com o miRBase, a figura 2 ilustra os dois produtos do miRNA maduro de *miR-146b*, nomeados *miR-146b-5p* (produto maduro originado do braço 5') e *miR-146b-3p* (produto maduro originado do braço 3'). Assim, as formas *miR-146* e *miR-146b* apontados como altamente expressos no PTC desde 2005 correspondem à sequência do produto maduro *miR-146b-5p*. A tabela 2 resume uma série de estudos onde o potencial de *miR-146b-5p* como marcador molecular para o PTC foi subsequentemente avaliado. O aumento da expressão deste miRNA no PTC foi observado em todos os estudos subseqüentes, apresentando correlação positiva com PTCs mais agressivos, associado à presença de invasão extra-tiroideana e da mutação *BRAFT1799A* (Chou et al., 2010; Yip et al., 2011).

А miR-146a ugagaacugaauuccauggguu miR-146b ugagaacugaauuccauaggcu В miR-146b-5p 9 - ugagaacugaauuccauaggcu - 30 u au **cu** ga u a cc ggcac**u agaacuga uccauagg** gu gc c gg ccgu**gg ucuugacu aggugucc u**a cg u **cg** −a a -c С miR-146b-3p 45 - ugcccuguggacucaguucugg - 66

Figura 2 - Família gênica mir-146. (A) Alinhamento entre as sequências do produto maduro das isoformas miR-146a e miR-146b. (B) Produtos gênicos originados do processamento de mir-146b. O precursor mir-146b, visualizado em sua estrutura secundária em forma de grampo (mir-146b stem loop), origina dois produtos maduros: miR-146b-5p e miR-146b-3p. Os algarismos representam o nucleotídeo de início e término dos miRNAs maduros. As sequências dos miRNAs maduros estão mostradas na orientação 5'-3'.

Grupo de miRNAs testados	Subtipos histológicos testados (n)	Correlação com BRAFT1799A	Referência
187, 221, 222, 146b , 155, 197, 224	PTCC (18), FVPTC (5), FTC (9), FA, (8), ATC (4), PDTC (4), MTC (2), HN (5) e N (5)	não	(Nikiforova et al., 2008)
146a, 146b , 155, 187, 221, 222	PTCC (27), FVPTC (5), FA (24), HN (11) e N (2)	não	(Chen et al., 2008)
146b , 181b, 221, 222, 21, 30d, 125b, 26a, 30a, let-7c	PDTC (15), PTC (9), ATC (9)	não	(Schwertheim et al., 2009)
146b, 181b, 21, 221, 222	PTC (54: 28 BRAFT1799A+, 26 wt)	não	(Sheu et al., 2009)
146b , 21, 221, 222, 181b	PTCC (10), PTC-TCV (10), PTCFV (30), WDT-UMPs (22), FTC (21), FA (10) e MNG (10)	n.a.	(Sheu et al., 2010a)
146b , 21, 221, 222, 181b	HTT (18), PTCs (10), FA (10), MNG (10), N	não	(Sheu et al., 2010b)
146b , 221, 222	PTC (100), N (16)	sim	(Chou et al., 2010)
146b , 221, 222, 155, 31, 1, 34b, 130b, 138	PTC (32: 17 PTC agressivo, 15 PTC não agressivo)	sim	(Yip et al., 2011)
21, 31, 146b , 187, 221, 222	PTC (20), MNG (5), N (2)	n.a.	(Mazeh et al., 2011)

Tabela 2 - MiR-146b-5p como um marcador molecular para o PTC.

(n) número de amostras analisadas

PTC: carcinoma papilífero da tiróide PTCC: carcinoma papilífero clássico da tiróide PTCFV: carcinoma papilífero da tiróide variante folicular PDTC: carcinoma pouco diferenciado da tiróide FTC: carcinoma folicular da tiróide ATC: carcinoma anaplásico da tiróide; HTT: tumor trabecular hialinizante da tiróide FA: adenoma folicular MNG: bócio multinodular WDT-UMPs: carcinoma bem diferenciado com potencial maligno incerto HN: nódulo hiperplásico: wt, negativo para mutação *BRAFT1799A* +, positivo para mutação *BRAFT1799A*. n.a.: não analizado

Enquanto a desregulação da expressão de miRNAs no câncer foi amplamente explorada, o papel funcional destas moléculas na célula tumoral permaneceu pouco esclarecido. Linhagens celulares tumorais têm sido utilizadas como modelo para a análise funcional de miRNAs. A descoberta de miRNAs com participação relevante n a tumorigênese e progressão tumoral, com potencial diagnóstico e terapêutico, levou ao surgimento do conceito "*oncomiR*" (Esquela-Kerscher e Slack, 2006). Os o*ncomiRs* podem atuar como supressores tumorais ou oncogenes, dependendo de seu alvo de regulação. Os miRNAs que regulam negativamente a expressão de genes supressores de tumor são classificados como *oncomiRs* oncogênicos. Por exemplo, os *miR-21* e *miR-155* têm papel oncogênico, regulando respectivamente os genes

supressores de tumor PDCD4 e c-MAF revisto em (Garzon et al., 2009). Da mesma forma, o cluster mir-17-mir-92 possui papel oncogênico quando transfectado em linhagens celulares de pulmão, aumentando sua taxa de proliferação (Hayashita et al., 2005). Este *cluster* de miRNAs está situado no cromossomo 13, em uma região freqüentemente amplificada em diversos tipos de tumores sólidos e linfomas (Ota et al., 2004). Os alvos preditos para alguns miRNA situados no *cluster mir-17-mir-92* incluem genes supressores de tumor, como o PTEN e RB2. Por outro lado, miRNAs que têm como alvo protooncogenes podem ser classificados como supressores de tumor. Os miRNAs miR-15a, miR-16-1 e miR-34 estão consolidados como oncomiRs supressores, regulando alvos como os oncogenes BCL2, WT1 e CDK4, respectivamente (Garzon et al., 2009). O miRNA let-7, como já mencionado anteriormente, tem papel supressor tumoral regulando negativamente os níveis do oncogene RAS em linhagens tumorais colo-retais e de pulmão (Akao et al., 2006; Johnson et al., 2005). Neste contexto, o papel biológico de alguns miRNAs envolvidos na transformação da célula folicular tiroideana foi caracterizado. Recentemente nosso grupo demonstrou o papel supressor de let-7 na regulação da via MAPK no PTC, onde a super-expressão de let-7 em linhagem de carcinoma papilífero diminuiu a fosforilação de ERK, efetor final da via de MAPK, levando à diminuição da proliferação celular (Ricarte-Filho et al., 2009). Análises funcionais identificaram hTERT como alvo de regulação do miR-138 no carcinoma anaplásico de tiróide (Mitomo et al., 2008). Em linhagem normal de tiróide, o supressor tumoral PDCD4 está envolvido em uma alça de autoregulação com o miRNA miR-21 para promover a transformação induzida pelo oncogene RAS (Talotta et al., 2009). No carcinoma papilífero, os miRNAs miR-221 e miR-222 cooperam para regular os níveis de p27/kip1 e promover a desregulação do ciclo celular (Visone et al., 2007). Recentemente, a regulação do receptor de hormônio tiroideano beta (THRB) por miR-21 e a isoforma miR-146a (Jazdzewski et al., 2011) e a regulação dos genes CCND2, CXCR4 e SDF-1α pelo miR-1 (Leone et al., 2011b) foram demonstradas em carcinomas tiroideanos. A participação do miR-1 foi descrita ainda na fisiologia da célula folicular tiroideana, em uma alça de regulação envolvida na resposta ao estímulo de TSH (Leone et al., 2011a).

1.4 O câncer da tiróide

Na última década tem-se observado o aumento da incidência de neoplasias da tiróide aumenta em todo o mundo (Jemal et al., 2010). Nos Estados Unidos, cerca de 5-10% dos adultos apresentam nódulos palpáveis na tiróide e, aproximadamente, 50% da população idosa apresenta nódulos detectados por ultra-sonografia (Hegedus, 2004). A grande maioria dos nódulos é benigna, mas 5-7% correspondem a tumores malignos. Estimativas indicam cerca de 45000 novos casos de câncer de tiróide nos EUA em 2011, levando a óbito cerca de 1690 pessoas, principalmente devido à ocorrência freqüente de extensas metástases à distância (Jemal et al., 2010). Somente na cidade de São Paulo, a Secretaria da Saúde registrou 1992 casos de câncer de tiróide no ano de 2008, sendo mais incidente em mulheres, com 1591 casos (Secretaria da Saúde, 2011).

A glândula tiróide apresenta baixo índice de proliferação de células foliculares. No entanto, a ocorrência de tumores de tiróide indica que estas células possuem potencial para proliferar mediante a um estímulo mitogênico. A célula folicular da tiróide pode dar origem a tipos distintos de câncer: (i) o carcinoma papilífero (PTC) e (ii) o carcinoma folicular (FTC), exemplos de carcinomas bem diferenciados da tiróide; (iii) o carcinoma anaplásico (ATC), exemplo de carcinoma pouco diferenciado ou indiferenciado. O PTC é o tipo histo-patológico mais freqüente dos tumores tiroideanos, contabilizando 80% dos casos e apresenta freqüentemente metástases na cadeia linfática do pescoço. Apesar de ter origem a partir do mesmo tipo celular, o FTC tem morfologia e comportamento biológico diferentes do PTC. O FTC é mais comum em idosos e pode disseminar-se através da corrente sangüínea, originando metástases nos pulmões e ossos. O ATC é o subtipo menos freqüente e, no entanto, mais agressivo, onde a sobrevida média após o diagnóstico não ultrapassa 6 meses.

A proliferação celular folicular na tiróide é regulada principalmente pela ação da tirotrofina hipofisária (TSH), o iodo e fatores de crescimento (Riesco-Eizaguirre e Santisteban, 2006). Dentre estes fatores de crescimento destacam-se os de ação mitogênica, como os fatores de crescimento *insulin-like* I e II (IGF-I e IGF-II), o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de

crescimento de fibroblasto (FGF) e o fator de crescimento de hepatócito (HGF), e os de ação anti-mitogênica, entre eles o fator beta de transformação do crescimento (TGF- β) (Dremier et al., 1994; Kimura et al., 1999; Maciel et al., 1995; Matsuo et al., 2004).

Os eventos genéticos mais freqüentes na transformação maligna do tecido tireoideano estão bem caracterizados e envolvem a ativação de vias de sinalização que estimulam a proliferação, principalmente a via MAPK (Figura 3). Rearranjos cromossômicos do tipo RET/PTC estão presentes em 30-40% dos casos de carcinoma papilífero nos EUA (Santoro et al., 1992). RET, uma proteína do tipo tirosina-kinase, é um receptor transmembrana geralmente ativado após a ligação de um de seus ligantes. A fusão da extremidade 3' do proto-oncogene RET com a extremidade 5' de diversos genes expressos na célula folicular, codificam para uma proteína citoplasmática, com habilidade de dimerização e resulta em sua autofosforilação independente da ativação por seus ligantes, levando à constante ativação dos membros à jusante na cadeia. Outra alteração genética, uma mutação pontual no gene BRAF, é considerada a alteração genética mais fregüente no carcinoma papilífero (Kimura et al., 2003; Sobrinho-Simoes et al., 2005; Xing, 2007). Esta alteração consiste de uma troca de Timina por Adenina na posição 1799 do gene de BRAF, levando à substituição do aminoácido 600 valina por ácido glutâmico. Kimura et al. (2003) relataram a presença da mutação BRAFT1799A no gene em 36% dos casos de PTC e estudos subseqüentes mostraram que esta mutação está presente em 35-70% dos casos (Fukushima et al., 2003). A mutação BRAFT1799A causa sua ativação constitutiva nas células foliculares. Tanto os rearranjos RET/PTC quanto a mutação BRAFT1799A resultam na sustentação da ativação da via de sinalização de MAPK (Mitsutake et al., 2005; Santoro et al., 1996), promovendo maior capacidade de proliferação tumoral. No entanto, estes dois eventos moleculares raramente estão presentes num mesmo tumor (Namba et al., 2003; Soares et al., 2003).



Figura 3 - A via de sinalização de MAPK no câncer de tiróide. Rearranjos cromossômicos do tipo RET/PTC codificam para uma proteina de fusão citoplasmática com capacidade de autofosforilação e ativação de outras proteínas citoplasmáticas (PC). Estas proteínas levam a ativação de RAS, promovendo a fosforilação da proteína BRAF, que, por sua vez, promove a fosforilação em cadeia de MEK e ERK. ERK se dirige ao núcleo para promover a fosforilação de diversos fatores de transcrição (FT), os quais dirigem a transcrição de genes-alvo, promovendo maior potencial replicativo, levando à maior proliferação celular e sobrevivência a sinais indutores de morte celular.

Alterações em vias de inibição da proliferação também podem contribuir de forma significativa para a tumorigênese do PTC. O aumento da expressão de TGF- β 1 em tumores tiroideanos (Kimura et al., 1999) sugere a desregulação desta via de sinalização e a conseqüente insensibilidade da célula tumoral tiroideana ao seu sinal anti-proliferativo. Sabe-se que, em condições fisiológicas, a via de sinalização de TGF- β exerce forte estímulo inibitório da proliferação em células epiteliais (Heldin et al., 2009). De fato, a célula folicular tiroideana tem sua proliferação e diferenciação celular fortemente controlados pela via de TGF- β (Taton et al., 1993). TGF- β é membro da superfamília de TGF- β , que inclui activinas, BMP (proteina morfogenética de osso) e GDNF (fator neurotrófico derivado de célula glial), entre outros (Massague, 1998).

Como esquematizado na figura 4, a ativação da transdução do sinal de TGF-β em células epiteliais tem início após a ligação do peptídeo TGF-β ao seu receptor tipo II (TBRII) e a sua subsequente ligação com o receptor tipo I (TβRI). Esta dimerização leva à fosforilação de proteínas citoplasmáticas denomidadas R-SMADs (SMADs reguladas por receptor). Dois tipos de proteínas R-SMADs participam da transdução de sinal de TGF-β, SMAD2 e SMAD3, e sua fosforilação promove a formação de homodímeros (pSMAD2/2 ou pSMAD3/3) ou heterodímeros (pSMAD2/3). A transdução do sinal é então mediada por uma proteína SMAD co-estimulatória (C-SMAD), comum à transdução de outros membros da super-familia de TGF-β, SMAD4. O dímero pSMAD liga-se à SMAD4 translocando-se para o núcleo e controlando a transcrição de diversos genes alvo (Heldin et al., 1997; Kretzschmar e Massague, 1998). Como mecanismo de autorregulação, a dimerização entre Rpor proteínas SMADs pode ser inibida SMAD inibitórias (I-SMAD), representadas pela proteína SMAD7 em células epiteliais.



Figura 4 - A transdução do sinal de TGF-β. A ativação da transdução do sinal de TGF-β tem início com a ligação de uma das isoformas de TGF-β ao seu receptor tipo II (TβR-II), recrutando seu receptor tipo I, levando à fosforilação das SMADs 2 e 3. Este complexo se associa à proteina SMAD4 e transloca-se para o núcleo, onde dirigirá a transcrição de diversos genes-alvo.

Alterações genéticas envolvendo o gene que codifica SMAD4 (Smad family member 4/ Mothers against decapentaplegic homolog 4), um importante membro efetor na via de TGF-B, já foram descritas em adenocarcinomas pancreáticos e tumores gastro-intestinais metastáticos (revisto em Yang e Yang, 2010). No entanto estes eventos são raramente observados em tumores de tiróide. Mutações pontuais e splicing alternativo no gene que codifica para SMAD4 já foram descritas, contudo em um pequeno grupo de tumores tiroideanos (Lazzereschi et al., 2005). A regulação da via de TGF-ß por miRNAs já foi observada em outros tipos de tumores (revisto em Heldin et al., 2009), no entanto, no câncer de tiróide os eventos moleculares envolvidos no escape do sinal inibitório de TGF-β ainda são pouco conhecidos. Considerando *miR-146b-5p* um dos miRNAs mais expressos no PTC, realizamos uma análise bioinformática e observamos SMAD4 como um potencial alvo deste miRNA. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi entender como o envolvimento do *miR-146b-5p* na modulação da transdução do sinal de TGF-β pode contribuir para a transformação maligna da tiróide.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Entender o papel de miR-146b-5p no carcnoma papilífero de tiróide.

2.2 Objetivos específicos

1) Analisar a influência da ativação dos oncogenes *RET/PTC* e *BRAFT1799A* na expressão de *miR-146b-5p* em células foliculares tiroideanas normais e tumorais;

 Analisar o papel do miRNA *miR-146b-5p* na modulação da via de TGF-β e sua implicação na tumorigênese da tiróide *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise da região promotora de *MIR146B*

Para a análise da região promotora de *MIR146B*, a sequência do precursor de *miR-146b-5p* (*mir-146b*), de acordo com miRBase (Griffiths-Jones, 2004), foi alinhada contra o genoma humano utilizando o programa BLAT (www.genome.ucsc.edu). A região genômica de 1000 kb à montante do primeiro nucleotídeo de *mir-146b* foi selecionada. A análise *in silico* desta seqüência foi realizada pelo programa Transcription Element Search System (TESS, *University of Pennsylvania*, http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess).

3.2 Busca on-line por alvos preditos de *miR-146b-5p*

A busca por alvos preditos computacionalmente de *miR-146b-5p* foi realizada *on-line* utilizando os programas: TargetScan (Lewis et al., 2005) e PICTAR (Krek et al., 2005).

3.3 Cultura celular

As linhagens celulares de tiróide normal de rato, PCCL3, PC-rtTA, de carcinoma papilífero de tiróide, TPC-1, e de carcinoma anaplásico de tiróide FRO e ARO, foram gentilmente cedidas pelo Dr James A. Fagin (*Memorial Sloan-Kettering Cancer Center from the University of Cincinnati College of Medicine, New York, NY, USA*). A linhagem de carcinoma papilífero de tiróide BCPAP foi gentilmente cedida pelo Dr. Massimo Santoro (*Universita Federico II di Napoli, Napoli, Italia*). A linhagem de carcinoma colorretal HT29 foi gentilmente cedida pela Dra. Alison Colquhoun (*Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil*).

A linhagem PCCL3 mantém, em cultura, a expressão da maioria dos marcadores típicos da diferenciação tiroideana, como dependência de TSH, síntese e secreção de tiroglobulina e habilidade de capturar iodo do meio (Fusco et al., 1987). A linhagem PCCL3 foi cultivada em meio HAMF-12, contendo 5% soro fetal bovino (SFB) e suplementado com TSH (1 mU/mL),

insulina (10 µg/mL), apotransferrina (5 µg/mL), hidrocortisona (10 ng/mL), antibióticos penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e anfoterecina (1 µg/mL). A linhagem PC-rtTA é derivada da linhagem PCCL3 e expressa o complexo repressor da tetraciclina, parte integrante do sistema de expressão condicionada por doxiciclina (Saavedra et al., 2000). As linhagens PTC3-5 e PC-BRAF são derivadas da linhagem parental PC-rtTA e expressam o RET/PTC3 rearranjo cromossômico е 0 oncogene BRAFT1799A, respectivamente de forma induzível por doxiciclina (Ricarte-Filho et al., 2009; Wang et al., 2003). A linhagem TPC-1 possui espontaneamente o rearranio cromossômico RET/PTC-1 e foi cultivada em meio DMEM, suplementado com soro fetal bovino 5% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A linhagem BCPAP possui espontaneamente o oncogene BRAFT1799A e foi cultivada em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino 10% (Invitrogen). As linhagens ARO, FRO e HT29 possuem espontaneamente a mutação BRAFT1799A e foram cultivadas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino 5%. Todas as linhagens foram mantidas em estufa sob condições de 5% de CO₂, a 37 °C. A tabela 3 resume as características de cada linhagem utilizada nesse estudo.

Linhagem Celular	Características	Linhagem Parental	Alteração genética	Referência
PCCL3	Derivada de glândula	-	-	(Fusco et al., 1987)
	tiróide normal de rato			
PC-rtTA	Derivada de glândula	PCCL3	rtTA	(Saavedra et al.,
	tiróide normal de rato			2000)
PC-146b	Derivada de glândula	PC-rtTA	miR-146b (induzível	(Geraldo et al.,
	tiróide normal de rato		por doxiciclina)	2011)
PC-CMV-Ø	Derivada de glândula	PCCL3	pcDNA3.1 vazio	(Geraldo et al.,
	tiróide normal de rato			2011)
PC-CMV-146b	Derivada de glândula	PCCL3	miR-146b (estável)	(Geraldo et al.,
	tiróide normal de rato			2011)
PTC3-5	Derivada de glândula	PC-rtTA	RET/PTC3 (induzível	(Wang et al., 2003)
	tiróide normal de rato		por doxiciclina)	
PC-BRAF	Derivada de glândula	PC-rtTA	BRAFT1799A	(Ricarte-Filho et al.,
	tiróide normal de rato		(induzível por	2009)
			doxiciclina)	
TPC-1	Derivada de carcinoma	-	RET/PTC1	(Tanaka et al.,
	papilífero de tiróide		(espontâneo)	1987)
BCPAP	Derivada de carcinoma	-	BRAFT1799A	(Fabien et al., 1994)
	papilífero de tiróide		(espontâneo)	
FRO	Derivada de carcinoma	-	BRAFT1799A	(Nishihara et al.,
	anaplásico de tiróide		(espontâneo)	1997)
ARO	Derivada de carcinoma	-	BRAFT1799A	(Lahat et al., 1992)
	anaplásico de tiróide		(espontâneo)	
HT29	Derivada de carcinoma	-	BRAFT1799A	(von Kleist et al.,
	colorretal		(espontâneo)	1975)

Tabela 3 - Linhagens celulares utilizadas.

3.4 Construções

3.4.1 Construção do vetor pUHG-146b para expressão condicionada de miR-146b-5p

O plasmídeo pcDNA3.1 contendo a região genômica do miRNA *miR-146b-5p* (pcDNA3-mir146) foi gentilmente cedido pelo Dr. Konstantin D. Taganov (*Division of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, CA, USA*). O inserto foi removido do plasmídeo pcDNA3 após digestão-dupla com as enzimas de restrição *Hind*III (10U) e *Xba*I (10U) (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), na presença de 1X NEB Buffer 2 em volume final de 50 µL (Figura 5A). Em seguida, o inserto foi purificado utilizando o kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) de
acordo com instruções do fabricante. As extremidades coesivas foram preenchidas utilizando a enzima Klenow Large Fragment (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) nas seguintes condições: 0,1 mM dNTP Mix, 1X Klenow Buffer e enzima Klenow (2U) em volume final de 40 µL, durante 15 min a 37 °C. O fragmento foi novamente purificado e clonado no vetor de expressão induzível pUHG10-3 previamente digerido em extremidades blunt na presença de DNA Ligase (20U, New England Biolabs), 1X Ligase Buffer e 50 ng de vetor, em volume final 20 µL. O produto resultante da ligação foi purificado novamente e 2 µL foram transformados por eletroporação em bactérias E. coli XL1-Blue, sendo estas plaqueadas em L.B. Ágar contendo ampicilina (100 mg/mL). 10 clones originados da transformação foram escolhidos e o DNA plasmidial de cada clone foi extraído utilizando o kit Wizard®Plus SV Minipreps (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com instruções do fabricante. Os clones foram então digeridos com enzima Xhol (2U, Fermentas) na presença de 1X R+ Buffer, em volume final de 30 µL, para a confirmação da presença do inserto no vetor e de sua orientação correta (Figura 5B). Um dos clones que apresentaram o padrão de digestão compatível com a presença do inserto em sua orientação correta foi següenciado utilizando o primer específico para o vetor pUHG10-3 (pUHG10-3 Fw 5'-ATCCACGCTGTTTTGACCTC-3') (Figura 5C). Este plasmídeo foi nomeado pUHG-146b.





Figura 5 - Contrução do vetor pUHG-146b. (A) Eletroforese em gel de agarose 1% para a purificação do inserto contendo a região genômica do gene miR-146b, de aproximadamente 450 bp, a partir da digestão dupla do plasmídeo pcDNA3.1 com as enzimas HindIII e Xbal (H/X). (B) Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a confirmação da orientação do inserto miR-146b-5p clonado no vetor pUHG10-3 através de digestão com Xhol. A digestão do plasmídeo contendo o inserto clonado em sua orientação correta deve gerar um fragmento de aproximadamente 1,0kb (canaletas 13, 14 e 16) e na orientação contrária, de aproximadamente 450 bp (canaleta 15) (C) Correto alinhamento de parte da seqüência do clone 13 à região genômica de miR-146b-5p (10q24.32), evidenciando, no quadro em vermelho, a pre-miRNA seqüência do miR-146b-5p (BLAST http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi). (D) Sequencia completa do Clone 13. Em azul sequencia do vetor pUHG10-3. Em preto, inserto contendo a região genômica de miR-146b. Em vermelho, o precursor mir-146b.

3.4.2 Construção dos vetores pmiRGlo-SMAD4 3'UTR-wt e -Mut para ensaio de gene repórter

O sítio predito de ligação de *miR-146b-5p* na região 3'UTR de SMAD4 foi obtido utilizando o programa TargetScan. Um par de oligonucleotídeos contendo a região 3'UTR de SMAD4 correspondente ao sítio predito de miR-146b-5p foi sintetizado: Smad4-3'UTR-Fw-wt 5' - T C G A G T A G C G G C C G C T A G T T T T A A A G G C A G A G A A G T T C T C A A T - 3', Smad4-3'UTR-Rev-wt 5' - C T A G A T T G A G A A C T T C T C T G C C T T T A A A A C T A G C G G C C G C T A C - 3' (Figura 5A). Estes dois oligonucleotídeos possuem seqüências complementares entre si, de forma que, ao serem anelados, compõem um segmento de DNA de fita dupla correspondente ao sítio de ligação de miR-146b-5p à região 3'UTR de SMAD4. O segmento formado possui extremidade coesivas aos sítios de restrição correspondentes às enzimas Xhol e Xbal. Da mesma forma, outro par de oligonucleotídeos foi sintetizado: Smad4-3'UTR-Fw-Mut 5'-T C G A G T A G C G G C C G C T A G T TTTAAAAccCAGAGAAAcaagaCAAT-3', Smad4-3'UTR-Rev-Mut 5' - CTAGATTG*tcttg*TTCTCTGggTTTAAAACTAGCGGCC G C T A C - 3' (Figura 6A e B). Este par de oligonucleotídeos contém mutações misense, inviabilizando a ligação de miR-146b-5p a seu sítio predito. Para a confirmação de clonagem destes fragmentos no vetor, foi inserido sítio de restrição para a enzima Notl nos dois conjuntos de oligonucleotídeos. Os oligonucleotídeos foram diluídos a concentração de 1 µg/µL e anelados em Tampão de Anelamento incluído no kit pmiRGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega), nas seguintes condições: aquecimento a 90 °C por 3 min, seguido de incubação em banho-maria a 37 °C por 15 min. Os segmentos resultantes do anelamento foram novamente diluídos à concentração final de 4 ng/µL. Assim, após dupla digestão do plasmídeo pmiRGLO (Promega) com as enzimas Xhol e Xbal, foi realizada ligação de 4 ng de oligonucleotídeos anelados a 50 ng de vetor pmiRGlo linearizado, em presença de DNA Ligase (20U, New England Biolabs), 1X Tampão de Ligase, em volume final 20 µL. O produto resultante da ligação foi purificado novamente e 2 µL foram transformados por eletroporação em bactérias E. coli XL1-Blue, sendo estas plaqueadas em L.B. ágar-ágar contendo ampicilina

(100 mg/mL). DNA plasmidial de 10 clones originados da transformação foram extraídos utilizando o kit Wizard®Plus SV Minipreps (Promega) de acordo com instruções do fabricante. Os clones foram então digeridos com enzima *Not*l (2U, Fermentas) na presença de 1X O+ Buffer, em volume final de 30 μL, para a confirmação da presença do inserto no vetor (Figura 6C).

А			
Posição 390-39	7 SMAD4 3' UTR	UUUUAAAGGCAGAGAAGUUCUCA	•
	hsa-miR-146b	UCGGAUACCUUAAG-UCAAGAGU	
В			
SMAD4 3'UTR V	/T		
1) Smad4-3'UTR-F 2) Smad4-3'UTR-R	w-wt TCGAG ev-wt CTAGA	TAGCGGCCGCTAGTTTTAAAGGCAGAGAAGTTC TTGAGAACTTCTCTGCCTTTAAAACTAGCGGCC	TCAAT GCTAC
5' TCGAG T	A GCGGCCGC TAG	TTTTAAAGGCAGAGAAGTTCTCAA T	3′
3' C A'	I CGCCGGCG ATC	AAAATTTCCGTCTCTTCAAGAGTT AGATC	5 ′
Xhol	Notl	sítio de ligação de miR-146b-5p Xbal	
SMAD4 3'UTR M	lut		
 Smad4-3'UTR-E Smad4-3'UTR-E 	'w-Mut TCGAG ev-Mut CTAGA	TAGCGGCCGCTAGTTTTAAA <mark>CC</mark> CAGAGA <mark>Acaag</mark> TTG <mark>tcttg</mark> TTCTCTG <mark>gg</mark> TTTAAAACTAGCGGCC	<mark>gaC</mark> AAT CGCTAC
5' TCGAG T	A GCGGCCGC TAG	TTTTAAAccCAGAGAAcaagaCAA T	3′
3' C A'	CGCCGGCG ATC	AAAATTTggGTCTCTTgttctGTT AGATC	5 '
Xhol	Notl	sítio de ligação de miR-146b-5p Xbal	
	С	wt mut	

Figura 6 - Construção dos vetores pmiRGIo-SMAD4-3'UTR-wt e -Mut para ensaio de gene reporter. (A) Sítio predito de ligação de miR-146b-5p na 3'UTR de SMAD4, segundo o programa TargetScan (www.targetscan.org). (B) Um par de oligonucleotídeos (Smad4-3'UTR-Fw-wt e Smad4-3'UTR-Rev-wt) sintetizados para compor um segmento de DNA contendo o sítio predito de ligação de miR-146b-5p na 3'UTR de SMAD4. Um segundo par de oligonucleotídeos (Smad4-3'UTR-Fw-Mut e Smad4-3'UTR-Rev-Mut) contendo mutações na região seed do sítio de ligação de miR-146b-5p foi utilizado como controle. Os oligonucleotídeos foram desenhados de forma que, ao serem anelados, contenham, além do sítio de ligação de miR-146b, os sítios de restrição para as enzimas Xbal e Xhol, nas extremidades, e Notl na região central do inserto. (C) Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a confirmação da clonagem dos insertos contendo o sítio de de ligação de miR-146b, por meio da digestão dos plasmídeos pmiRGIo-SMAD4-wt e –Mut com Notl. (wt) pmiRGIo-SMAD4-wt, (mut) pmiRGIo-SMAD4-mut, (d) digerido com enzima Notl, (nd) não digerido, (Ø) plasmídeo pmiRGIo vazio digerido com enzima Notl.

3.5 Expressão condicionada de *miR-146b* regulada pela tetraciclina em linhagem PCCL3

O modelo de expressão do *miR-146b-5p* na linhagem PCCL3 utiliza o sistema de expressão induzível por doxiciclina, um derivado intracelular da tetraciclina (Gossen e Bujard, 1992). A linhagem PC-rtTA, conforme mencionado anteriormente, deriva da linhagem PCCL3 e contém vetor que expressa um mutante do complexo repressor de tetraciclina (rtetR), parte da maquinaria de expressão condicionada pela doxiciclina. Esta linhagem foi transfectada com o plasmídeo construído pUHG-146b, o qual possui *mir-146b* clonado sob o controle de um promotor responsivo ao complexo repressor da tetraciclina. Assim, à medida que doxiciclina é adicionada ao meio de cultura, esta se liga ao complexo repressor da tetraciclina, promovendo a transcrição de *miR-146b*. Um esquema ilustrativo do mecanimo de indução condicionada de *miR-146b-5p* está representado na Figura 7.



Figura 7 - Modelo de expressão gênica condicionada pela doxiciclina. (A) O elemento repressor (tetR) é transcrito em fusão ao domínio ativador VP16 (AD) formando o complexo denominado rtTA. (B) À medida que doxiciclina é adicionada ao meio, este complexo liga-se ao Elemento Responsivo À Tetraciclina (TRE) e ativa a transcrição do gene de interesse (GOI).

3.5.1 Transfecção do plasmídeo pUHG-146b em linhagem PC-rtTA

Para a transfecção do plasmídeo pUHG-146b, a linhagem celular PCrtTA foi cultivada em placas de 6 poços até atingir 80 a 90% de confluência. Como o plasmídeo pUHG10-3 apresenta gene resistência apenas à ampicilina, foi realizada uma co-transfecção com plasmídeo pTK-Hyg, que possui gene de resistência à Higromicina, na proporção de 1 molécula deste para 10 moléculas de pUHG-146b. Assim, supõe-se que as células que receberam o plasmídeo pTK-Hyg e apresentaram resistência à higromicina tenham chances 10 vezes maiores de incorporarem pUHG-146b. A transfecção foi realizada em duplicata, utilizando como carreador lipídio catiônico Lipofectamine 2000® (Invitrogen), segundo instruções do fabricante. Desta forma, 2,5 µg do plasmídeo pUHG-146b e 0,25 µg do plasmídeo pTK-Hyg foram incubados em meio Optimen® (Invitrogen) à temperatura ambiente por 30 min na presença de 15 µL de Lipofectamine em meio de cultura. Em seguida a mistura foi adicionada à cultura. Após 24 h da transfecção, iniciamos a seleção de células transfectadas pela adição de Higromicina. As linhagens resistentes foram então expandidas, tripsinizadas e congeladas em freezer -70 °C na presença de 10% DMSO.

3.5.2 Indução da expressão de miR-146b-5p

 5×10^5 células foram semeadas em 2 placas de 60 mm. Após 48 h, uma das placas recebeu doxiciclina (1 µg/mL) enquanto a outra não a recebeu. Após 72 h de tratamento, o meio foi aspirado, as culturas foram lavadas 2 X com tampão fostafo salino (PBS) e 1 mL de reagente TRIzol® foi adicionado à cada placa para a lise celular e extração do RNA total. A confirmação da indução da expressão de *miR-146b-5p* foi realizada por PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR), como descrito a seguir. Foi considerada como indução de expressão o aumento de pelo menos 2 X nos níveis transcricionais de *miR-146b-5p* na linhagem induzida quando comparados à linhagem não induzida. A morfologia das linhagens transfectadas foi observada constantemente durante o cultivo em microscópio invertido (Olympus CK2, Japão).

3.6 Expressão condicionada dos oncogenes *RET/PTC3* e *BRAFT1799A* em linhagem PCCL3

As linhagens PTC3/5 e PC-BRAF expressam respectivamente os oncogenes *RET/PTC3* e *BRAFT1799A* de maneira induzida por doxiciclina. Para a avaliação da influência da via MAPK sobre a expressão de *miR-146b*, os oncogenes foram induzidos por meio da adição de doxiciclina ao meio de cultura por 72 h. Para tanto, 5×10^5 células foram semeadas em placas de 60 mm. Após 48 h, as placas receberam doxiciclina (1 µg/ mL). A linhagem não tratada com doxiciclina foi utilizada como controle. Após 72 h de tratamento, o meio foi aspirado, as culturas foram lavadas 2 X com Solução Salina (PBS) e 1 mL de reagente TRIzol® foi adicionado à cada placa para a lise celular e extração do RNA total. A confirmação da indução da expressão de *miR-146b-5p* foi realizada por PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR), como descrito a seguir.

3.7 Modelo de expressão estável de miR-146b-5p em linhagem PCCI3

Para a transfecção do plasmídeo pcDNA3.1 contendo a região genômica de miR-146b, a linhagem celular PCCI3 foi cultivada em placas de 6 poços até atingir 80 a 90% de confluência. A transfecção foi realizada em triplicata, utilizando como carreador lipídio catiônico Lipofectamine 2000® (Invitrogen), segundo instruções do fabricante. Desta forma, 2,5 µg do plasmídeo pcDNA3.1 vazio ou pcDNA3.1-miR-146b foram incubados em meio Optimen® à temperatura ambiente por 30 min na presença de 15 µL de Lipofectamine em meio de cultura. Em seguida a mistura foi adicionada à cultura. Após 24 h da transfecção, iniciamos a seleção de células transfectadas pela adição de Neomicina (Invitrogen). As linhagens foram nomeadas: PC-CMV-Ø, para as células transfectadas com o vetor vazio, e PC-CMV-146b-1, -2 e -3, para as três transfecções de pcDNA3.1-miR-146b. As linhagens resistentes foram então expandidas, tripsinizadas e congeladas em freezer -70 °C na presenca de 10% DMSO. Para cada uma das transfecções 5 x 10⁵ células foram semeadas em placas de 60 mm. Após 72 h o meio foi aspirado, as culturas foram lavadas 2 X com PBS e 1mL de reagente TRIzol® foi adicionado à cada placa para a lise celular e extração do RNA total. A confirmação da superexpressão de *miR-146b-5p* foi realizada por PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR), como descrito a seguir. A morfologia das linhagens transfectadas foi observada constantemente durante o cultivo em microscópio invertido (Olympus CK2, Japão). A linhagem PC-CMV-146b-2 foi escolhida para os experimentos subseqüentes.

3.8 Tratamento das linhagens celulares de carcinoma papilífero TPC-1 e BCPAP com inibidores da via MAPK

Os inibidores químicos da via MAPK foram obtidos comercialmente: inibidor específico do efetor da via MAPK, MEK1 PD98059 (2'-Amino-3'methoxyflavone) e o inibidor de MEK1/2 U0126 (Promega). Ambos os inibidores foram reconstituídos em DMSO. As linhagens TPC-1 e BCPAP foram semeadas em placas de 60 mm na densidade de 5 x 10⁵ células. Após 24 h, as linhagens foram tratadas com os inibidores, nas concentrações 20 µM para PD98059 e 10 µM para U0126. As linhagens tratadas apenas com a solução veículo, DMSO, foram utilizadas como controle. Após 72 h de tratamento, o meio foi aspirado, as culturas foram lavadas 2 X com PBS e 1 mL de reagente TRIzol® foi adicionado à cada placa para a lise celular e extração do RNA total. A confirmação da indução da expressão de *miR-146b-5p* foi realizada por PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR), como descrito a seguir.

3.9 Supressão transiente de *miR-146b-5p* endógeno nas linhagens celulares de carcinoma papilífero de tiróide TPC-1 e BCPAP

O inibidor sintético específico anti-miR-146b, obtido comercialmente (anti-miR-146b-5p, AM10105, Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foi utilizado para realizar a supressão do *miR-146b-5p* endógeno. O inibidor anti-miR-146b é composto pela seqüência complementar do *miR-146b-5p* e possui alguns de seus ribonucleotídeos com a ribose modificada do tipo LNA (*Locked Nucleic Acid*), o que confere maior especificidade.

Para a transfecção das linhagens TPC-1 e BCPAP com anti-miR-146b: 5 x 10^4 células foram semeadas em placas de 24 poços (para experimentos de contagem de células); 1 x 10^4 células foram semeadas em placas de 96 poços (para análise de MTT); 1 x 10^5 células foram semeadas em placas de 60 mm (para extração de RNA) e 5 x 10^5 foram semeadas emplacas de 100 mm (para extração de proteínas). Após 24 h a transfecção foi realizada em triplicatas, utilizando duas concentrações diferentes de anti-miR-146b, 10 e 25 nM, e Lipofectamine 2000® (Invitrogen), segundo instruções do fabricante. Outro grupo das linhagens TPC-1 e BCPAP foi submetido à transfecção, porém não recebeu anti-miR-146b (grupo Mock) enquanto outro grupo sofreu transfecção de um Controle Negativo, (anti-miR-1, AM17010, Applied Biosystems), para a avaliação da especificidade do silenciamento.

3.10 Ensaio de gene repórter Luciferase

Para a validação da regulação pós-transcricional de SMAD4 por miR-146b-5p, a linhagem de carcinoma anaplásico de tiróide foi semeada em placas de 12 poços na densidade de 5 x 10⁴ células por poço. Após 24 h do plaqueamento, as células foram transfectadas com 2,5 µg do vetor repórter (pmiRGlo-SMAD4-3'UTR-wt ou -Mut) na presença ou ausência de 3,0 µg do plasmídeo que expressa miR-146b-5p (pcDNA3.1-miR146b) e 25 nM do inibidor de *miR-146b-5p* (anti-miR-146b). Como controle foi realizada transfecção com plasmídeo que expressa outro miRNA, miR-21 (pcDNA3.1miR-21). Um esquema representativo da estratégia utilizada para a validação da regulação pós-transcricional de SMAD4 por miR-146b-5p utilizando o ensaio de gene repórter luciferase está mostrado na figura 8. Quarenta e oito horas após a transfecção células foram lavadas 2 vezes com PBS. A lise celular e a reação de luminescência foram realizadas utilizando o kit Dual-Glo Luciferase Assay (Promega) conforme instruções do fabricante. A leitura do sinal de luminescência foi realizada em placa opaca de 96 poços, em luminômetro SpectraMax L (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Para a avaliação da modulação da via de TGF-β por *miR-146b-5p* na linhagem TPC-1, utilizamos o plasmídeo p3TP-Lux, que possui o gene da luciferase clonado sob o controle de um promotor com elementos responsivos para a via de TGF- β (Wrana et al.,

1992). Para tanto, 5 x 10⁴ células por poço foram semeadas em placas de 12 poços. Após 24 h do plaqueamento, as células foram transfectadas ou não com anti-miR-146b (25 nM) e 2,5 µg do vetor repórter p3TP-Lux, gentilmente doado pelo Dr. Joan Massagué (*Cancer Biology and Genetics Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY, USA*). Após 24 h de transfecção as células receberam ou não rTGF-β1 (1 ng/mL) por 48 h. As células foram então lavadas 2 vezes com PBS, lisadas e a reação de luminescência foi realizada conforme mencionado.



Figura 8 - Ensaio de Gene Reporter Luciferase para a validação funcional de alvos de miRNAs. O segmento contendo o potencial sítio de ligação de miR-146b-5p na 3'UTR de SMAD4 é clonado em plasmídeo pmiRGlo, em fusão ao gene da luciferase, genrando o plasmídeo pmiRGlo-SMAD4-3'UTR-wt. A transfecção de pmiRGlo-SMAD4-3'UTR-wt é realizada concomitantemente com pcDNA-miR-146b. Se miR-146b-5p se liga diretamente à 3'UTR de SMAD4, haverá repressão pós-transcricional do mRNA da luciferase, que resultará em diminuição dos níveis de luminescência. Como controle, a co-transfecção com Anti-miR-146b (Anti-146b) ou a transfecção de um plasmídeo pmiRGlo-SMAD4 contendo mutações no sítio de ligação de miR-146b-5p impedirão a ligação de miR-146b-5p na 3'UTR de SMAD4, restaurando os níveis de luminescência.

3.11 Tratamento das linhagens celulares com TGF-β1 recombinante

Para análise da influência de *miR-146b-5p* na sinalização TGF-β, as linhagens PC-146b, PC-CMV-Ø, PC-CMV-146b e TPC-1 foram submetidas ao tratamento com TGF-β1 recombinante (rTGF-β1, Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) na concentração de 1 ng/mL. A linhagem PC-146b foi semeada em densidade de 5 x 10⁴ células, em placas de 60 mm de diâmetro e cultivadas na presença ou ausência de doxiciclina por 72 h, quando foi adicionado rTGF-β1 à cultura. Após 24 h RNA total foi extraído como descrito no item 3.12.1. A linhagem TPC-1 foi semeada em placas de 96 poços, na densidade de 1 x 10⁴ células por poço, transfectadas com inibidor anti-miR-146b, conforme descrito no item 3.9. Após 24 h da transfecção, rTGF-β1 foi adicionado à cultura, seguido de mais 24 h de incubação e análise de proliferação celular pelo método de MTT, como descrito no item 3.15.2. Para análise em microscopia confocal a laser, a linhagem TPC-1 foi semeada sobre lamínulas em placas de 6 poços, inibidor anti-miR-146b foi transfectado e após 72 h de transfecção, rTGF-β1 foi adicionado à cultura seguido de incubação por 1 h.

3.12 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real

3.12.1 Extração de RNA total

RNA total foi extraído das linhagens celulares em questão (PC-146b CTR e DOX, PTC3-5, PC-BRAF, PC-CMV-Ø e -146b, TPC-1, BCPAP) baseado em Chomczynski e Sacchi (1987), utilizando-se reagente Trizol (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

3.12.2 Síntese de DNA complementar

A expressão do *miR-146b-5p* foi analisada através de ensaios de PCR em Tempo Real utilizando o kit de quantificação de miRNAs *Taqman® MiRNA Assays* específico para este miRNA (Part Number 4373178, Applied Biosystems). Este sistema utiliza síntese dirigida de cDNA para *miR-146b-5p* pelo método *Stem-Loop* onde o *primer* específico para o *miRNA* provoca a formação de um grampo sobre si mesmo, gerando maior estabilidade para a transcrição reversa (Chen et al., 2005), como mostrado na figura 9. Para maximizar a síntese de cDNA deste miRNA, foi utilizado o kit TagMan® MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Assim, de acordo com instruções do fabricante, 10 ng de RNA total foram utilizados para a síntese, na presença de 1,5 µL de tampão 10X, 0,15 µL de mix de dNTP (100 mM), 0,19 µL de inibidor de RNases (20 U/µL) e 1 µL de transcriptase reversa *Multiscribe*® (50 U/µL), e 3 µL de *primer* específico para *miR-146b-5p* e 4 µL de H₂O destilada e deionizada (ddH₂0). A reação foi realizada no gelo e depois submetida a 16 °C por 30 min, 42 °C por 30 min, seguida de inativação da transcriptase a 85 °C por 5 min, em termociclador Cyclogene (Thecne, Inglaterra). A síntese de cDNA utilizada para a quantificação do controle endógeno e dos demais genes analisados foi realizada utilizando 1 µg de RNA total, 1 µL de DTT (100 mM), 1 µL de inibidor de RNase (20 U/µL), 1 µL de mix de dNTP (10 mM) e 1 µL de transcriptase reversa M-MLV (*Murine-Moloney* Leukemia Virus, Invitrogen). A reação foi mantida a 21 °C por 10 min, a 42 °C por 30 min, seguida de inativação da transcriptase a 99 °C por 10 min, em termociclador Cyclogene (Thecne, Inglaterra). A expressão do miR-146b-3p, miRNA maduro proveniente do braço 3' de mir-146b, não foi analizada durante este estudo.



Figura 9 - Método Stem Loop para detecção da expressão de miRNAs por PCR quantitativo. O RT-primer, que contém região complementar ao miRNA de interesse, é adicionado à síntese de cDNA. O RT-primer forma uma estrutura secundária em forma de grampo, formando um segmento dupla-fita, o qual servirá de molde para a transcrição reversa do cDNA dirigida para o miRNA de interesse. Na reação de PCR, a estrutura secundária é desnaturada e serve de *template* para o primer reverso (Rev primer) e a sonda Taqman (TaqMan probe). O primer Forward (Fw primer) é específico para o miRNA de interesse. (FAM) fluoróforo reporter; (MGB) quencher não fluorescente (Chen et al., 2005).

3.12.3 PCR quantitativo em tempo real

Para a quantificação do produto formado durante a reação de PCR para miRNA foi utilizado o kit *Taqman® MiRNA Assay* Taqman® (Applied Biosystems). Assim, foram usados 1,33 µL da síntese de cDNA, 10 µL de TaqMan® MicroRNA Master Mix, No AmpErase (Applied Biosystems), 1 µL do mix contendo sonda e primers específicos para *miR-146b-5p* e 7,67 µL de ddH₂0. Para a quantificação do produto formado durante a reação de PCR para mRNA foi utilizado o reagente *SYBR® Green Dye* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em volume final de 20 µL, utilizando 5 µL de cDNA diluído 10 vezes a partir do volume final da síntese de cDNA (~5 ng), 5 µL de

primers específicos, e 10 μL do reagente 2X *Master Mix SYBR*® *Green* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em termociclador ABI 7300 Sequence Detection System® (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, e 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. Para as reações de qPCR utilizando *SYBR*® *Green Dye*, a especificidade da reação foi avaliada, após o término da reação, através da análise da dissociação do produto amplificado. O programa 7300 SDS Software foi utilizado para a análise dos dados obtidos. Uma lista com os *primers* específicos sintetizados para a detecção da expressão de genes relacionados com a diferenciação tiroideana, o ciclo celular e a via de TGF-β, assim como os controles endógenos utilizados, está demonstrada na Tabela 4.

Gene (espécie)	Nome oficial	№ de acesso	Seqüência (5'-3')
Smad4 (r)	SMAD family member 4	NM_019275	Fw - CCCGAGTGCGTATATAAAGGTCTTT
	-		Rev – CGCCTGCTGCTGCATCT
Myc (r)	Myelocytomatosis oncogene	NM_012603.2	Fw – AAGAGCTCCTCGCGTTATTTGA
			Rev – TCGTGACTGTCGGGTTTTCC
Tgf-β1 (r)	Transforming growth factor,	NM_021578.2	Fw – AAGAAGTCACCCGCGTGCTA
	beta 1		Rev – TGTGTGATGTCTTTGGTTTTGTCA
Nis (r)	Solute carrier family 5	NM_052983.2	Fw – GATCCCCAGTTCTGGAATGGA
	(sodium iodide symporter)		Rev - AGAGATAGGAGATGGCGTAAAAGG
Tshr (r)	Thyroid stimulating hormone	NM_012888.1	Fw – TCGAGACTCACCTGAAGACCATT
.,	receptor		Rev – TCGCTGCAGAGTGGCATCTAT
Тро (r)	Thyroid peroxidase	NM_019353.1	Fw – ACAGTTCTCCACGGATGCACTA
			Rev – GGCAAGAAGCATCCTGACAGGTT
Tg (r)	Thyroglobulin	NM_030988.1	Fw – CTCAGGACGATGGGCTTATC
,			Rev – GTTCGGCCTTGGCTTTCTTC
Rpl19 (r)	Ribosomal protein L19	NM_031103.1	Fw – CCAATGAAACCAACGAAATCG
			Rev – TCAGGCCATCTTTGATCAGCTT
SMAD4 (h)	SMAD family member 4	NM_005359	Fw – CAGGTGGCTGGTCGGAAA
			Rev – AGATCAGGCCACCTCCAGAGA
CDKN1A (h)	Cyclin-dependent kinase	NM_000389.4	Fw – CTGGAGACTCTCAGGGTCGAA
	inhibitor 1A (p21, Cip1)		Rev – GGCGTTTGGAGTGGTAGAAATCT
TGF-β1 (h)	Transforming growth factor,	NM_000660	Fw – CGCGTGCTAATGGTGGAAA
	beta 1		Rev –CGGAGCTCTGATGTTGTTGAA
NIS (h)	Solute carrier family 5	NM_000453.2	Fw – AGTACATTGTAGCCACG
	(sodium iodide symporter)		Rev – CGGTCACTTGGTTCAGGAT
TSHR (h)	Thyroid stimulating hormone	NM_000369.2	Fw – CCTTCACCTCACACGGGCT
	receptor		Rev -TGCTCTCATTACACATCAAGGACTC
TPO (h)	Thyroid peroxidase	NM_175719.3	Fw – ACGCCTCTGCGAGGTGC
			Rev – TGCAAATCACCGTCGAGGT
TG (h)	Thyroglobulin	NM_003235.4	Fw – CCTGCTGGCTCCACCTTGTTT
			Rev – CCTTGTTCTGAGCCTCCCATCGTT
RPL19 (h)	Ribosomal protein L19	NM_000981.3	Fw – TCTCATGGAACACATCCACAA
			Rev – TGGTCAGCCAGGAGCTTCTT

			/		~	~ .
Tobolo /	Aligopuolootidooo	ucodoc n	sara analica a	In ove	racaa /	~~~~~
		INSAUDS I				
						goinou.

Nomes oficiais para *Rattus norvegicus* (r) e *Homo sapiens* (h) estão grafados de acordo com RGD - Rat Genome Database (http://rgd.mcw.edu/) e HGNC - HUGO Gene, respectivamente.

3.12.4 Cálculo da expressão gênica diferencial

para a quantificação da expressão gênica, Primeiramente, а concentração dos primers utilizados na reação de qPCR foi padronizada. A concentração ideal de primers foi obtida realizando-se reações utilizando diferentes concentrações de primers (entre 200 nM e 800 nM) e concentração fixa de cDNA. Foi escolhida a menor concentração, sem formação de dímeros, que não comprometesse a curva de amplificação (Figura 10A). Já para miR-146b-5p, visto que o ensaio é otimizado pelo fabricante, não foi realizada etapa de padronização. Pelo fato de ter sido escolhida a quantificação relativa entre as amostras, a eficiência de amplificação do produto teve de ser calculada. Desta forma, foram realizadas cinco diluições seriadas do cDNA template e uma curva-padrão foi construída, onde a média dos Cts obtidos em cada diluição variava em função do logaritmo da concentração de cDNA (Figura 10B e C). O coeficiente angular da reta obtida foi utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação do produto, segundo a fórmula: ef = 10^{-1/a} (sendo ef = eficiência, a= coeficiente angular da reta). Foram aceitos valores de eficiência entre 1,80 e 2,10. Para os ensaios de quantificação da expressão gênica utilizando SYBR Green® foi realizada curva de dissociação para avaliação da especificidade da reação (Figura 10D). O cálculo da expressão relativa entre as amostras foi realizado de acordo com a fórmula descrita por Pfaffl (2001), representada na figura 11. O gene RPL19, que codifica uma proteína ribossomal, foi utilizado como normalizador (controle endógeno) nas reações de qPCR para a análise de mRNA. Para a análise de miR-146b-5p foram utilizados os normalizadores comerciais snoRNA e RNU6B (Applied Biosystems) para a quantificação da expressão gênica de rato e humano, respectivamente.



Figura 10 - Padronização da reação de PCR quantitativo. (A) Diferentes concentrações de primers testadas em concentração fixa de cDNA. Por se tratarem de Kits comerciais, esta etapa não foi realizada para a detecção de miRNAs. (B) Diferentes diluições seriadas de cDNA template (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000). (C) Curva-padrão obtida a partir das reações realizadas em B. (D) Curva de dissociação utilizada para avaliar a especificidade da reação e a possível formação de dímeros de primers. Por se tratarem de ensaio TaqMan®, esta etapa não foi realizada para a detecção de miRNAs.



Figura 11 - Cálculo da expressão gênica relativa. Fórmula utilizada para cálculo da expressão gênica relativa (Pfaffl, 2001). *R*, Razão da expressão Tratada / Controle; *Ef alvo,* eficiência do gene alvo; *Ef Endo*, Eficiência do gene endógeno.

3.13 Análise da expressão protéica por Western blot

3.13.1 Extração de proteínas

Para análise da influência de miR-146b-5p sobre a expressão protéica de SMAD4, tanto nas linhagens PC-146b CTR e DOX, quanto na linhagem TPC-1 e BCPAP, extrato total protéico foi extraído 72 h após a indução com DOX (descrito no item 3.5.2) ou transfecção de anti-miR-146b (descrito no item 3.9). Para tanto, as placas foram lavadas 2 vezes com PBS, e raspadas com auxílio de "raspador" na presença de 1 mL de PBS. O raspado foi coletado em tubos de 1,5 mL e submetidos a centrifugação a 420 x g por 5 min a 4 °C. Após a remoção do sobrenadante, foram adicionados 100 µL de Tampão RIPA (20 mM de Tris-HCI, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1% de Nonidet P-40, 0,5% de desoxicolato de sódio, 1 mM de EDTA e 0,1% de SDS) e 10 µL de cocktail de inibidores de proteases (Sigma, St. Louis, MO, USA). Após incubação em gelo por 10min, foi realizada nova centrifugação a 20800 x g por 5 min a 4 °C. Finalmente, o sobrenadante contendo o extrato protéico total foi coletado em novo tubo, quantificado segundo Bradford (1976) e armazenado em freezer -70 °C. O extrato protéico proveniente das frações nuclear e citoplasmática de células TPC-1 foi obtido utilizando o kit ProteoJET[™] Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit (Fermentas) de acordo com instruções do fabricante.

3.13.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

O equivalente a 40 μ g de extrato protéico total, ou a 15 μ g dos extratos protéicos nuclear ou citoplasmático, adicionados de 1X *Loading Buffer* (0,5 M de Tris-HCl, pH 6,8; 192 μ L/mL de glicerol, 10% de SDS, 1% de azul de

bromofenol e 10 µL/mL de β–mercaptoetanol) foram submetidos a incubação a 99 °C por 10 min, e em seguida aplicados em cada canaleta do gel de poliacrilamida. As amostras de proteína foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% em equipamento de eletroforese vertical Mini-Protean® (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) usando tampão de corrida (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS; pH=8,Laboratories). Em seguida, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose Hybond™ECL™ (GE Healthcare) em tampão de transferência de proteína *Towbin* (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina e 20% de metanol; pH 8,3), por 16-18 h usando o equipamento de transferência úmida Mini-Protean® à voltagem de 15 V.

3.13.3 Imunodetecção

Após a lavagem com solução PBS, as membranas foram incubadas com solução de bloqueio (3% BSA em TBS) por 1 h. A membrana foi incubada com anticorpo primário monoclonal específico anti-SMAD4 (sc-7966), anti-Ciclina D1 (sc-753) e anti-Tubulina (sc-5286) e anti-Lamina A (sc-20680) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA) e anti-Nis em diluição de 1:500, em 4 mL de solução PBS contendo 0,5% de leite desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, Brasil) a 4 °C sob agitação constante por 16h. Após 3 lavagens de 10 min com solução PBS-T (PBS contendo 0,1% de Tween 20), a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-camundongo, conjugado à peroxidase (GE Healthcare, NXA931), em diluição 1:1000, por 2 h à temperatura ambiente. O complexo proteína-anticorpo foi detectado após incubação da membrana com solução reveladora contendo 5,5 µL/mL de 50 mM p-cumárico, 25 µL/mL de 50 mM luminol, 2,5 μ L/mL de 3,6% H₂O₂ em 1 mL de Tris-HCl (100 mM; pH 8,8) por 1 minuto e exposição da membrana em filme de Raios X (Kodak, Rochester, NY, USA). A subunidade α da tubulina foi utilizada para a normalização da expressão protéica.

3.14 Ensaio de imunofluorescência

A linhagem TPC-1 foi semeada sobre lamínulas em placas de 6 poços. Inibidor anti-miR-146b foi transfectado conforme descrito no item 2.4. Após 72 h de transfecção TGF- β foi adicionado à cultura. Após 1h de tratamento com TGF- β , as células foram lavadas 3 vezes com PBS, fixadas em 4% Paraformaldeído, novamente lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizadas com Triton 0,5%. Após bloqueio com BSA 1% por 30 min em PBS/Triton 0,5%, as células foram lavadas com PBS por 3 vezes e incubadas por 2 h com anticorpo específico Anti-SMAD4 em diluição de 1:100. Após 3 lavagens com PBS, as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a FITC na diluição de 1:300 por mais 2 h. Após nova lavagem com PBS, as células foram tratadas com 20 μ g/mL RNase por 20min e coradas com 10 μ g/mL iodeto de propídeo (PI) por 2 min. Após nova lavagem com PBS, as lamínulas foram destacadas de seus poços e montadas em lâminas para microscopia. A aquisição das imagens foi realizada em Microscópio Confocal a Laser Nikon Eclipse TE300 (Nikon).

3.15 Ensaios de proliferação celular

3.15.1 Curva de crescimento

As linhagens PC-CMV- \emptyset e -146b foram semeadas na densidade de 5 x 10^4 células/poço em placas de 6 poços. Nos dias 0, +1, +3, +5, +7 e +9, as células foram tripsinizadas e coletadas em tubos de 1,5 mL. Já as linhagens TPC-1 e BCPAP, por ser produto de transfecção transiente, foram semeadas na densidade 5 x 10^4 células/poço em placas de 24 poços. Nos períodos 24, 48 e 72 h, as células foram tripsinizadas e coletadas em tubos de 1,5 mL. Em todos os casos, as células foram fixadas em 3,7% formaldeído e mantidas a 4 °C até o momento da contagem, a qual foi realizada utilizando-se uma câmara de Neubauer.

O MTT é um ensaio colorimétrico quantitativo baseado na clivagem do sal amarelo brometo de difenil tetrazólio (MTT) pela enzima mitocondrial dehidrogenase e a subseqüente formação do cristal azul escuro insolúvel, que se acumula somente no interior das células viáveis. A absorbância detectada em espectrofotômetro é diretamente proporcional ao número de células viáveis. As células foram semeadas em placa de 96 poços na densidade de 1 x 10⁴ células por poço. MTT (Amresco, Solon, OH, EUA) foi adicionado 24 h após a transfecção com antimir-146b, seguido de incubação por 3 h. Após este período, as células foram solubilizadas com uma solução de isopropanol/ HCL 0,4 M e a leitura do sinal foi realizada em espectrofotômetro SpectraMax Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA).

3.16 Análise do ciclo celular

Para análise do ciclo de celular de PC-CMV-Ø e -146b, 5 x 10⁵ células foram semeadas em placas de 6 poços. No dia seguinte, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura sem SFB e sem hormônio TSH para a sincronização das células em fase G0/G1. Após 24 h o meio foi novamente substituído por meio contendo SFB, contendo ou não TSH, e contendo ou não 1 ng/mL TGF-β, dependendo do grupo a ser estudado. Nos períodos 0, 6 e 12 h, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a 500 x g por 10 min. As células foram então ressuspendidas em 1 mL de Tampão (6,1 mM Glicose, 137 mM NaCl, 4,4 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 0,9 mM KH₂PO₄ e 0,5 mM EDTA) seguido de adição de 3 mL de 100% etanol, para a fixação, e incubação por 30 min. Após nova centrifugação a 500 x g por 10 min e lavagem com PBS, as células foram ressuspendidas em 1 mL de PBS contendo 5 mM EDTA, 50 µg/mL PI e 0,3 µg/mL RNaseA, e finalmente incubada por 1 h a temperatura ambiente. As leituras do conteúdo de DNA celular, corado com iodeto de propídeo, foram realizadas em Citômetro de Fluxo Guava EasyCyte Mini (Guava Technologies, CA, USA). Para a correta normalização dos dados, foram captados os dados de fluorescência de 10000 eventos para cada amostra.

3.17 Análise de morte celular

Os índices de morte celular, necorse e apoptose, foram medidos nas linhagens PC-CMV-Ø e -146b. Para tanto, as linhagens foram semeadas em densidade de 5 x 10⁵ células em placas de 6 poços. Após 48 h, 1 ng/mL TGF-β foi adicionado ao meio de cultura aos grupos correspondentes. Após 24 h, o meio de cultura foi coletado para a preservação de células mortas, e as células aderidas foram lavadas 2 vezes em PBS e tripsinizadas. A seguir, foram coletadas em tubos de 1,5 mL, centrifugadas a 500 x g por 10 min e 2-3 x 10⁶ células foram ressuspendidas em 1X Annexin-V Binding Buffer, parte do Kit ApoTarget Annexin-V FITC Apoptosis (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante para a incubação com Annexin-V FITC e iodeto de propídeo. As leituras de morte celular foram realizadas em citômetro de fluxo Guava EasyCyte Mini (Guava Technologies). Foram consideradas células viáveis aquelas com baixa marcação para FITC e PI. Células em apoptose foram consideradas aqueles com alta marcação para FITC e células em necrose aquelas com baixa marcação para FITC e alta marcação para PI. Para a correta normalização dos dados, foram captados os dados de fluorescência de 10000 eventos para cada amostra.

3.18 Análise estatística

Os resultados obtidos nas análises por PCR em Tempo Real, curva de crescimento e MTT foram submetidos à análise estatística, realizada com auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Os valores foram expressos em média ± desvio padrão. Foi utilizado o teste t de Student para análises de apenas duas populações de dados e o teste Two-Way ANOVA para comparações entre três ou mais grupos de dados. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando p<0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Influência da via MAPK sobre a expressão de *miR-146b-5p* em célula folicular normal e tumoral de tiróide

MiR-146b-5p é um dos miRNAs mais expressos em PTCs (Cahill et al., 2006; He et al., 2005a). Dado que alterações genéticas na via MAPK são encontradas em aproximadamente 70% dos PTCs, verificamos a influência da ativação ou inibição da via MAPK sobre a expressão de *miR-146b-5p*. Para tanto, realizamos a análise do perfil de expressão de *miR-146b-5p* em linhagens celulares PTC-3/5 e PC-BRAF, derivadas da linhagem de célula folicular normal PCCL3, que expressam, respectivamente, os oncogenes *RET/PTC3* e *BRAFT1799A* de maneira induzida por doxiciclina (Ricarte-Filho et al., 2009; Wang et al., 2003). A indução do oncogene *RET/PTC3* com doxiciclina por 72 h amentou a expressão de *miR-146b-5p* em 2,5 vezes, enquanto a indução do oncogene *BRAFT1799A* aumentou a expressão de *miR-146b-5p* em 2,5 vezes, enquanto a indução do oncogene *BRAFT1799A* aumentou a expressão de *miR-146b-5p* em 2,5 vezes, enquanto a indução do oncogene *BRAFT1799A* aumentou a expressão de *miR-146b-5p* em 2,5 vezes, enquanto a indução do oncogene *BRAFT1799A* aumentou a expressão de *miR-146b-5p* em 2,5 vezes, enquanto a indução do oncogene *BRAFT1799A* aumentou a expressão de *miR-146b-5p* em 2,5 vezes, enquanto a indução do oncogene *BRAFT1799A* aumentou a expressão de *miR-146b-5p* em 2,5 vezes, enquanto a indução do oncogene *BRAFT1799A* aumentou a expressão de *miR-146b-5p* em 2,5 vezes, enquanto a indução do oncogene *BRAFT1799A* aumentou a expressão de *miR-146b-5p* em 2,5 vezes, enquanto a indução do oncogene *BRAFT1799A* aumentou a expressão de *miR-146b-5p* em 2,5 vezes, enquanto a indução do oncogene *BRAFT1799A* aumentou a expressão de *miR-146b-5p* em 2,5 vezes, enquanto a indução do oncogene *BRAFT1799A* aumentou a expressão de *miR-146b-5p* em cerca de 10 vezes (Figura 12A).

Para verificar se a influência da via MAPK sobre a expressão de *miR-146b-5p* ocorre em modelo tumoral, utilizamos as linhagens TPC-1 e BCPAP, as quais possuem espontaneamente os oncogenes RET/PTC1 e *BRAFT1799A*, respectivamente. Para inibição da via MAPK, utilizamos os compostos PD98059 e U0126, inibidores específicos de MEK1 e MEK1/2, respectivamente. O tratamento das linhagens com os inibidores da via MAPK promoveu diminuição da expressão de *miR-146b-5p* em ambas as linhagens (Figura 12B). Estes dados sugerem a regulação do *miR-146b-5p* pela via MAPK no câncer de tiróide.

Ao realizarmos uma análise computacional da região promotora do gene *MIR146B*, encontramos sequências de sítios de ligação para fatores de transcrição comumente ativados por ERK1/2. Dentre eles estão, por exemplo, AP1, STAT, EGR2, ELK1, c-ETS e C/EBP2 (Cargnello e Roux, 2011; Schafer e Sers, 2011). Uma lista contendo uma amostra representativa dos fatores de transcrição que potencialmente se ligam à região promotora de *miR-146b-5p* está mostrada na tabela 2. Estes sítios de ligação foram identificados até 1000 bp à montante do sítio de início detranscrição de *mir-146b*, distribuindo-se em

três regiões distintas: entre -1000 e -800bp, entre -660 e -200bp e entre -130 e +1bp (Figura 13). Nenhuma ilha de CpG foi encontrada, descartando, assim, a possível regulação da expressão de *MIR146B* por metilação de sua região promotora.



Figura 12 - A regulação da expressão de miR-146b-5p pela via MAPK. (A) As linhagens celulares PTC3-5 e PC-BRAF, que super-expressam respectivamente os oncogenes RET/PTC3 e BRAFT1799A de maneira induzível por doxiclina, foram semeadas em placas de 60 mm na densidade de 5 x 10⁵ células. Doxiciclina (1 µg/mL) foi adicionada ao meio para a indução dos oncogenes. Após 72 h de indução, RNA total foi extraído para a síntese de cDNA dirigida para miR-146b-5p. O gene snoRNA foi utilizado como normalizador da reação. (B) As linhagens celulares TPC-1 e BCPAP, as quais expressam espontaneamente os oncogenes RET/PTC1 e BRAFT1799A, respectivamente, foram semeadas em placas de 60 mm na densidade de 5 x 10⁵ células. Os inibidores PD09859 (20 µM) e U0126 (10 µM) foram adicionados à cultura. Após 72 h RNA total foi extraído para a síntese de cDNA dirigida para miR-146b-5p. O gene RNU6B foi utilizado como normalizador da reação como normalizador da reação como normalizador da reação. Os valores no eixo Y estão mostrados em unidades arbitrárias (u.a.). Barras representam desvio-padrão. Amostra representativa de três experimentos independentes.



Figura 13 - Análise in silico da região promotora do gene *MIR146B*. (A) Visualização da região promotora de *MIR146B*, de acordo com a interface gráfica gerada pelo programa BLAT. O segmento correspondente à sequência do precursor *mir-146b* foi submetido a alinhamento contra a sequência do genoma humano utilizando o programa BLAT (www.genome.ucsc.edu/blat). Foi obtida sequencia de 1 kb à montante da sequencia de *mir-146b* (representada na figura como 'YourSeq'). A seta vermelha sugere probabilidade de ocorrência de elementos regulatórios, segundo análise bioinformática de acetilação da lisina 27 da histona H3 em linhagens celulares (segundo o Encyclopedia of DNA Elements, ENCODE, http://genome.ucsc.edu/ENCODE/). As linhas tracejadas indicam a região escolhida para posterior análise pelo programa Transcription Element Search System (TESS, University of Pennsylvania, http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess). (B) Sítios putativos de ligação para fatores de transcrição na região promotora de *mir-146b* segundo o programa TESS.

Fator de transcrição	Número de sítios preditos	Posição (a partir do nucleotídeo +1)	Relacionado à via MAPK?	Referência
AP1	3	-593, -488, -78	\checkmark	(Morel e Berenbaum, 2004)
AP2	2	-730, -336		2004)
ARP1	1	-565		
ATBP	1	-413		
BSAP	1	-747		
C/EBΡα, β	2	-340, -69	\checkmark	(Cargnello e Roux,
c-Ets1	1	-281	\checkmark	2011) (Cargnello e Roux, 2011)
c-Ets2	3	-964, -185, -108	\checkmark	(Cargnello e Roux, 2011)
c-Jun	1	-100	\checkmark	(Schafer e Sers, 2011)
c-Myb	4	-11, -954, -940, -84	\checkmark	(Cargnello e Roux, 2011)
c-Myc	1	-1	\checkmark	(Cargnello e Roux, 2011)
E2A	1	-271		
EGR2	2	-809, -912	\checkmark	(Schafer e Sers, 2011)
Elf1	2	-217, -839	\checkmark	(Schafer e Sers, 2011)
Elk1	4	-280, -937, -395, -296	\checkmark	(Janknecht et al., 1993)
ER	1	-99		
Erα	5	-788, -913, -810, -907, -804		
GAGA	7	-999, -995, -357, -592, -997, -993, -718		
GATA	6	-661, -617, -419, -434, -472, -556	\checkmark	(Yu et al., 2005)
HOXA5	1	-309		
MyoD	1	-1		
NF1	17	-894, -868, -856, -821, -680, -634, - 629, -619, -602, -447, -442, -347, -340, 285 00 60 7	~	(Zheng et al., 2010)
NF-kap	1	-413	\checkmark	(Cargnello e Roux, 2011)
OctR	1	-381		- /
PU1	6	-217, -839, -858, -338, -937, -364	\checkmark	(Schafer e Sers, 2011)
RARα , β, Υ	2	-565, -99	\checkmark	(Schafer e Sers, 2011)
Sp1	19	-968, -932, -909, -867, -812, -806, - 801, -798, -790, -785, -782, -778, -713, -446, -336, -323, -283, -242, -131	~	(Benasciutti et al., 2004)
SRY	4	-14, -45, -551, -923	\checkmark	(Schafer e Sers, 2011)
STAT	1	-831	\checkmark	(Ihle, 1996)
T3Rα	4	-99, -651, -690, -368		
TTF1	1	-976		
USF1	1	-598		

Tabela 5 - Análise in silico da região promotora de MIR146B.

4.2 Busca por potenciais alvos de miR-146b-5p

Para identificar potenciais alvos de *miR-146b-5p*, utilizamos os programas computacionais disponíveis *online* TargetScan (Lewis et al., 2005) e PICTAR (Krek et al., 2005). Pelo fato dos miRNAs não necessitarem de pareamento perfeito com seus alvos, os algoritmos computacionais geram

listas extensas, muitas vezes atribuindo centenas de alvos preditos (Tabela 6). Dentre os potenciais alvos preditos, encontram-se alvos já validados funcionalmente, como, por exemplo, os genes *IRAK1*, *TRAF6 e MMP16* (Taganov et al., 2006; Xia et al., 2009). Entre os alvos preditos de *miR-146b-5p* ainda não validados funcionalmente destaca-se *SMAD4* (Smad family member 4/ *mothers against DPP homolog 4 (Drosophila)*), um importante membro efetor da via de TGF-β (Figura 14).

Tabela 6 - Amostra representativa de alvos preditos para *miR-146b-5p*, de acordo com os programas TargetScan e Pictar.

Simbolo	Descrição		Banco
ABC	ATP-binding cassette, sub-family C, member 6 isoform 2	Resistência a droga	Pictar
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	Transdução de sinal	TargetScan, Pictar
IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	Transdução de sinal	TargetScan, Pictar
SMAD4	Smad family member 4/ mothers against DPP homolog 4	Transdução de sinal	TargetScan, Pictar
MAP3K8	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase kinase 8	Transdução de sinal	Pictar
MMP16	Matrix metallopeptidase 16 (membrane- inserted)	Remodelamento da matrix extra-celular	TargetScan
ERBB4	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4	Transdução de sinal	TargetScan



TargetScanHuman Prediction of microRNA targets Release 5.1: April 2009

Human | miR-146

130 conserved targets, with a total of **135** conserved sites and **39** poorly conserved sites.Table sorted by total context score[Sort table by aggregate P_{CT}]

Genes with o	only poorly conserved sites are not shown [View top p	redicted targets, i	rresp	ective	of site	consen	
Townsh			Conserved sites				
gene	Gene name	Gene name		8mer	7mer- m8	7mer- 1A	
ZNF826	zinc finger protein 826		1	1	0	0	
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6		2	2	0	0	
IRAK1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1		2	2	0	0	
ZBTB2	zinc finger and BTB domain containing 2		1	1	0	0	
EIF4G2	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2		1	1	0	0	
HNRNPD	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich eler binding protein 1, 37kDa)	ment RNA	1	1	0	0	
SORT1	sortilin 1		1	1	0	0	
KLF7	Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)		1	1	0	0	
SMAD4	SMAD family member 4		1	1	0	0	
ABL2	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog a related gene)	2 (arg, Abelson-	1	1	0	0	
ZNF532	zinc finger protein 532		1	0	1	0	
USP3	ubiquitin specific peptidase 3		1	1	0	0	
FBXW2	F-box and WD repeat domain containing 2		1	1	0	0	
DNAL1	dynein, axonemal, light chain 1		1	1	0	0	
GOSR1	golgi SNAP receptor complex member 1		1	0	0	1	

В

 TargetScanHuman

 Prediction of microRNA targets
 Release 5.1: April 2009

Human SMAD4 3' UTR

↓ · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	+ + + + + + + + + + + + + + + + + + +			
Gene Human SMAD4 NM_0053	59 3' UTR length:6553	LIX	UK .	ΤΧ
Conserved sites f miR-205 miR-146 miR-145 miR-183 miR-1/206	or niRNA fanilies broadly miR-144 miR-130/301 miR-26ab/1297 miR-29 miR-19 miR-22 miR-19	y conserved anong verteb miR-13 I	rates 5 m;R-204/211 M;R-34a/34b-5p/ 1 m;R-34a/34b-5p/ m;R-124/506	34c/34c-5p/449/449abc/699
[Show conserved si [Show poorly conse [View SVG image o [View table of miRN [View human genon [View human genon]	tes for miRNA families conserv rved sites and sites for poorly f miRNA sites] A sites] ne browser (Mar 06)] ne browser (Feb 09)]	ved only among mammals] conserved miRNA families]	Key: Sites with higher pro 8mer 7mer Sites with lower prob 8mer 7mer	bability of preferential conservation -m8 7mer-1A 3' comp* bability of preferential conservation -m8 7mer-1A 3' comp*

С

Conserved

	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match
Position 390-396 of SMAD4 3' UTR hsa-miR-146a	5'UUUUAAAGGCAGAGAAGUUCUCA 3' UUGGGUACCUUAAG <mark>UCAAGAG</mark> U	8mer
Position 390-396 of SMAD4 3' UTR hsa-miR-146b-5p	5'UUUUUAAAGGCAGAGAAGUUCUCA 3' UCGGAUACCUUAAGUCAAGAGU	8mer

Context score and features that contribute to the context score are evaluated as in Grimson et al., 2007. Conserved branch lengths and P_{CT} are evaluated as in Friedman et al., 2008.

D

Rank Click here for detailed 3'utr alignments and location of predicted site	human Refseq Id	PicTar score	annotation	
1	<u>NM 145803</u>	8.52	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6), transcript variant 1, mRNA.	
2	<u>NM 004620</u>	8.52	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6), transcript variant 2, mRNA.	
<u>3</u>	<u>NM 001569</u>	8.42	Homo sapiens interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1), mRNA.	
<u>4</u>	<u>NM 020956</u>	8.33	Homo sapiens periaxin (PRX), mRNA.	
<u>5</u>	<u>NM 130830</u>	5.40	Homo sapiens leucine rich repeat containing 15 (LRRC15), mRNA.	
<u>6</u>	<u>NM 006489</u>	4.72	Homo sapiens neuro-oncological ventral antigen 1 (NOVA1), transcript variant 2, mRNA.	
<u>90</u>	<u>NM 175634</u>	2.36	Homo sapiens core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 1; cyclin D-related (CBFA2T1), transcript variant 2, mRNA.	
<u>91</u>	<u>NM 001005366</u>	2.35	Homo sapiens F-box and leucine-rich repeat protein 10 (FBXL10), transcript variant 2, mRNA.	
<u>92</u>	<u>NM 005359</u>	2.29	2.29 Homo sapiens SMAD, mothers against DPP homolog 4 (Drosophila) (SMAD4), mRNA.	
<u>93</u>	<u>NM 203510</u>	2.29	Homo sapiens transmembrane 6 superfamily member 2 (TM6SF2), transcript variant 2, mRNA.	
<u>94</u>	<u>NM 032590</u>	2.27	Homo sapiens F-box and leucine-rich repeat protein 10 (FBXL10), transcript variant 1, mRNA.	
<u>95</u>	<u>NM 000817</u>	2.26	Homo sapiens glutamate decarboxylase 1 (brain, 67kDa) (GAD1), transcript variant GAD67, mRNA.	
<u>96</u>	<u>NM 004430</u>	2.24	Homo sapiens early growth response 3 (EGR3), mRNA.	
<u>97</u>	<u>NM 144642</u>	2.20	Homo sapiens synaptoporin (SYNPR), mRNA.	



Figura 14 - SMAD4 como um potencial alvo de miR-146b-5p. (A) Identificação de alvos potenciais de miR-146b-5p no programa TargetScan (www.targetscan.org). (B) Visualização da região 3'UTR do gene SMAD4 e do sítio predito de ligação de miR-146b-5p. (C) Visualização do sítio predito de ligação de miR-146b-5p à região 3'UTR de SMAD4. (D) Identificação de alvos potenciais de miR-146b-5p no programa PICTAR (http://pictar.mdc-berlin.de/). (E) Visualização do contexto genômico do gene SMAD4, evidenciando o potencial sítio de ligação de miR-146b-5p à sua 3'UTR (no retângulo vermelho), segundo o programa PICTAR.

4.3 Validação de SMAD4 como alvo de regulação pós-transcricional de miR-146b-5p

Para verificar se *miR-146b-5p* é capaz de interagir com a 3'UTR de SMAD4 e promover sua repressão pós-transcricional, dois vetores para ensaio de gene repórter (Luciferase) foram construídos: pmiRGlo-SMAD4-3'UTR-wt, que contém o potencial sítio de ligação de miR-146b-5p na 3'UTR de SMAD4 à jusante do gene repórter Luciferase; pmiRGIo-SMAD4-3'UTR-Mut, no qual o potencial sítio de ligação de miR-146b-5p na 3'UTR de SMAD4 contém mutações que inviabilizam a ligação entre o miRNA e o transcrito-alvo (Figura 15A). Para minimizar a interferência do mRNA endógeno de SMAD4 utilizamos a linhagem de células de carcinoma anaplásico de tiróide ARO, a qual possui baixos níveis transcricionais de SMAD4 e níveis não detectáveis de sua proteína resultante (Figura 15B). Foram realizadas transfecções de plasmídeo repórter (pmiRGlo-SMAD4-3'UTR-wt ou Mut) com e sem co-transfecção com pcDNA-146b, que expressa *miR-146b-5p* de forma estável. Como controle, foi realizada co-transfecção com anti-miR-146b. Como mostrada na Figura 15C, a expressão de miR-146b-5p reduziu a atividade da luciferase. No entanto, a co-transfecção com anti-miR-146b, assim como a utilização de plasmídeo repórter mutante (pmiRGIo-SMAD4-3'UTR-Mut) ou ainda a expressão de outro miRNA, o miR-21, não produziram alterações nos níveis de luminescência, demonstrando, assim, a efetiva ligação de *miR-146b-5p* no sítio predito e a conseqüente repressão pós-transcricional de SMAD4.



Figura 15 - Validação da ligação de miR-146b-5p à 3'UTR de SMAD4. (A) Sítio predito de ligação de miR-146b-5p à 3'UTR de SMAD4 e plasmídeos usados para o ensaio de gene repórter. O sítio predito de ligação de miR-146b-5p à 3'UTR de SMAD4 foi clonado em plasmídeo pmiR-Glo, gerando o plasmídeo pmiRGlo-SMAD4-3'UTRwt. O plasmídeo pmiRGlo-SMAD4-3'UTR-Mut, que contém mutações na 3'UTR de SMAD4, que inviabilizam a ligação entre miR-146b-5p e SMAD4, foi utilizado como controle. (B) Ensaios de Western blot e qPCR evidenciando baixos níveis gênicos e níveis protéicos indetectáveis de SMAD4. Para ensaio de Western blot, 1 x 10⁶ foram semeadas em placas de 100 mm. Após 72 h o extrato protéico total foi extraído, 40 µg foram por separados em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e utilizados para ensaios de Western blot. A proteína α-Tubulina foi utilizada como normalizador. (C) Os respectivos plasmideos para gene reporter foram transfectados sozinhos (SMAD4-wt, SMAD4-Mut); co-transfectados em combinação com pcDNA3.1-miR146b (SMAD4-wt + miR146b, SMAD4-Mut + miR146b); com anti-miR-146b (SMAD4-wt + miR146b + Anti-146b), ou com pcDNA3.1-miR-21 (SMAD4-wt + miR-21). Amostra representativa de três ensaios independentes. Barras representam desvio-padrão. (***) p<0,001.

4.4 Regulação pós-transcricional de SMAD4 por *miR-146b-5p* em linhagens de células foliculares normal e tumoral de tiróide

Para investigar o papel de *miR-146b-5p* em células foliculares, utilizamos a linhagem de célula folicular normal de rato PCCL3, a qual foi transfectada com plasmídeo pUHG-146b, gerando a linhagem PC-146b. Este plasmídeo contém a região genômica de *miR-146b-5p* sob o controle de um promotor responsivo à doxiciclina. Ensaios de qPCR confirmaram a indução da expressão de *miR-146b-5p* em mais de 80 vezes após 96 h de indução com doxiciclina (Figura 16A). Os níveis transcricionais e protéicos de SMAD4 apresentaram-se reduzidos na linhagem PC-146b após a indução de *miR-146b-5p* (DOX, Figura 16B e C).



Figura 16 - Regulação pós-transcricional de SMAD4 por *miR-146b-5p* na célula folicular.
(A) Confirmação da indução da expressão de *miR-146b-5p* na linhagem PC-146b após indução com doxiciclina. 5 x 10⁵ células foram semeadas em placas de 60 mm e submetidas (DOX) ou não (CTR) ao tratamento com doxiciclina por até 96h. RNA total extraído nos períodos 0, 24, 48, 72 e 96 horas foi utilizado para síntese de cDNA e para a subseqüente quantificação da expressão de *miR-146b-5p*. (B) Regulação dos níveis transcrcionais de *SMAD4* por *miR-146b-5p*. 5 x 10⁵ células foram semeadas em placas de 60 mm e submetidas (DOX)

tratamento com com doxiciclina nas concentrações 0,1 µg/mL e 1 µg/mL por 72 h. RNA total foi extraído e utilizado para a detecção de *miR-146b-5p* e SMAD4. Os valores no eixo Y à esquerda representam a quantificação relativa dos níveis transcricionais de miR-146b. Os valores no eixo Y à direita representam a quantificação relativa dos níveis transcricionais de SMAD4. **(A,B)** Os genes *snoRNA* e *Rpl19* foram utilizados como normalizadores das reações para *miR-146b-5p* e SMAD4, respectivamente. Os valores no eixo Y estão mostrados em unidades arbitrárias (u.a.). **(C)** Regulação dos níveis protéicos de SMAD4 por *miR-146b-5p*. 1 x 10⁶ células foram semeadas em placas de 100 mm e submetidas (DOX) ou não (CTR) ao tratamento com com doxiciclina por 72 h. Para cada amostra, 40µg do extrato protéico total extraído foram por separados em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e utilizados para ensaios de Western blot utilizando anticorpo monoclonal específico para SMAD4. A proteína α-Tubulina foi utilizada como normalizador. Amostra representiva de três experimentos independentes. Barras representam desvio-padrão.

Para avaliar o papel de *miR-146b-5p* no câncer de tiróide, utilizamos o oligonucleotídeo modificado anti-miR-146b para inibir especificamente o miRNA *miR-146b-5p* maduro na linhagem de carcinoma papilífero de tiróide TPC-1, a qual expressa altos níveis de *miR-146b-5p* (Cahill et al., 2006), e possui espontaneamente o rearranjo cromossômico *RET/PTC1*. A inibição específica de *miR-146b-5p* foi confirmada por qPCR (Figura 17A). Ensaios de Western blot mostraram aumento dos níveis protéicos de SMAD4 após a supressão da expressão de *miR-146b-5p* (Figura 17B). Resultados semelhantes foram obtidos utilizando outra linhagem de carcinoma papilífero, BCPAP, a qual expressa espontaneamente a mutação *BRAFT1799A*.



Figura 17 - Regulação pós-transcricional de SMAD4 por miR-146b-5p no câncer de tiróide. (A) Confirmação da inibição da expressão de miR-146b-5p nas linhagens TPC-1 e BCPAP. 5 x 10⁵ células foram semeadas em placas de 60 mm e transfectadas com oligonucleotídeo inibidor de miR-146b-5p (Anti-146b) em duas diferentes concentrações: 10 nM e 25 nM. As linhagens TPC-1 e BCPAP submetida apenas à transfecção com o reagente de transfecção (Mock) foram utilizadas como referência. O miRNA miR-1 foi utilizado como controle negativo do silenciamento de miR-146b-5p. RNA total foi extraído após 72 h de transfecção transiente foi utilizado para síntese de cDNA e para a subseqüente quantificação da expressão de miR-146b. A expressão de RNU6B foi utilizada para normalizar a reação. Os valores no eixo Y estão mostrados em unidades arbitrárias (u.a.). (*) p<0,05; (**) p<0,01. (B) Regulação dos níveis transcricionais de SMAD4 por miR-146b-5p. 5 x 10⁵ células foram semeadas em placas de 60 mm e transfectadas com oligonucleotídeo inibidor de miR-146b-5p (Anti-146b) nas concentrações 10 nM e 25 nM por 72 h para a subseqüente extração de RNA. Os valores no eixo Y à esquerda representam a quantificação relativa dos níveis transcricionais de miR-146b-5p. Os valores no eixo Y à direita representam a quantificação relativa dos níveis transcricionais de SMAD4. Os genes RNU6B e RPL19 foram utilizados como normalizadores das reações para miR-146b-5p e SMAD4, respectivamente. (C) Regulação dos níveis protéicos de SMAD4 por miR-146b-5p. 1 x 10⁶ células foram semeadas em placas de 100 mm e submetidas (Anti-146b) ou não (Mock) à transfecção com anti-miR-146b por 72 h. Para cada amostra, 40 µg do extrato protéico total extraído foram por separados em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e utilizados para ensaios de Western blot. A proteína α-Tubulina foi utilizada como normalizador. Amostra representativa de três experimentos diferentes. Barras representam desvio-padrão.

4.5 Modulação da via de sinalização de TGF-β por miR-146b-5p

Para verificar qual a influência de *miR-146b-5p* sobre a via de TGF-β, a expressão de miR-146b-5p foi induzida com doxiciclina na linhagem PC-146b e o nível da expressão gênica de Myc, um alvo conhecido de repressão transcricional da via de TGF-β, foi quantificado. A indução da expressão de miR-146b-5p resultou em aumento dos níveis transcricionais de Myc. Interessantemente, a indução da expressão de miR-146b-5p também aumentou a expressão gênica de TGF-\beta1 (Figura 18A). Para verificar a influência de miR-146b-5p na transdução do sinal de TGF-β, induzimos a expressão de miR-146b-5p na linhagem PC-146b com doxiciclina e subseqüentemente adicionamos TGF-β1 recombinante (rTGF-β1) à cultura. Dado que os níveis transcricionais de SMAD4 são modulados pela via de TGFβ (D'Inzeo et al., 2010; Matsuo et al., 2006) utilizamos a expressão gênica de SMAD4 como repórter para o status funcional da via de TGF-β (Figura 18B). A indução de miR-146b-5p reduziu a ativação da expressão de Smad4 pelo tratamento com rTGF-β1, em relação ao grupo tratado com rTGF-β sem indução de miR-146b-5p. Na linhagem tumoral TPC-1, a inibição de miR-146b-5p aumentou a expressão gênica do inibidor de kinase dependente de ciclina 1A, CDKN1A, gene-alvo ativado transcricionalmente pela via de TGF- β (Figura 19A). A supressão de miR-146b-5p também diminuiu os níveis gênicos de TGF-β1. O tratamento da linhagem celular TPC-1 com rTGF-β1 não modula os níveis transcricionais de SMAD4. No entanto, a supressão de miR-146b, combinada à estimulação com rTGF-\u00b31, aumentou os níveis transcricionais de SMAD4 (Figura 19B).



Figura 18 - Modulação de genes-alvo da via de TGF-β por miR-146b-5p na célula folicular. (A) Influência de *miR-146b-5p* na expressão de genes-alvo da via de TGF- β . 5 x 10⁵ células foram semeadas em placas de 60 mm e submetidas (DOX) ou não (CTR) ao tratamento com doxiciclina por 72 h. RNA total extraído foi utilizado para síntese de cDNA para a subseqüente quantificação da expressão gênica de c-Myc e TGF-β1. Os valores no eixo Y estão mostrados em unidades arbitrárias (u.a.). (B) Influência de *miR-146b-5p* na transdução do sinal de TGF- β . 5 x 10⁵ células foram semeadas em placas de 60 mm e submetidas (DOX) ou não (CTR) ao tratamento com doxiciclina. Após 72 h de indução de miR-146b-5p com doxiciclina, TGF- β 1 recombinante (rTGF- β 1, 10 ng/mL) foi adicionado ao meio de cultura. RNA total foi extraído 24 h depois para a subseqüente quantificação da expressão gênica de SMAD4. (A,B) O gene Rpl19 foi utilizado como normalizador da reação. Os valores no eixo Y estão mostrados em unidades arbitrárias (u.a.). Barras de desvio-padrão. Dados representivos representam três experimentos independentes. (*) *p* < 0,05. (**) *p* < 0,01, (***) *p*<0,001.



Figura 19 - Modulação de genes-alvo da via de TGF-β por *miR-146b-5p* no câncer de tiróide. (A) Influência de *miR-146b-5p* na expressão de genes-alvo da via de TGF-β. 5 x 10⁵ células foram semeadas em placas de 60 mm e transfectadas (Anti-146b) ou não (Mock) com anti-miR-146b por 72 h. RNA total extraído foi utilizado para síntese de cDNA para a subseqüente quantificação da expressão gênica de *TGF-β1* e *CDKN1A/p21*. Os valores no eixo Y estão mostrados em unidades arbitrárias (u.a.). (B) Influência de *miR-146b-5p* na transdução do sinal de TGF-β. 5 x 10⁵ células foram semeadas em placas de 60 mm e transfectadas (Anti-146b) ou não (Mock) com anti-miR-146b por 72 h. Após 72 h da transfecção, TGF-β1 recombinante (rTGF-β1, 10 ng/mL) foi adicionado ao meio de cultura. RNA total foi extraído 24 h para a subseqüente quantificação da expressão gênica de *SMAD4*. (A,B) O gene *Rp119* foi utilizado como normalizador da reação. Os valores no eixo Y estão mostrados em unidades arbitrárias (u.a.). Barras representam desvio-padrão. Dados representivos de três experimentos independentes. (*) *p* < 0,05.</p>

Na ausência do sinal de TGF-β, SMAD4 encontra-se distribuído entre o citoplasma e o núcleo, participando de translocação dinâmica entre os dois compartimentos celulares (Hill, 2009). Para avaliar o potencial da inibição de miR-146b-5p na restauração da transdução do sinal de TGF-β, realizamos a detecção da localização subcelular de SMAD4 em células TPC-1 por imunofluorescência em microscopia confocal a laser. Células TPC-1 foram transfectadas ou não com anti-miR-146b, e subsequentemente tratadas ou não com TGF-\u00df1 recombinante. Após o tratamento com rTGF-\u00bf1, houve pequeno acúmulo de SMAD4 nuclear (Figura 20). A supressão de miR-146b-5p, restaura a translocação de SMAD4 em resposta ao estímulo de TGF-β, promovendo acúmulo maciço desta proteína no núcleo. Analisando os níveis protéicos de SMAD4 em ensaio de Western blot utilizando extratos protéicos das frações nuclear e citoplasmática, obtidos dos mesmos grupos, observamos maior acúmulo nuclear de SMAD4 após transfecção de anti-miR-146b e tratamento com rTGF-\u00df1 (Figura 21A). O ensaio de gene repórter utilizando o plasmídeo p3TP-Lux, o qual permite a quantificação da atividade da via de TGF-β, revelou aumento da atividade desta via após a transfecção com anti-miR-146b (Figura 21B). Além disso, em ensaio de viabilidade celular (MTT) células TPC-1 transfectadas com anti-miR-146b e submetidas ao tratamento com rTGFß1 apresentaram maior resposta ao sinal de TGF-β, reduzindo a viabilidade celular 24 h após o tratamento (Figura 21C).



Figura 20 - Modulação da transdução do sinal de TGF-β por miR-146b-5p no câncer de tiróide. 1 x 10⁴ células foram semeadas sobre lamínulas em placas de 6 poços e transfectadas (Anti-146b) ou não (Mock) com inibidor Anti-miR-146b. As células foram tratadas ou não com rTGF-β1 por 1 h e incubadas com anticorpo específico anti-SMAD4 por 2 h, seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado a FITC (em verde). As células foram incubadas com iodeto de propídeo (PI) para visualização dos núcleos (em vermelho). A sobreposição das imagens revela a translocação de SMAD4 para o núcleo (em amarelo). Imagem representativa de três experimentos independentes.


В



С

Figura 21 - Modulação da transdução do sinal de TGF-β por miR-146b-5p no câncer de tiróide. (A) Acúmulo nuclear de SMAD4 em células TPC-1. 1 x 10⁶ células foram semeadas em placas de 100 mm e submetidas (Anti-146b) ou não (Mock) à transfecção com anti-miR-146b por 72 h. Para cada amostra, 15 µg do extrato protéico fracionado extraído foram por separados em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e utilizados para ensaios de Western blot. As proteínas α-TUBULINA e LAMINA-A foram utilizadas como controle para a separação entre as frações. Figura representativa de três ensaios independentes. (B) Restauração da resposta ao sinal de TGF- β em células TPC-1. A linhagem TPC-1 foi semeada em placas de 12 poços na densidade de 5 x 10⁴ células por poço. As células foram transfectadas com plasmídeo reporter p3TP-Lux, na presença (Anti-146b) ou ausência (Mock) de Anti-miR-146b. Cinco horas após a transfecção os grupos rTGF-β1 e Anti-146b + rTGF-β1 foram submetidos ao tratamento com TGF-β-1 recombinante (1 ng/mL) por 48 h. Amostra representativa de três ensaios independentes. (C) Restauração da resposta ao sinal antiproliferativo de TGF-β em células TPC-1. 1 x 10⁴ células foram semeadas em placas de 96 poços e submetidas (Anti-146b) ou não (Mock) à transfecção com anti-miR-146b. Cinco horas após a transfecção os grupos rTGF-B1 e Anti-146b + rTGF-B1 foram submetidos ao tratamento com TGF-β-1 recombinante (1 ng/mL). Após 24 h as células foram submetidas ao ensaio de MTT. Barras representam desvio-padrão. Amostra representativa de três ensaios independentes, realizados em quintuplicatas. (*) p<0,05. (**) p<0,01. (***) p<0,001.

А

4.6 Influência de *miR-146-5p* na expressão dos marcadores da diferenciação tiroideana

Em cultura a linhagem PCCL3 mantém a expressão de marcadores moleculares clássicos da diferenciação tiroideana, como o simporter de iodo/sódio (Nis), Tiroglobulina (Tg), Tiroperoxidase (Tpo) e o receptor de hormônio tireotrófico (TSHr). A indução de *miR-146b-5p* na linhagem PC-146b provocou aumento dos níveis trancricionais de Nis, Tg, Tpo e TshR em comparação à linhagem não tratada (Figura 22A). Por outro lado, a inibição de miR-146b-5p linhagem TPC-1 na provocou diminuição dos níveis transcricionais de Tg (Figura 22B). Níveis transcricionais dos outros marcadores de diferenciação tiroideana NIS, TPO, e TSHR não foram detectados nas células TPC-1 transfectadas ou não com anti-miR-146b. Não foram detectadas alterações nos níveis protéicos de NIS após a indução de miR-146b-5p na linhagem PC-146b (Figura 22C). Além disso, a proteína NIS não foi detectada na linhagem BCPAP antes ou depois da transfeçção com anti-miR-146b.



Figura 22 - Influência de miR-146b-5p sobre os marcadores clássicos da diferenciação da célula folicular tiroideana. (A) Influência de miR-146b-5p sobre os níveis transcricionais de Nis, Tg, Tpo e Tshr em linhagem PC-146b. 5 x 10⁵ células foram semeadas em placas de 60 mm e submetidas (DOX) ou não (CTR) ao tratamento

com doxiciclina por 72 h. RNA total extraído foi utilizado para síntese de cDNA para a subseqüente quantificação da expressão gênica de Nis, Tg, Tpo e Tshr. Os valores no eixo Y estão mostrados em unidades arbitrárias (u.a.). O gene Rpl19 foi utilizado como normalizador da reação. (B) Influência de miR-146b-5p sobre a expressão gênica de TG em linhagem TPC-1. 5 x 10⁵ células foram semeadas em placas de 60 mm e transfectadas (Anti-146b) ou não (Mock) com anti-miR-146b. RNA total extraído 72 h depois foi utilizado para síntese de cDNA, para a subseqüente quantificação da expressão gênica de TG. Os valores no eixo Y estão mostrados em unidades arbitrárias (u.a.). O gene RPL19 foi utilizado como normalizador da reação. (*) p<0,05; (**) p<0,01. (C) Influência de miR-146b-5p sobre os níveis protéicos de Nis. As linhagens PC-146b e BCPAP foram semeadas em placas de 100 mm na densidade de 1 x 10⁶ células por placa. Células PC-146b foram submetidas (DOX) ou não (CTR) ao tratamento com doxiciclina para indução de miR-146b-5p, e células BCPAP foram submetidas (Anti-146b) ou não (Mock) à transfecção com anti-miR-146b por 72 h. Para cada amostra, 40 µg do extrato protéico total extraído foram por separados em PAGE e utilizados para ensaios de Western blot. A proteína α-Tubulina foi utilizada como normalizador. Amostra representativa de três experimentos independentes. As barras representam desvio-padrão.

4.7 MiR-146b-5p e sua influência na proliferação e morte celular

Para avaliar a influência de miR-146b-5p sobre o potencial replicativo da linhagem folicular PCCL3, desenvolvemos um sistema de super-expressão estável de *miR-146b-5p*. O plasmídeo pcDNA3.1 contendo a região genômica de *miR-146b-5p* clonado sob o controle de um promotor de citomegalovirus (CMV), foi transfectado em células PCCL3. A análise por qPCR confirmou o aumento de expressão de miR-146b-5p nas três transfecções realizadas. A linhagem PC-CMV-146b-2, com expressão de *miR-146b-5p* aproximadamente 150 vezes superior quando comparada à PCCL3 transfectada com plasmídeo vazio (PC-CMV-Ø), foi selecionada para os experimentos subsequentes (Figura 23A) e denominada PC-CMV-146b. As células PC-CMV-Ø e -146b foram sincronizadas em G_0/G_1 através do carenciamento de soro fetal bovino (SFB) e hormônio TSH por 24 h. Após 6 h da reintrodução de TSH e SFB, a linhagem PC-CMV-146b apresentava maior número de células em G₂/M, quando comparado à linhagem PC-CMV-Ø, que se manteve após 12 h. A linhagem PC-CMV-Ø apresentava em 6 h 83% de células em G₀/G₁, 3% em S e 14% em G_2/M . Em 12 h, a mesma linhagem apresentava 84% de células em G_0/G_1 , 2% em S e 14% em G₂/M. A linhagem PC-CMV-146b apresentava em 6 h 76% de células em G_0/G_1 , 4% em S e 20% em G_2/M e, após um intervalo de 12 h apresentava 80% de células em G₀/G₁, 3% em S e 17% em G₂/M. Ensaios de Western blot foram realizados utilizando extratos protéicos totais das linhagens

PC-CMV-Ø e -146b sincronizadas em G_0/G_1 por 24 h e re-estimuladas por até 12 h. A linhagem PC-CMV-146b apresentou maiores níveis expressão de ciclina D1, proteína-chave na progressão do ciclo clelular, em relação à linhagem PC-CMV-Ø (Figura 23C), corroborando os dados obtidos pela citometria de fluxo.



Figura 23 - MiR-146b-5p e sua influência sobre o ciclo celular. (A) Super-expressão estável de miR-146b-5p. 5 x 10⁵ células foram semeadas em placas de 60 mm por 48 h e RNA total extraído foi utilizado para síntese de cDNA. A transfecção foi realizada em triplicata (1, 2 e 3). A quantificação da expressão de miR-146b-5p foi realizada

por PCR em tempo real. A linhagem PCCL3 transfectada com vetor pcDNA3.1 vazio (Ø) foi utilizada como referência. O gene Rpl19 foi usado como normalizador da reação de qPCR. Barras representam desvio-padrão. (B) 5 x 10⁵ células foram semeadas em placas de 6 poços e um dia após o plaqueamento foram deprivadas de SFB e hormônio TSH. Após 24 h o meio de cultura foi substituído por novo meio contendo SFB e TSH. Nos tempos 0, 6 e 12h as células foram coletadas por tripsinização, lavadas em PBS e fixadas em etanol 75%. As células foram tratadas com Rnase e coradas com iodeto de propídeo. A leitura do conteúdo de DNA para a análise do ciclo celular foi realizada em Citômetro de Fluxo Guava EasyCyte Mini (Guava Technologies). (C) As linhagens PC-CMV-146b e Ø foram semeadas em placas de 100 mm na densidade de 1 x 10⁶ células por placa e um dia após o plaqueamento foram deprivadas de soro fetal bovino e hormônio TSH. Após 24 h o meio de cultura foi substituído por novo meio contendo SFB e TSH. O extrato protéico total foi coletado nos tempos 0, 3, 6 e 12 h. Para cada amostra, 40 µg do extrato protéico total extraído foram por separados em PAGE e utilizados para ensaios de Western blot. A proteína α-Tubulina foi utilizada como normalizador. Amostra representativa de dois experimentos independentes.

Para avaliar a influência de *miR-146b-5p* no ciclo celular na ausência de TSH, o principal fator de crescimento para a célula folicular, as células PC-CMV-Ø e -146b foram submetidas à deprivação do hormônio por 72 h. A linhagem PC-CMV-Ø cultivada na ausência de TSH apresentou parada no ciclo celular, com menor número de células na fase G₂/M do ciclo celular (Figura 24). A super-expressão de *miR-146b-5p* na linhagem PC-CMV-146b restaurou o ciclo celular, mesmo na ausência de TSH, a níveis semelhantes à cultura na presença de TSH.

Para observar a influência de *miR-146b-5p* no controle do ciclo celular pela via de TGF- β , as linhagens PC-CMV- \emptyset e -146b células foram submetidas à sincronização pelo carenciamento de SFB e TSH. Após 24 h SFB e TSH foram adicionados ao meio de cultura e as células foram submetidas ou não ao tratamento com rTGF- β 1. Após 12 h, as células PC-CMV- \emptyset tratadas com rTGF- β 1 responderam ao sinal inibitório de proliferação de TGF- β e não apresentaram alterações significativas em seu ciclo celular (Figura 25A-B). Diferentemente, a linhagem PC-CMV-146b apresentou resistência ao sinal antiproliferativo de TGF- β , mostrando a progressão da fase G₀/G₁ para as fases S e G₂/M após 12 h. Ensaios de Western blot revelaram que a linhagem PC-CMV- \emptyset apresenta menores níveis de ciclina D1 após 24 h de tratamento com rTGF- β 1(Figura 25C). A linhagem PC-CMV-146b, no entanto, mantém os níveis de ciclina D1 mesmo sob estimulação com rTGF- β 1.



Figura 24 - MiR-146b-5p e progressão do ciclo celular na ausência de estimulação hormonal. Células PC-CMV-Ø e -146b foram semeada em placas de 6 poços na densidade de 5 x 10⁵ células por poço e um dia após o plaqueamento foram deprivadas de soro fetal bovino e hormônio TSH. Após 24 h o meio de cultura foi substituído por novo meio contendo soro fetal bovino com TSH (TSH(+)) e sem TSH (TSH(-)). As células foram coletadas por tripsinização 72 h depois, lavadas em PBS, fixadas em etanol 75%, tratadas com Rnase e coradas com iodeto de propídeo. A leitura do conteúdo de DNA para a análise do ciclo celular foi realizada em Citômetro de Fluxo Guava EasyCyte Mini (Guava Technologies). Amostra representativa de três experimentos independentes.





Figura 25 - MiR-146b-5p e a progressão do ciclo celular sob o estímulo anti-proliferativo de TGF-β. (A) Células PC-CMV-Ø e -146b foram semeada em placas de 6 poços na densidade de 5 x 10⁵ células por poço e um dia após o plaqueamento foram deprivadas de SFB e hormônio TSH. Após 24 h o meio de cultura foi substituído por novo meio contendo SFB, TSH e TGF- β (1 ng/mL). Após 12 h as células foram coletadas por tripsinização, lavadas em PBS, fixadas em etanol 75%, tratadas com Rnase e coradas com PI. A leitura do conteúdo de DNA para a análise do ciclo celular foi realizada em Citômetro de Fluxo Guava EasyCyte Mini (Guava Technologies). (B) Representação gráfica dos dados mostrados em (A). Os valores correspondentes às fases S e G₂M foram agrupados. (Ø) PC-CMV-Ø, (Ø + rTGF-β1) PC-CMV-Ø + rTGF-β, (miR-146b) PC-CMV-146b, (miR-146b + rTGF-β1) PC-CMV-146b + rTGF- β 1. As barras representam desvio-padrão. (C) As linhagens PC-CMV-146b e Ø foram semeadas em placas de 100 mm na densidade de 1 x 10⁶ células por placa e um dia após o plaqueamento foram deprivadas de SFB e hormônio TSH. Após 24 h o meio de cultura foi substituído por novo meio contendo SFB, TSH contendo ou não TGF-β (1 ng/mL). Após 24 h o extrato protéico total foi coletado. Para cada amostra, 40 µg do extrato protéico total extraído foram separados em PAGE e utilizados para ensaios de Western blot. A proteína α-Tubulina foi utilizada como normalizador. (A-C) Amostra representativa de três experimentos independentes.

Para avaliar o papel da morte celular no número de células que superexpressam *miR-146b-5p*, o número de células em apoptose e necrose foi quantificado utilizando citometria de fluxo. Não houve diferenças significativas nos índices de apotose e necrose de células PC-CMV-146b em relação às células PC-CMV-Ø, mesmo sob estimulação com TGF- β (Figura 26A). Da mesma forma, não houve diferença nos índices de apoptose e necrose após o tratamento com rTGF- β 1 e a supressão de *miR-146b-5p* na linhagem TPC-1 (Figura 26B).



Figura 26 - MiR-146b-5p e sua influência sobre a morte celular. (A) As linhagens PC-CMV-Ø e -146b foram semeadas em placas de 6 poços na densidade de 5 x 10⁵ células por poço e um dia após o plaqueamento foram deprivadas de SFB e hormônio TSH. (B) A linhagem TPC-1 foi semeada em placas de 6 poços na densidade de 5 x 10⁵ células por poço e um dia após o plaqueamento foram transfectadas (Anti-146b) ou não (Mock) com anti-miR-146b. (A-B) Após 24 h o meio de cultura foi substituído por novo meio contendo SFB e TSH. As células foram submetidas ou não ao tratamento com rTGF-β1 e coletadas 48 h depois por tripsinização, lavadas em PBS, ressuspendidas em Tampão Annexin-V-FITC e o número de células em apoptose e necrose foram medidos de acordo com as instruções do fabricante. A leitura da fluorescência total de FITC e iodeto de propídeo para análise de morte celular foi realizada em Citômetro de Fluxo Guava EasyCyte Mini (Guava Technologies).O gráfico apresenta os valores da intensidade de fluorescência de PI no eixo Y e de FITC no eixo X. A porcentagem de células em apoptose está mostrada nos quadrantes superior e inferior direitos. Amostra representativa de dois experimentos independentes.

Em ensaio de curva de crescimento, a linhagem PC-CMV-146b apresentou maior taxa de proliferação (P<0,05), quando comparada à linhagem PC-CMV-Ø (Figura 27A). Além disso, *miR-146b-5p* promove a proliferação celular de forma independente de estimulação hormonal com TSH. Na linhagem tumoral TPC-1, a supressão de *miR-146b-5p* promoveu uma diminuição da proliferação celular a partir de 48 h após a transfecção, em comparação com o grupo não transfectado (Figura 27B). A inibição de *miR-146b-5p* na linhagem tumoral BCPAP apresentou resultados semelhantes, com diminuição da taxa de proliferação após 48 h de supressão de *miR-146b-5p* (Figura 27C).



Figura 27 - MiR-146b-5p e sua influência sobre a proliferação celular. (A) As linhagens PC-CMV-Ø e -146b foram semeadas em placas de 6 poços, na densidade de 5 x 10⁴ células por poço. As linhagens foram cultivadas por até 9 dias, na presença ou ausência de TSH (sem TSH). Nos dias +1, +3, +5 +7 e +9, as células foram tripsinizadas, fixadas e contadas com auxílio de hemacitômetro modificado (Neubauer). PC-CMV-146b versus PC-CMV-Ø (*) *p*<0,05; PC-CMV-146b (sem TSH) versus PC-CMV-Ø (sem TSH) (**) *p*<0,01. As linhagens TPC-1 (B) e BCPAP (C) foram semeadas em placas de 12 poços, na densidade de 1 x 10⁴ células por poço. As linhagens foram submetidas (Anti-146b) ou não (Mock) à transfecção com antimiR-146b. Nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas, as células foram tripsinizadas, fixadas e contadas com auxílio de hemacitômetro modificado (Neubauer). Amostras representativas de dois experimentos independentes. (*) p<0,05; (**) p<0,01.</p>

5 DISCUSSÃO

O aumento da expressão da isoforma *miR-146b-5p* é freqüentemente descrito no carcinoma papilífero humano (Pallante et al., 2010). No entanto, o papel de *miR-146b-5p* no carcinoma papilífero ainda não foi estabelecido. Neste trabalho investigamos a influência da via MAPK na expressão de *miR-146b-5p* e o papel deste miRNA na regulação da via de TGF- β e sua contribuição na transformação maligna da tiróide. Para tanto, observamos a expressão de *miR-146b-5p* em sistema de expressão dos oncogenes tiroideanos *RET/PTC* e *BRAFT1799A* na linhagem de célula folicular normal de tiróide de rato PCCL3 e de inibição da via MAPK nas linhagens de carcinoma papilífero de tiróide, TPC-1 e BCPAP. Além disto, realizamos a análise funcional da modulação da via de TGF- β por *miR-146b-5p* utilizando sistema de expressão condicionada de *miR-146b-5p* miRNA na linhagem PCCL3 e a inibição deste miRNA nas linhagens de PTC TPC-1 e BCPAP.

A isoforma miR-146b é regulada por NFkB em resposta imune inata e adquirida (Taganov et al., 2006). No câncer de tiróide, a ativação da via MAPK pelo oncogene BRAFT1799A ativa a via de NFkB, aumentando os níveis transcricionais de miR-146a, promovendo, assim, maior crescimento tumoral, invasividade e resistência a quimioterapia (Pacifico et al., 2010; Palona et al., 2006). No entanto, a via MAPK parece ter maior influência na regulação da isoforma miR-146b-5p do que na isoforma miR-146a (Perry et al., 2009). De fato, a ativação desta via por meio de dois eventos oncogênicos diferentes, RET/PTC3 e BRAFT1799A, frequentemente observados em aproximadamente 70% dos PTCs (Adeniran et al., 2006), levou à super-expressão de miR-146b-5p em células PCCL3. Por outro lado, a inibição da via MAPK nas linhagens TPC-1 e BCPAP levou à diminuição dos níveis de miR-146b-5p, indicando a necessidade da ativação desta via no câncer para a sustentação da expressão aumentada de miR-146b-5p. A análise da região promotora de miR-146b-5p revelou a presença de potenciais sítios de ligação para diversos fatores de transcrição regulados pela via MAPK. Entre eles estão, além do já mencionado NFkB, fatores como AP1, c-ETS, STAT, ELK1, c-Jun, c-fos e c/EBP, sugerindo uma possível regulação direta e indireta da expressão de *miR-146b-5p* pela via MAPK em células foliculares tiroideanas.

O controle da proliferação da célula folicular tiroideana é realizado principalmente pelo TSH, por intermédio de seu receptor, TSHR, envolvendo a sinalização de cAMP e a subseqüente ativação da via de PKA (Garcia-Jimenez e Santisteban, 2007). A super-expressão de miR-146b-5p promoveu maior proliferação da célula folicular tiroideana normal, inclusive na ausência de estimulação com TSH. Além disso, a super-expressão de miR-146b-5p na linhagem PC-CMV-146b promoveu ainda o escape do sinal inibitório de TGF-β. A regulação de membros da via de TGF-ß por miRNAs foi descrita recentemente (revisto em Heldin et al., 2009). No câncer de tiróide, Braun et al. (2010) descreveram recentemente o papel dos miRNAs miR-200 e miR-30 na regulação de SMAD2 e TBRI no ATC, promovendo transição epitéliomesênquima (EMT) e aumentando seu potencial invasivo. No PTC a regulação desta via por miRNAs permanece pouco esclarecida. Assim, a ativação da via MAPK no PTC pode conferir maior potencial replicativo do tumor não apenas aumentando as taxas de proliferação celular, mas também inativando indiretamente o sinal anti-proliferativo de TGF-ß por intermédio da superexpressão de miR-146b-5p.

A via de TGF- β inibe a proliferação em células epiteliais por meio da parada no ciclo celular mediada principalmente pela regulação negative do proto-oncogene *Myc*, e positiva de *CDKN1A* (Pei e Xiong, 2005; Siegel e Massague, 2003). O potencial proliferativo de células tumorais depende de sua habilidade de evasão à parada no ciclo celular mediada pelo sinal de TGF- β . A super-expressão de *miR-146b-5p* nas células PC-146b promoveu aumento de *c-Myc*, enquanto que a inibição de *miR-146b-5p* nas células TPC-1 induziu o aumento de *CDKN1A*. Além disso, a super-expressão de *miR-146b-5p* nas células PC-CMV-146b reverteu a parada no ciclo cellular mediada por TGF- β , indicando a interrupção de seu sinal anti-proliferativo.

A sinalização de TGF- β pode controlar o potencial replicativo de uma população celular não só agindo sobre o controle do ciclo celular, mas também por intermédio da indução de morte celular programada (revisto em Padua e Massague, 2009). TGF- β pode induzir apoptose de maneira dependente ou independente de proteínas SMADs. A transcrição de genes pró-apoptóticos, como *TIEG1* (*TGF-* β -*inducible early-response gene*), DAPK (*Death associated protein kinase*) e *SHIP* (*SH2-domaincontaining inositol-5-phosphatase*), é ativada pela cascata de SMADs, promovendo maior sensibilização à morte celular por apoptose (Siegel e Massague, 2003). Nossos dados mostram que tanto a super-expressão de *miR-146b-5p* em linhagem PC-CMV-146b, quanto a inibição de *miR-146b-5p* na linhagem TPC-1 não promoveu alterações significativas na morte celular mediada por TGF-β. Portanto, o papel oncogênico de *miR-146b-5p* no câncer de tiróide parece ser preferencialmente sobre a regulação do ciclo celular do que sobre a apoptose.

A função e diferenciação tiroideana são controladas pela via de TGF-β através da regulação negativa dos genes que codificam NIS, TSHR, TPO e TG (Franzen et al., 1999; Kawaguchi et al., 1997; Morris et al., 1988; Nicolussi et al., 2003; Taton et al., 1993). Este controle é realizado pela via de TGF-β através da inibição transcricional dos genes que codificam os fatores de transcrição PAX-8 e TITF-1 de forma dependente de SMADs (Costamagna et al., 2004; Nicolussi et al., 2003). Os genes TG e TPO possuem sítios de ligação para TITF-1 e PAX-8 em suas regiões promotoras proximais e enhancers, enquanto NIS e TSHR possuem enhancers que contêm sítios de ligação para TITF-1. A expressão dos genes NIS, TPO, TG e TSHR foi aumentada em resposta à super-expressão de *miR-146b-5p* nas células PC-146b. No entanto, não houve alterações detectáveis nos níveis protéicos de NIS, provavelmente devido à meia-vida desta proteína, estimada em 5 dias (Paire et al., 1997). Conforme experado, a supressão de miR-146b-5p na linhagem TPC-1 levou à diminuição de TG, enquanto os níveis de NIS, TPO e TSHR permaneceram indetectáveis. Interessantemente, a indução da mutação BRAFT1799A na linhagem PCCL3 reprime também N/S de forma dependente de TGF-β (Riesco-Eizaguirre et al., 2009), sugerindo que a via de TGF- β pode ter papel ambíguo na regulação da diferenciação tiroideana.

Mutações germinativas no gene que codifica *SMAD4* estão associadas com Polipose Juvenil Familial (Howe et al., 1998). Alterações genéticas neste gene também foram descritas em carcinomas pancreáticos e gastro-intestinais (Yang e Yang, 2010). Em carcinomas tiroideanos, mutações pontuais, em associação com *splicing* alternativo, levam ao decréscimo da expressão de SMAD4 (Lazzereschi et al., 2005). Apesar da perda de SMAD4 não parecer ser um passo crítico para a tumorigênese, tumores que possuem outras alterações genéticas desenvolvem um fenótipo mais agressivo na sua ausência. Em modelo de linhagem celular de leucemia promielocítica aguda, a isoforma *miR-146a* regula pós-transcricionalmente SMAD4 (Zhong et al., 2010). No entanto, em PTCs, a isoforma *miR-146b-5p* encontra-se predominantemente desregulada sobre a isoforma *miR-146a*. Nossos dados mostram que a inibição de *miR-146b-5p* nas linhagens TPC-1 e BCPAP levou ao aumento dos níveis de SMAD4, seguido de diminuição da proliferação e viabilidade celular, indicando a restauração da responsividade ao sinal anti-proliferativo de TGF- β . Recentemente, D'Inzeo et al. (2010) descreveram a interrupção da via de TGF- β pela ablação de SMAD4 nas linhagens TPC-1 e BCPAP. A restauração da expressão de SMAD4 aumentou a responsividade da via de TGF- β , diminuindo a migração e proliferação celular. Neste contexto, a expressão aumentada de *miR-146b-5p* poderia ser um fator importante na progressão do câncer de tiróide, anulando o sinal de TGF- β pela supressão dos níveis de SMAD4.

Recentemente, mostramos que a expressão de SMAD4 pode ser observada em tumores de tiróide, sugerindo que outros fatores podem estar envolvidos na tumorigênese da tiróide. Por exemplo, a expressão aumentada da SMAD inibitória (SMAD7) em linhagens celulares e amostras teciduais de cancer de tiróide (Cerutti et al., 2003; Matsuo et al., 2010), sugere que a regulação da via de TGF- β por SMAD7 e outras proteínas regulatórias pode contribuir para a interrupção do sinal de TGF- β . Além disso, sabe-se que o cross-talk entre a via de TGF- β e outras vias de sinalização importantes para a progressão tumoral pode contribuir para a interrupção do sinal de TGF- β (Ellenrieder, 2008) e que a transdução do sinal de TGF- β pode ser dirigida de forma independente de SMADs (Moustakas e Heldin, 2005).

Entre os outros alvos preditos de *miR-146b-5p* apontados pela busca computacional, *IRAK1* e *TRAF6* estão presente nas listas geradas pelos programas utilizados. *IRAK1* (*Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*) e *TRAF6* (*TNF receptor-associated factor 6*), mediadores da transdução de sinais da resposta imune inata mediada por receptor do tipo Toll-like (TLR) (Gottipati et al., 2008), são regulados por ambas as isoformas *miR-146a* e *b* (Taganov et al., 2006). Em carcinomas papilíferos, um polimorfismo na isoforma *miR-146a* pode levar ao subseqüente aumento dos níveis de *IRAK1* e *TRAF6*. TRAF6 é um mediador importante da transdução não canônica de TGF-β, levando à ativação final de JNK e p38 para promover diferenciação celular, parada no ciclo celular e apoptose (Heldin et al., 2009). Desta forma *miR-146b-5p* influenciaria a tumorigênese inativando simultaneamente duas vias importantes no controle da proliferação celular, a via inibitória da proliferação TGF- β /SMAD e a via indutora de apoptose TGF- β /p38.

O aumento da expressão de miR-146b-5p não é observado em outros tipos de tumores. MiR-146b-5p tem sido descrito como um gene supressor de tumor em linhagens celulares de glioma e linhagens de câncer de mama com alto potencial metastático. Estas diferenças podem ser explicadas pelos diferentes genes-alvo de *miR-146b-5p* em cada tipo de tecido. Nas linhagens de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 e MDA-MB-435, a perda de miR-146a e miR-146b promove maior potencial migratório, invasivo e metastático (Hurst et al., 2009). Na linhagem celular de glioma U373, *miR-146b-5p* modula migração e invasão na linhagem celular de glioma regulação de MMP16 (Xia et al., 2009). Desta forma, *miR-146b-5p* pode estar envolvido em uma complexa rede de regulação, que pode depender do tecido de origem ou estágio do tumor de origem, tendo como alvo diferentes transcritos em cada contexto. Estas diferenças poderiam ainda ser resultante da multiplicidade de papéis da via de TGF-B. TGF-B pode suprimir os tumores de origem epitelial e estimular aqueles de origem mesenquimal e epiteliais em processo de transição mesenquimal (revisto em Massague, 2008). A inativação das alças de regulação autócrina e parácrina de TGF-β nos estágios iniciais leva à perda de controle do ciclo celular e aumento do potencial proliferativo. Já a estimulação da via em estágios avançados resulta em maior potencial invasivo e metastático. No entanto, a modulação da via de TGF-β por *miR-146b-5p* poderia ser, contudo, um evento singular ao tecido tiroideano.

A interrupção da via de TGF- β pela super-expressão de *miR-146b-5p* pode ser, portanto, um evento relevante para células tumorais da tiróide, uma vez que *miR-146b-5p* diminui os níveis de SMAD4 no citoplasma, dificultando sua transdução de sinal. Na figura 28 idealizamos um modelo de atuação de *miR-146b-5p* na célula folicular tiroideana, onde mostramos um papel oncogênico de *miR-146b-5p* como um importante regulador negativo da via de sinalização de TGF- β . Além disso, mostramos que a inibição de um único miRNA foi capaz de restaurar o sinal anti-proliferativo de TGF- β , diminuindo a proliferação celular no carcinoma papilífero. Os dados obtidos neste trabalho

contribuem para o entendimento do papel dos miRNAs na biologia da célula folicular tiroideana, fornecendo informações importantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.



Figura 28 - Modelo de atuação de miR-146b na regulação da via de TGF-β. Esquema ilustrativo da modulação da via de TGF-β mediada por *miR-146b-5p* em células foliculares torideanas normais em (A) e neoplásicas em (B), com base nos dados obtidos até o momento. (A) A baixa expressão de *miR-146b-5p* em células foliculares normais permite maior conjugação de SMADs em resposta ao estímulo de TGF-β. SMADs 2 e 3 fosforiladas (pSMAD2/3) se conjugam à SMAD4 e dirijem-se ao núcleo, promovendo a repressão de c-Myc e a transcrição de p21, levando a um estado de menor potencial replicativo, inibindo consequentemente a proliferação celular. (B) A ativação da via MAPK induz o aumento da expressão de *miR-146b-5p* na célula folicular em processo de tumorigênese, diminuindo os nívels de SMAD4 no citoplasma, resultando em menor acúmulo nuclear da mesma. O menor acúmulo nuclear de SMAD4 leva à maior resistência ao sinal anti-proliferativo de TGF-β, aumentando os níveis de c-Myc e diminuindo a transcrição de p21, resultando em menor controle do ciclo celular e maior estímulo proliferativo.

6 CONCLUSÕES

 O sistema de ativação *in vitro* dos oncogenes RET/PTC e BRAFT1799A mostrou aumento da expressão de *miR-146b-5p* em células foliculares normais de tiróide;

 O modelo de inibição da via MAPK mostrou a diminuição da expressão de miR-146b-5p nas linhagens de carcinoma papilífero;

- *MiR-146b-5p* regula negativamente a expressão SMAD4 de forma pós-transcricional interagindo diretamente com sua 3'UTR;

 MiR-146b-5p exerce papel oncogênico em células foliculares tiroideanas através da modulação negativa da via de TGF-β, promovendo maior progressão do ciclo celular e levando ao aumento da proliferação, inclusive na ausência de estimulação hormonal com TSH;

 - A inibição da expressão de *miR-146b-5p* em linhagens de carcinoma papilífero de tiróide, promoveu melhor resposta ao sinal de TGF-β, diminuindo a proliferação celular;

 O aumento da expressão de *miR-146b-5p*, regulado pela via MAPK, promove o escape do efeito inibitório de TGF-β na célula folicular tiroideana, exercendo papel oncogênico no carcinoma papilífero de tiróide.

REFERÊNCIAS*

Abraham D, Jackson N, Gundara JS, Zhao J, Gill AJ, Delbridge L, et al. MicroRNA profiling of sporadic and hereditary medullary thyroid cancer identifies predictors of nodal metastasis, prognosis, and potential therapeutic targets. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2011; 17 (14):4772-81.

Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. Am J Surg Pathol. 2006; 30 (2):216-22.

Akao Y, Nakagawa Y e Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. Biological & pharmaceutical bulletin. 2006; 29 (5):903-6.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004; 116 (2):281-97.

Benasciutti E, Pages G, Kenzior O, Folk W, Blasi F e Crippa MP. MAPK and JNK transduction pathways can phosphorylate Sp1 to activate the uPA minimal promoter element and endogenous gene transcription. Blood. 2004; 104 (1):256-62.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72 248-54.

Braun J, Hoang-Vu C, Dralle H e Huttelmaier S. Downregulation of microRNAs directs the EMT and invasive potential of anaplastic thyroid carcinomas. Oncogene. 2010; 29 (29):4237-44.

Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB e Cohen SM. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. Cell. 2003; 113 (1):25-36.

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.

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

^{*} de acordo com International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) - Vancouver Style. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Jounals: sample references -Available from: http://www.icmje.org.

in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99 (24):15524-9.

Cargnello M e Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR. 2011; 75 (1):50-83.

Cerutti JM, Ebina KN, Matsuo SE, Martins L, Maciel RM e Kimura ET. Expression of Smad4 and Smad7 in human thyroid follicular carcinoma cell lines. J Endocrinol Invest. 2003; 26 (6):516-21.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2005; 33 (20):e179.

Chen YT, Kitabayashi N, Zhou XK, Fahey TJ, 3rd e Scognamiglio T. MicroRNA analysis as a potential diagnostic tool for papillary thyroid carcinoma. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2008; 21 (9):1139-46.

Chomczynski P e Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987; 162 (1):156-9.

Chou CK, Chen RF, Chou FF, Chang HW, Chen YJ, Lee YF, et al. miR-146b is highly expressed in adult papillary thyroid carcinomas with high risk features including extrathyroidal invasion and the BRAF(V600E) mutation. Thyroid. 2010; 20 (5):489-94.

Costamagna E, Garcia B e Santisteban P. The functional interaction between the paired domain transcription factor Pax8 and Smad3 is involved in transforming growth factor-beta repression of the sodium/iodide symporter gene. J Biol Chem. 2004; 279 (5):3439-46.

D'Inzeo S, Nicolussi A, Ricci A, Mancini P, Porcellini A, Nardi F, et al. Role of reduced expression of SMAD4 in papillary thyroid carcinoma. J Mol Endocrinol. 2010; 45 (4):229-44.

Dremier S, Taton M, Coulonval K, Nakamura T, Matsumoto K e Dumont JE. Mitogenic, dedifferentiating, and scattering effects of hepatocyte growth factor on dog thyroid cells. Endocrinology. 1994; 135 (1):135-40.

Ellenrieder V. TGFbeta regulated gene expression by Smads and Sp1/KLF-like transcription factors in cancer. Anticancer Res. 2008; 28 (3A):1531-9.

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

Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D e Izaurralde E. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. Mol Cell Biol. 2007; 27 (11):3970-81.

Fabien N, Fusco A, Santoro M, Barbier Y, Dubois PM e Paulin C. Description of a human papillary thyroid carcinoma cell line. Morphologic study and expression of tumoral markers. Cancer. 1994; 73 (8):2206-12.

Franzen A, Piek E, Westermark B, ten Dijke P e Heldin NE. Expression of transforming growth factor-beta1, activin A, and their receptors in thyroid follicle cells: negative regulation of thyrocyte growth and function. Endocrinology. 1999; 140 (9):4300-10.

Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M, Ohtake T, Endo Y, Takebayashi Y, et al. BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. Oncogene. 2003; 22 (41):6455-7.

Fusco A, Berlingieri MT, Di Fiore PP, Portella G, Grieco M e Vecchio G. Oneand two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. Mol Cell Biol. 1987; 7 (9):3365-70.

Garcia-Jimenez C e Santisteban P. TSH signalling and cancer. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2007; 51 (5):654-71.

Garzon R, Calin GA e Croce CM. MicroRNAs in Cancer. Annual review of medicine. 2009; 60 167-79.

Geraldo MV, Yamashita AS e Kimura ET. MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF-beta by repressing SMAD4 in thyroid cancer. Oncogene. 2011;

Gossen M e Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; 89 (12):5547-51.

Gottipati S, Rao NL e Fung-Leung WP. IRAK1: a critical signaling mediator of innate immunity. Cellular signalling. 2008; 20 (2):269-76.

Gregory RI e Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer. Cancer Res. 2005; 65 (9):3509-12.

Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. Nucleic Acids Res. 2004; 32: 109-11.

Guo L e Lu Z. The fate of miRNA* strand through evolutionary analysis: implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule? PloS one. 2010; 5 (6):e11387.

Hammond SM. MicroRNAs as oncogenes. Curr Opin Genet Dev. 2006; 16 (1):4-9.

Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. Cancer Res. 2005; 65 (21):9628-32.

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. 2005a; 102 (52):19075-80.

He L e Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet. 2004; 5 (7):522-31.

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

Hegedus L. Clinical practice. The thyroid nodule. N Engl J Med. 2004; 351 (17):1764-71.

Heldin CH, Landstrom M e Moustakas A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. Curr Opin Cell Biol. 2009; 21 (2):166-76.

Heldin CH, Miyazono K e ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. Nature. 1997; 390 (6659):465-71.

Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins. Cell research. 2009; 19 (1):36-46.

Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Jarvinen HJ, Sistonen P, et al. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. Science. 1998; 280 (5366):1086-8.

Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, Benz CC, Vaidya KS e Welch DR. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. Cancer Res. 2009; 69 (4):1279-83.

Ihle JN. STATs: signal transducers and activators of transcription. Cell. 1996; 84 (3):331-4.

Janknecht R, Ernst WH, Pingoud V e Nordheim A. Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. The EMBO journal. 1993; 12 (13):5097-104.

Jazdzewski K, Boguslawska J, Jendrzejewski J, Liyanarachchi S, Pachucki J, Wardyn KA, et al. Thyroid hormone receptor beta (THRB) is a major target gene for microRNAs deregulated in papillary thyroid carcinoma (PTC). J Clin Endocrinol Metab. 2011; 96 (3):E546-E53.

Jemal A, Siegel R, Xu J e Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin. 2010; 60 (5):277-300.

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. Cell. 2005; 120 (5):635-47.

Kawaguchi A, Ikeda M, Endo T, Kogai T, Miyazaki A e Onaya T. Transforming growth factor-beta1 suppresses thyrotropin-induced Na+/I- symporter messenger RNA and protein levels in FRTL-5 rat thyroid cells. Thyroid. 1997; 7 (5):789-94.

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

Kim YK e Kim VN. Processing of intronic microRNAs. The EMBO journal. 2007; 26 (3):775-83.

Kimura ET, Kopp P, Zbaeren J, Asmis LM, Ruchti C, Maciel RM, et al. Expression of transforming growth factor beta1, beta2, and beta3 in multinodular goiters and differentiated thyroid carcinomas: a comparative study. Thyroid. 1999; 9 (2):119-25.

Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE e Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. Cancer Res. 2003; 63 (7):1454-7.

Kluiver J, Haralambieva E, de Jong D, Blokzijl T, Jacobs S, Kroesen BJ, et al. Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma. Genes, chromosomes & cancer. 2006; 45 (2):147-53.

Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. Nature genetics. 2005; 37 (5):495-500.

Kretzschmar M e Massague J. SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. Current opinion in genetics & development. 1998; 8 (1):103-11.

Lahat N, Sheinfeld M, Sobel E, Kinarty A e Kraiem Z. Divergent effects of cytokines on human leukocyte antigen-DR antigen expression of neoplastic and non-neoplastic human thyroid cells. Cancer. 1992; 69 (7):1799-807.

Lazzereschi D, Nardi F, Turco A, Ottini L, D'Amico C, Mariani-Costantini R, et al. A complex pattern of mutations and abnormal splicing of Smad4 is present in thyroid tumours. Oncogene. 2005; 24 (34):5344-54.

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

Leone V, D'Angelo D, Ferraro A, Pallante P, Rubio I, Santoro M, et al. A TSH-CREB1-microRNA Loop Is Required for Thyroid Cell Growth. Mol Endocrinol. 2011a;

Leone V, D'Angelo D, Rubio I, de Freitas PM, Federico A, Colamaio M, et al. MiR-1 Is a Tumor Suppressor in Thyroid Carcinogenesis Targeting CCND2, CXCR4, and SDF-1{alpha}. J Clin Endocrinol Metab. 2011b;

Lewis BP, Burge CB e Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell. 2005; 120 (1):15-20.

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

Lujambio A e Esteller M. CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer. Cell Cycle. 2007; 6 (12):1455-9.

Maciel RM, Kimura ET, Takahaski MH, Lopes MH, Mesquita MI, Moses AC, et al. Insulin-Like Growth Factor I in Human Thyroid Tissue: Specific Localization by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. Endocr Pathol. 1995; 6 (3):207-15.

Massague J. TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem. 1998; 67 753-91.

Massague J. TGFbeta in Cancer. Cell. 2008; 134 (2):215-30.

Matsuo SE, Fiore AP, Siguematu SM, Ebina KN, Friguglietti CU, Ferro MC, et al. Expression of SMAD proteins, TGF-beta/activin signaling mediators, in human thyroid tissues. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2010; 54 (4):406-12.

Matsuo SE, Leoni SG, Colquhoun A e Kimura ET. Transforming growth factorbeta1 and activin A generate antiproliferative signaling in thyroid cancer cells. J Endocrinol. 2006; 190 (1):141-50.

Matsuo SE, Martins L, Leoni SG, Hajjar D, Ricarte-Filho JC, Ebina KN, et al. [Biological markers in thyroid tumors]. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2004; 48 (1):114-25.

Mazeh H, Mizrahi I, Halle D, Ilyayev N, Stojadinovic A, Trink B, et al. Development of a microRNA-based molecular assay for the detection of papillary thyroid carcinoma in aspiration biopsy samples. Thyroid. 2011; 21 (2):111-8.

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

Mitomo S, Maesawa C, Ogasawara S, Iwaya T, Shibazaki M, Yashima-Abo A, et al. Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. Cancer science. 2008; 99 (2):280-6.

Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C, Jr., Zhang L e Fagin JA. Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. Cancer Res. 2005; 65 (6):2465-73.

Morel J e Berenbaum F. Signal transduction pathways: new targets for treating rheumatoid arthritis. Joint, bone, spine : revue du rhumatisme. 2004; 71 (6):503-10.

Morris JC, 3rd, Ranganathan G, Hay ID, Nelson RE e Jiang NS. The effects of transforming growth factor-beta on growth and differentiation of the continuous rat thyroid follicular cell line, FRTL-5. Endocrinology. 1988; 123 (3):1385-94.

Moustakas A e Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. J Cell Sci. 2005; 118 (Pt 16):3573-84.

Munker R e Calin GA. MicroRNA profiling in cancer. Clin Sci (Lond). 2011; 121 (4):141-58.

Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. J Clin Endocrinol Metab. 2003; 88 (9):4393-7.

Nicolussi A, D'Inzeo S, Santulli M, Colletta G e Coppa A. TGF-beta control of rat thyroid follicular cells differentiation. Mol Cell Endocrinol. 2003; 207 (1-2):1-11.

Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D e Nikiforov YE. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. J Clin Endocrinol Metab. 2008; 93 (5):1600-8.

Nishihara K, Katsumoto F, Kurokawa Y, Toyoshima S, Takeda S e Abe R. Anaplastic carcinoma showing rhabdoid features combined with mucinous cystadenocarcinoma of the pancreas. Archives of pathology & laboratory medicine. 1997; 121 (10):1104-7.

Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. Cancer Res. 2004; 64 (9):3087-95.

Pacifico F, Crescenzi E, Mellone S, Iannetti A, Porrino N, Liguoro D, et al. Nuclear factor-{kappa}B contributes to anaplastic thyroid carcinomas through up-regulation of miR-146a. J Clin Endocrinol Metab. 2010; 95 (3):1421-30.

Padua D e Massague J. Roles of TGFbeta in metastasis. Cell research. 2009; 19 (1):89-102.

Paire A, Bernier-Valentin F, Selmi-Ruby S e Rousset B. Characterization of the rat thyroid iodide transporter using anti-peptide antibodies. Relationship between its expression and activity. J Biol Chem. 1997; 272 (29):18245-9.

Pallante P, Visone R, Croce CM e Fusco A. Deregulation of microRNA expression in follicular-cell-derived human thyroid carcinomas. Endocr Relat Cancer. 2010; 17 (1):F91-104.

Pallante P, Visone R, Ferracin M, Ferraro A, Berlingieri MT, Troncone G, et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. Endocr Relat Cancer. 2006; 13 (2):497-508.

Palona I, Namba H, Mitsutake N, Starenki D, Podtcheko A, Sedliarou I, et al. BRAFV600E promotes invasiveness of thyroid cancer cells through nuclear factor kappaB activation. Endocrinology. 2006; 147 (12):5699-707.

Patnaik SK, Kannisto E, Knudsen S e Yendamuri S. Evaluation of microRNA expression profiles that may predict recurrence of localized stage I non-small cell lung cancer after surgical resection. Cancer Res. 2010; 70 (1):36-45.

Pei XH e Xiong Y. Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. Oncogene. 2005; 24 (17):2787-95.

Perry MM, Williams AE, Tsitsiou E, Larner-Svensson HM e Lindsay MA. Divergent intracellular pathways regulate interleukin-1beta-induced miR-146a and miR-146b expression and chemokine release in human alveolar epithelial cells. FEBS letters. 2009; 583 (20):3349-55.

PfaffI MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001; 29 (9):e45.

Ragusa M, Majorana A, Statello L, Maugeri M, Salito L, Barbagallo D, et al. Specific alterations of microRNA transcriptome and global network structure in colorectal carcinoma after cetuximab treatment. Molecular cancer therapeutics. 2010; 9 (12):3396-409.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. Nature. 2000; 403 (6772):901-6.

Ricarte-Filho JC, Fuziwara CS, Yamashita AS, Rezende E, da-Silva MJ e Kimura ET. Effects of let-7 microRNA on Cell Growth and Differentiation of Papillary Thyroid Cancer. Transl Oncol. 2009; 2 (4):236-41.

Riesco-Eizaguirre G, Rodriguez I, De la Vieja A, Costamagna E, Carrasco N, Nistal M, et al. The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. Cancer Res. 2009; 69 (21):8317-25.

Riesco-Eizaguirre G e Santisteban P. A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications. Eur J Endocrinol. 2006; 155 (4):495-512.

Saavedra HI, Knauf JA, Shirokawa JM, Wang J, Ouyang B, Elisei R, et al. The RAS oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the MAPK pathway. Oncogene. 2000; 19 (34):3948-54.

Santoro M, Carlomagno F, Hay ID, Herrmann MA, Grieco M, Melillo R, et al. Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. The Journal of clinical investigation. 1992; 89 (5):1517-22.

Santoro M, Chiappetta G, Cerrato A, Salvatore D, Zhang L, Manzo G, et al. Development of thyroid papillary carcinomas secondary to tissue-specific expression of the RET/PTC1 oncogene in transgenic mice. Oncogene. 1996; 12 (8):1821-6.

Secretaria da Saúde. Registro de câncer de base populacional (São Paulo). Prefeitura de São Paulo. 2011 [data de acesso 08 Set 2011]. Disponível em: <http://ww2.prefeitura.sp.gov.br/cgi/deftohtm.exe?secretarias/saude/TABNET/C A/cancer.def>.

Schafer R e Sers C. RAS oncogene-mediated deregulation of the transcriptome: from molecular signature to function. Advances in enzyme regulation. 2011; 51 (1):126-36.

Schwertheim S, Sheu SY, Worm K, Grabellus F e Schmid KW. Analysis of deregulated miRNAs is helpful to distinguish poorly differentiated thyroid carcinoma from papillary thyroid carcinoma. Horm Metab Res. 2009; 41 (6):475-81.

Sheu SY, Grabellus F, Schwertheim S, Handke S, Worm K e Schmid KW. Lack of correlation between BRAF V600E mutational status and the expression profile of a distinct set of miRNAs in papillary thyroid carcinoma. Horm Metab Res. 2009; 41 (6):482-7.

Sheu SY, Grabellus F, Schwertheim S, Worm K, Broecker-Preuss M e Schmid KW. Differential miRNA expression profiles in variants of papillary thyroid carcinoma and encapsulated follicular thyroid tumours. British journal of cancer. 2010a; 102 (2):376-82.

Sheu SY, Vogel E, Worm K, Grabellus F, Schwertheim S e Schmid KW. Hyalinizing trabecular tumour of the thyroid-differential expression of distinct miRNAs compared with papillary thyroid carcinoma. Histopathology. 2010b; 56 (5):632-40.

Siegel PM e Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. Nat Rev Cancer. 2003; 3 (11):807-21.

Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. Oncogene. 2003; 22 (29):4578-80.

Sobrinho-Simoes M, Preto A, Rocha AS, Castro P, Maximo V, Fonseca E, et al. Molecular pathology of well-differentiated thyroid carcinomas. Virchows Archiv : an international journal of pathology. 2005; 447 (5):787-93.

Suzuki K e Kelleher AD. Transcriptional regulation by promoter targeted RNAs. Current topics in medicinal chemistry. 2009; 9 (12):1079-87.

Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ e Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103 (33):12481-6.

Takakura S, Mitsutake N, Nakashima M, Namba H, Saenko VA, Rogounovitch TI, et al. Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells. Cancer science. 2008; 99 (6):1147-54.

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. Cancer Res. 2004; 64 (11):3753-6.

Talotta F, Cimmino A, Matarazzo MR, Casalino L, De Vita G, D'Esposito M, et al. An autoregulatory loop mediated by miR-21 and PDCD4 controls the AP-1 activity in RAS transformation. Oncogene. 2009; 28 (1):73-84.

Tanaka J, Ogura T, Sato H e Hatano M. Establishment and biological characterization of an in vitro human cytomegalovirus latency model. Virology. 1987; 161 (1):62-72.

Taton M, Lamy F, Roger PP e Dumont JE. General inhibition by transforming growth factor beta 1 of thyrotropin and cAMP responses in human thyroid cells in primary culture. Mol Cell Endocrinol. 1993; 95 (1-2):13-21.

Tetzlaff MT, Liu A, Xu X, Master SR, Baldwin DA, Tobias JW, et al. Differential expression of miRNAs in papillary thyroid carcinoma compared to multinodular goiter using formalin fixed paraffin embedded tissues. Endocr Pathol. 2007; 18 (3):163-73.

Visone R, Pallante P, Vecchione A, Cirombella R, Ferracin M, Ferraro A, et al. Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. Oncogene. 2007; 26 (54):7590-5.

Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103 (7):2257-61.

von Kleist S, Chany E, Burtin P, King M e Fogh J. Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. Journal of the National Cancer Institute. 1975; 55 (3):555-60.

Wang J, Knauf JA, Basu S, Puxeddu E, Kuroda H, Santoro M, et al. Conditional expression of RET/PTC induces a weak oncogenic drive in thyroid PCCL3 cells and inhibits thyrotropin action at multiple levels. Mol Endocrinol. 2003; 17 (7):1425-36.

Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, Frilling A e Eng C. A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 2006; 91 (9):3584-91.

Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, et al. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. Cell. 1992; 71 (6):1003-14.

Xia H, Qi Y, Ng SS, Chen X, Li D, Chen S, et al. microRNA-146b inhibits glioma cell migration and invasion by targeting MMPs. Brain research. 2009; 1269 158-65.

Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. Endocr Relat Cancer. 2005; 12 (2):245-62.

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

Yang G e Yang X. Smad4-mediated TGF-beta signaling in tumorigenesis. Int J Biol Sci. 2010; 6 (1):1-8.

Yip L, Kelly L, Shuai Y, Armstrong MJ, Nikiforov YE, Carty SE, et al. MicroRNA signature distinguishes the degree of aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. Annals of surgical oncology. 2011; 18 (7):2035-41.

Yu YL, Chiang YJ, Chen YC, Papetti M, Juo CG, Skoultchi AI, et al. MAPKmediated phosphorylation of GATA-1 promotes Bcl-XL expression and cell survival. J Biol Chem. 2005; 280 (33):29533-42.

Zheng S, Eacker SM, Hong SJ, Gronostajski RM, Dawson TM e Dawson VL. NMDA-induced neuronal survival is mediated through nuclear factor I-A in mice. The Journal of clinical investigation. 2010; 120 (7):2446-56.

Zhong H, Wang HR, Yang S, Zhong JH, Wang T, Wang C, et al. Targeting Smad4 links microRNA-146a to the TGF-beta pathway during retinoid acid induction in acute promyelocytic leukemia cell line. Int J Hematol. 2010; 92 (1):129-35.

ANEXOS

Artigo publicado

Os dados obtidos neste trabalho foram organizados em manuscrito, entitulado:

"*MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF-beta by repressing SMAD4 in thyroid cancer*".

Geraldo MV, Yamashita AS, Kimura ET. Oncogene, 2011.

Oncogene (2011) 1–13 © 2011 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0950-9232/11

www.nature.com/onc

MicroRNA *miR-146b-5p* regulates signal transduction of TGF- β by repressing *SMAD4* in thyroid cancer

MV Geraldo, AS Yamashita and ET Kimura

Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

MicroRNAs (miRNA) are small non-coding RNAs involved in post-transcriptional gene regulation that have crucial roles in several types of tumors, including papillary thyroid carcinoma (PTC). miR-146b-5p is overexpressed in PTCs and is regarded as a relevant diagnostic marker for this type of cancer. A computational search revealed that miR-146b-5p putatively binds to the 3' untranslated region (UTR) of SMAD4, an important member of the transforming growth factor β (TGF- β) signaling pathway. The TGF-B pathway is a negative regulator of thyroid follicular cell growth, and the mechanism by which thyroid cancer cells evade its inhibitory signal remains unclear. We questioned whether the modulation of the TGF-B pathway by miR-146b-5p can contribute to thyroid tumorigenesis. Luciferase reporter assay confirmed the direct binding of miR-146b-5p on the SMAD4 3'UTR. Specific inhibition of *miR-146b-5p* with a locked nucleic acid-modified anti-miR-146b oligonucleotide significantly increased SMAD4 levels in the human papillary carcinoma cell lines, TPC-1 and BCPAP. Moreover, suppression of miR-146b-5p increased the cellular response to the TGF-β anti-proliferative signal, significantly decreasing the proliferation rate. The overexpression of miR-146b-5p in normal rat follicular PCCL3 cells decreased SMAD4 levels and disrupted TGF-B signal transduction. MiR-146b-5p overexpression in PCCL3 cells also significantly increased cell proliferation in the absence of thyroidstimulating hormone and conferred resistance to TGF-βmediated cell-cycle arrest. Additionally, the activation of thyroid most common oncogenes RET/PTC3 and BRAF in PCCL3 cells upregulated *miR-146b-5p* expression. Our results confirm the oncogenic role of miR-146b-5p in thyroid follicular cells and contribute to knowledge regarding the modulation of TGF-B signal transduction by miRNAs in PTCs.

Oncogene advance online publication, 29 August 2011; doi:10.1038/onc.2011.381

Keywords: microRNA; TGF-β; papillary thyroid carcinoma

Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNAs that are involved in post-transcriptional gene regulation via imperfect pairing with the 3' untranslated region (UTR) of target mRNAs. In mammalian cells, miRNAs drive repression of gene expression by inhibiting protein translation and, less frequently, by mRNA degradation. MiRNAs mediate several biological processes including cell growth, apoptosis, cell differentiation, and development (Bartel, 2004). In addition, miRNAs participate in cancer initiation, progression, and metastasis (Calin and Croce, 2006; Dykxhoorn, 2010). The regulation of classical oncogenes and tumor suppressor genes by miRNAs was rapidly identified as a cancer hallmark, transforming this class of small RNAs into potential targets for cancer therapy, diagnosis, and prognosis.

Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy and accounts for >5% of cancers in women. In the United States, ~ 1690 deaths are estimated to result from thyroid cancer in 2010 (Jemal et al., 2010). Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most prevalent type of tumor among thyroid malignancies, accounting for $\sim 80\%$ of cases. The most common genetic alterations involved in PTC development preferentially lead to the constitutive activation of the RET-RAS-BRAF-MAPK signaling pathway. These alterations include RET/PTC rearrangements (Santoro et al., 2002), the $BRAF^{V600E}$ point mutation (Kimura et al., 2003), and, less frequently, RAS mutations (Fagin, 2002). Although these genetic alterations lead to the activation of the same signaling pathway, they are mutually exclusive and rarely overlap.

Large-scale analyses have described the deregulation of several miRNAs in thyroid tumor samples (He *et al.*, 2005; Nikiforova *et al.*, 2009; Pallante *et al.*, 2010), revealing that the 5' strand of *miR-146b, miR-146b-5p*, is upregulated in PTCs and can be used as a diagnostic tool for this type of cancer. However, it has not been confirmed whether upregulation of this miRNA in PTC exerts a causative effect on thyroid malignant transformation. Using programs available online, we determined that both isoforms of *miR-146, a* and *b*, potentially regulate the *SMAD4* gene. The regulation of *SMAD4* by *miR-146a* has been described previously in a promyelocytic leukemia cell line (Zhong *et al.*, 2010). *SMAD4* (SMAD family member 4/Mothers

Correspondence: Dr ET Kimura, Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1524, Room 414, São Paulo 05508-000, Brazil. E-mail: etkimura@usp.br

Received 8 January 2011; revised 30 June 2011; accepted 25 July 2011

against decapentaplegic homolog 4) is an important effector of the transforming growth factor β (TGF- β) signaling pathway. TGF- β is a member of the homonymous TGF- β superfamily, which includes activins (ACT) and bone morphogenetic protein, among others (Massague, 1998). The activation of TGF- β signal transduction in epithelial cells begins when TGF- β binds to its type II receptor (T β RII), which then recruits the type I receptor (T β RII), leading to the phosphorylation of receptor-regulated SMADs 2 and 3 (R-SMADs). TGF- β signal transduction is mostly mediated by *SMAD4*, which associates with the phosphorylated R-SMADs (pSMADs) and translocates to the nucleus to drive the transcriptional regulation of several target genes.

Under normal physiological conditions, TGF- β is a potent inhibitory factor of epithelial cells, including thyroid follicular cells (Heldin et al., 2009). Despite its anti-proliferative activity, expression of TGF-B1 is elevated in thyroid carcinomas, suggesting that tumor cells become unresponsive to the TGF- β inhibitory signal (Kimura et al., 1999). Although chromosomal deletions involving the SMAD4 locus are frequently found in pancreatic adenocarcinomas, metastatic colorectal cancers, and small intestinal carcinomas (Yang and Yang, 2010), these deletions are rarely observed in thyroid tumors. In a subset of thyroid tumors, inactivating mutations and alternative splicing are observed in the SMAD4 gene, resulting in decreased gene expression levels (Lazzereschi et al., 2005). Thus, the molecular events that cause thyroid tumor cells to lose responsiveness to the TGF- β anti-proliferative signal are not fully understood.

The aim of the present study was to analyze the influence of miR-146b-5p on the regulation of TGF- β signal transduction and to determine its contribution to thyroid tumorigenesis. We overexpressed the miR-146b-5p in the normal rat thyroid follicular cell line, PCCL3, and used a locked nucleic acid-modified antimiR-146b oligonucleotide to inhibit this miRNA in the human papillary carcinoma cell lines, TPC-1 and BCPAP. Our data suggest an important role of miR-146b-5p in the regulation of SMAD4, and consequently, in the modulation of the TGF- β signaling pathway in normal and tumoral thyroid cell lines.

Results

Oncogenic activation of the RET-RAS-BRAF-MAPK signaling pathway in normal thyroid follicular cell lines induces upregulation of miR-146b-5p

The abnormal expression of miR-146b-5p has been reported previously in association with the most frequent oncogenic events observed in PTC: the $BRAF^{V600E}$ point mutation and RET/PTC rearrangements (Santoro *et al.*, 2002; Kimura *et al.*, 2003; Cahill *et al.*, 2006; Nikiforova *et al.*, 2008; Chou *et al.*, 2010). We observed that the activation of both RET/PTC3 and BRAF oncogenes in PCCL3 cells led to the upregulation of *miR-146b-5p* expression (Figure 1).



Figure 1 *MiR-146b-5p* is upregulated by common thyroid oncogenes. Rat follicular cell lines PTC/3-5 and PC-BRAF were induced with doxycycline for 72h for conditional expression of RET/PTC3 or $BRAF^{veoce}$ oncogenes, respectively. The *SnoRNA* (*Rattus norvegicus Small nucleolar RNA*) gene was used as an internal control. Data are represented as average of three independent experiments and bars represent s.d.

SMAD4 modulation by miR-146b-5p in normal and tumoral thyroid cell lines

To test whether *miR-146b-5p* can regulate *SMAD4* expression through the binding to its 3'UTR, a wild type and a mutated binding site of *miR-146b-5p* on *SMAD4* 3'UTR were cloned into a luciferase reporter plasmid, generating the plasmids pmiRGlo-SMAD4-3'UTR-wt and -Mut, respectively (Figure 2a). To avoid the interference of endogenous *SMAD4* transcript, the luciferase assays were performed in the ARO cell line, which express low *SMAD4* levels. The co-transfection of pmiRGlo-*SMAD4*-wt with pcDNA-miR-146b led to a reduction in the luciferase activity (Figure 2b). In contrast, the transfection of anti-miR-146b restored luciferase activity to control levels. Moreover, *miR-146b-5p* was not able to bind to the mutated construct.

To investigate the role of miR-146b-5p in normal rat follicular cells (PCCL3), we generated the conditionally miR-146b-5p-expressing cell line PC-146b (Figure 2c). To analyze the role of miR-146b-5p on thyroid cancer cells, we used a specific miR-146b-5p oligonucleotide inhibitor (anti-miR-146b) to deplete miR-146b-5p expression in two papillary carcinoma cell lines, TPC-1 and BCPAP (Figure 2d). Quantitative PCR and western blot analysis revealed that overexpression of miR-146b-5p in PC-146b cells decreased Smad4 expression at the transcriptional and translational levels (Figures 2e and f). On the other hand, the suppression of miR-146b-5p by anti-miR-146b in both TPC-1 and BCPAP cells led to a marked increase in SMAD4 mRNA and protein levels (Figures 2e and f).

Modulation of the TGF- β signaling pathway by miR-146b-5p

To verify the influence of *Smad4* modulation by *miR*-*146b-5p* on TGF- β signal transduction in PC-146b cells, overexpression of *miR-146b-5p* was induced with DOX for 72h, and recombinant TGF- β 1 (rTGF- β 1) was added to the culture. Given its regulation by the TGF- β signal (Matsuo *et al.*, 2006), *SMAD4* expression was

npg 2

miR-146b-5p disrupts TGF-β signal transduction MV Geraldo et al



Figure 2 Post-transcriptional repression of SMAD4 by miR-146b-5p. (a) The predicted binding site of miR-146b-5p on SMAD4 3'UTR was cloned in pmiRGlo plasmid, generating the pmiRGlo-SMAD4-3'UTR-wt plasmid. A plasmid containing the mutated binding site (shown as asterisks) was used as control (pmiRGlo-SMAD4-3'UTR-Mut). (b) The luciferase assay was performed in the wt + miR146b + Anti-146b) or pcDNA3.1-miR-21 (SMAD4-wt + miR-21). (c) Total RNA extracted from rat follicular cells PC-146b, grown in the presence (DOX) or absence (CTR) of doxycycline for 0, 24, 48, 72, and 96 h was used for quantification of miR-146b-5p expression. (d) Human papillary thyroid carcinoma cell lines TPC-1 and BCPAP were transfected with anti-miR-146b oligonucleotide (10 or 25 nm). Each cell line incubated with transfection reagent alone or transfected with the commercially available negative control anti-miR-1 were used as reference (mock) and negative control (neg), respectively. (e) PC-146b cells were treated with DOX or control (CTR) for 72 h (0, 0.1, or 1 µg/ml) and TPC-1 and BCPAP cells were transfected (anti-146b) or not (mock) with antimiR-146b (0, 10, 25 nm) for 72 h for quantification of miR-146b-5p and SMAD4 gene expression. (c, e) SnoRNA (Rattus norvegicus Small nucleolar RNA) and RPL19 (Rattus norvegicus ribosomal Protein L19) gene expression were used for rat miRNA and mRNA normalization, respectively. (d, e) RNU6B (Homo sapiens Small nuclear RNA U6) and RPL19 (Homo sapiens ribosomal protein L19) genes were used as internal controls for human miRNA and mRNA expression. (f) For PAGE analyses, 40 µg of total protein per sample were used. a-TUBULIN expression was used for normalization. Data are represented as average of three independent experiments and bars represent standard deviation. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

evaluated as a function of TGF- β pathway status. Overexpression of *miR-146b-5p* impaired the transcription of *Smad4* in response to TGF- β treatment (Figure 3a) when compared with cells treated with TGF- β alone. The overexpression of *miR-146b-5p* in PC-146b cells also increased *c-Myc* mRNA levels

Oncogene

npg

miR-146b-5p disrupts TGF-β signal transduction MV Geraldo et al



Figure 3 *MiR-146b-5p* regulates TGF- β signal transduction. (a) Rat follicular PC-146b cells were treated with DOX for 72 h or untreated. Cultures were then treated with recombinant TGF- β 1 (1 ng/ml) or were untreated. After 24 h, total RNA was extracted and used for cDNA synthesis. *SMAD4* gene expression was evaluated as a function of TGF- β signaling pathway status. (b) PC-146b cells were DOX induced (DOX) or untreated (CTR) for quantification of *Myc* and *Tgfb1* gene expression. (c) Human papillary carcinoma TPC-1 cells were transfected with anti-miR-146b or control. Recombinant TGF- β 1 (1 ng/ml) or control was added to culture medium after 72 h. After 24 h, total RNA was extracted and used for cDNA synthesis. *SMAD4* gene expression was evaluated as a function of TGF- β 1 (ng/ml) or control was added to culture medium after 72 h. After 24 h, total RNA was extracted and used for cDNA synthesis. *SMAD4* gene expression was evaluated as a function of TGF- β 1 signaling pathway status. (d) TPC-1 cells were transfected with anti-miR-146b (anti-146b) or control (mock) for quantification of *CDKN1A* and *TGF-\beta1* gene expression. (a–d) The *RPL19* gene was used as an internal control. Data are represented as average of three independent experiments performed in duplicates and bars represent s.d. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001.

despite the increase in $TGF-\beta 1$ mRNA levels (Figure 3b).

Suppression of *miR-146b-5p* increased the response of TPC-1 cells to the TGF- β signal, significantly increasing *SMAD4* gene expression levels in response to rTGF- β 1 treatment when compared with cells treated with rTGF- β 1 alone (Figure 3c). Depletion of *miR-146b-5p* in TPC-1 cells increased gene expression of *CDKN1A*, even though *TGF-\beta1* levels were slightly decreased (Figure 3d). Moreover, treatment of TPC-1 cells with rTGF- β 1 and anti-miR-146b for 1 h resulted in strong translocation of *SMAD4* to the nucleus, as observed by laser confocal microscopy, when compared with

treatment with rTGF- β 1 alone (Figure 4a). To confirm these data, we conducted immunoblotting experiments using nuclear and cytoplasmic protein fractions isolated from these groups. As expected, increased nuclear accumulation of *SMAD4* was observed following transfection with anti-miR-146b and treatment with rTGF- β 1 (Figure 4b). The suppression of *miR-146b-5p* also markedly increased the activity of a TGF- β responsive luciferase reporter construct, p3TP-Lux (Figure 4c). To determine whether the nuclear accumulation of *SMAD4* could restore the transduction of TGF- β inhibitory signal, TPC-1 cells transfected with anti-miR-146b were treated with rTGF- β 1 or

4

Figure 4 *MiR-146b-5p* enhances *SMAD4* nuclear accumulation and restores the responsiveness of TGF-β anti-proliferative signal in TPC-1 cells. (a) Human papillary carcinoma cells TPC-1 transfected with anti-miR-146b (anti-146b) or control (mock), and treated with rTGF-β1 (1 ng/ml) or control for 1 h were incubated with an anti-*SMAD4* antibody, followed by incubation with a secondary antibody conjugated with Alexa-Fluor 588 fluorescent dye (green). Cells were stained with PI for nuclear visualization (red). Translocation of *SMAD4* to the nucleus was visualized at × 60 magnification as yellow fluorescence in merge images. (b) Protein from nuclear and cytoplasmic fractions (15 µg per sample) was used for immunoblotting. Incubation of the blot with specific antibodies against α-TUBULIN and LAMIN-A was used as a control of fraction separation. Data are representative of three independent experiments. (c) TPC-1 cells were transfected with anti-miR-146b (anti-146b) or control (mock), and 5 h following transfection, cells were treated with rTGF-β1 (1 ng/ml) or untreated. After 48 h, the luciferase reporter assay was performed. (d) TPC-1 cells were transfected with anti-miR-146b (anti-146b) are represented with rTGF-β1 (1 ng/ml) or untreated. After 24 h, the MTT assay was performed. Data are represented as average of three independent experiments performed in quintuplicates. Bars represent s.d. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001.

miR-146b-5p disrupts TGF- β signal transduction MV Geraldo et al

npg 5

control, and the MTT assay was performed. AntimiR-146b transfection significantly increased sensitivity to the TGF- β anti-proliferative signal, indicating that miR-146b-5p inhibition was sufficient to reestablish TGF- β signal transduction after 24 h of treatment (Figure 4d).



Oncogene

а Nis Тg b PC-146b 1.5 1.5 ĝ CTB Nis/Rpl19 (a.u.) *Tg/Rpl19* (a.u.) 1.0 1.0 Nis 0.5 0.5 α-Tubulin 0.0 0.0 CTR DOX CTR DOX С ΤG Tshr Тро 1.5 1.5 1.5 TG/RPL19 (a.u.) Tshr/Rp119 (a.u.) *Tpo/Rpl19* (a.u.) 1.0 1.0 1.0 0.5 0.5 0.5 0.0 0.0 0.0 Mock Anti-146b CTR DOX CTR DOX

miR-146b-5p disrupts TGF-ß signal transduction

MV Geraldo et al

Figure 5 Disruption of TGF- β signaling pathway by *miR-146b-5p* deregulates thyroid-specific genes. (a) Rat follicular cells PC-146b were DOX treated for 72 h (DOX) or untreated (CTR) for quantification of *Nis*, *Tg*, *Tpo*, and *Tshr* gene expression. (b) For PAGE analysis, 30 µg of total protein extracts per sample from PC-146b cells treated (DOX) or not (CTR) with doxycycline (1 µg/ml) for 72 h were used for immunoblotting. The blot was incubated with specific antibody against NIS. Incubation of the blot with specific antibody against α -Tubulin was used for normalization. (c) Human papillary carcinoma cell line TPC-1 was transfected with anti-miR-146b (anti-146b) or control (mock) for quantification of *NIS*, *TG*, *TPO*, and *TSHR* gene expression. Rat *Rpl19* and human *RPL19* genes were used as internal controls. No detectable levels of *NIS*, *TPO*, or *TSHR* were observed in TPC-1 cells, regardless of treatment. Data are represented as average of three independent experiments performed in duplicates. Bars represent standard deviation. **P*<0.05; ***P*<0.01.

PCCL3 cells retain the expression of the thyroidspecific differentiation genes *Nis*, *Tg*, *Tpo*, and *Tshr in vitro* (Fusco *et al.*, 1987). We tested whether the modulation of TGF- β by *miR-146b-5p* could influence expression of these genes. The overexpression of *miR-146b-5p* in PC-146b cells increased mRNA levels of all of thyroid-specific genes (Figure 5a). However, the western blot analysis revealed no significant alterations of NIS protein levels (Figure 5c) in PC-146b cells. The inhibition of *miR-146b-5p* in the tumor cell line, TPC-1, decreased *Tg* mRNA levels (Figure 5b). The expression levels of *NIS*, *TPO*, and *TSHR* were not detectable in mock cells or in *miR-146b-5p*-suppressed TPC-1 cells. No detectable levels of NIS protein were observed in TPC-1 cells.

MiR-146b-5p promotes cell growth by abrogating cellular responsiveness to the $TGF-\beta$ signal

We next analyzed the influence of *miR-146b-5p* on cellcycle regulation of normal thyrocytes. The addition of doxycycline to the culture medium has been described as inadequate for cell-cycle and proliferation analyses because of its intrinsic cytotoxicity (Ermak *et al.*, 2003). Therefore, we generated the cell line PC-CMV-146b, which stably expresses *miR-146b-5p* independently of DOX treatment (Figure 6a). PC-CMV-146b cells

npg

6

were synchronized by serum and thyroid-stimulating hormone (TSH) deprivation, and cell-cycle reentry was evaluated 3, 6, and 12h later. Twelve hours after stimulation, 80% of PC-CMV-146b cells sorted to a predominant G_0/G_1 peak, and 20% of cells sorted to the S/G₂/M peak. In contrast, PCCL3 cells transfected with empty vector (PC-CMV-Ø) were distributed 84% to the G_0/G_1 phase and 16% to the $S/G_2/M$ phase (P < 0.001). We then tested whether the ablation of TGF- β signal transduction by *miR-146b-5p* is sufficient to promote cell-cycle progression under exogenous TGF- β stimulation. As expected, PC-CMV- \emptyset cells treated with rTGF-β1 exhibited a strong response to the TGF-β inhibitory signal, characterized by cell-cycle arrest, with 85% of cells in G_0/G_1 and 15% of cells in $S/G_2/M$. In contrast, the overexpression of *miR-146b-5p* conferred resistance to the TGF-ß signal, displaying, after 12 h stimulation, 20% of cells in $S/G_2/M$ (P < 0.001). Western blot analysis confirmed that PC-CMV-146b cells did not respond to TGF-B signal, exhibiting higher Cyclin D1 levels after treatment with rTGF-β1 for 24h (Figure 6b).

PCCL3 cell growth is dependent on TSH (Fusco *et al.*, 1987). The overexpression of *miR-146b-5p* reversed the cell-cycle arrest mediated by TSH deprivation, with 31% of cells in the S/G₂/M phase vs 22% of PC-CMV- \emptyset cells in S/G₂/M (Figure 6c).





Figure 6 *MiR-146b-5p* promotes cell-cycle progression in PCCL3 cells. (a) Rat follicular PC-CMV-Ø and -146b cells were grown in the absence of FBS and TSH for synchronization of cells in the G₀/G₁ phase. After 24h, the culture medium was replaced by FBS plus TSH, with (rTGF-β1) or without rTGF-β1. Cells were collected 0, 3, 6, and 12h after replacement of medium and were fixed, RNase treated, and stained with PI for cell-cycle analysis. Left, histograms representing the cell cycle at time 12h. Right, percentage of cells in S/G₂/M. (Ø) PC-CMV-Ø cells, (Ø +rTGFβ1) PC-CMV-Ø cells plus rTGF-β1 (1 ng/ml), (miR-146b) PC-CMV-146b cells, (miR-146b+rTGFβ1) PC-CMV-146b cells plus rTGF-β1 (1 ng/ml). (b) For PAGE analysis, 30 µg of total protein extracts per sample from PC-CMV-Ø (Ø) and PC-CMV-146b (miR-146b) treated or not with rTGF-β1 (1 ng/ml) for 12h was used for immunoblotting. The blot was incubated with specific antibody against Cyclin D1. Incubation of the blot with specific antibody against α-Tubulin was used for normalization. (c) PC-CMV-Ø and -146b cells were grown in the absence of FBS and TSH for synchronization of cells in the G₀/G₁ phase. After 24h, the culture medium was replaced by FBS with (TSH(+)) or without (TSH(-)) TSH. Cells were collected 72 h after replacement of medium and were fixed, RNase treated, and stained with PI for cell-cycle analysis. Histograms display cell count in *y* axis and PI fluorescence in *x* axis. The data shown are representative of three independent experiments performed in duplicates. Two-way ANOVA test: Ø vs Ø + TGF-β P<0.001; Ø vs miR-146b P<0.001; Ø + TGF-β vs miR-146b + TGF-β P<0.001.

Flow cytometry analysis revealed no significant changes in the response to TGF- β -mediated apoptosis by overexpression or suppression of *miR-146b-5p* in PC-CMV-146b and TPC-1 cells, respectively (Figures 7a and b). We then investigated if cell-cycle deregulation caused by miR-146b-5p-mediated disruption of the TGF- β pathway could interfere with cell growth potential. PC-CMV-146b cells displayed significantly higher proliferation rates when compared with PC-CMV- \emptyset cells (Figure 7c). Importantly, miR-146b-5p overexpression also promoted cell proliferation

in the absence of TSH stimulation. In contrast, TPC-1 and BCPAP cells transfected with anti-miR-146b exhibited significantly decreased cell growth after 48 h (Figure 7c).

Taken together, these results suggest that modulation of the TGF- β signaling pathway by *miR-146b-5p* overexpression is sufficient to generate a TGF- β -resistant



Oncogene

npg 8
phenotype in thyroid follicular cells that promotes tumor cell proliferation.

Discussion

The overexpression of miR-146b-5p has been observed frequently in PTCs (Pallante *et al.*, 2010). To date, however, the relationship between miR-146b-5p and papillary carcinoma was not fully understood. Our results suggest an oncogenic role for miR-146b-5p in normal and tumoral thyroid cells, as a negative regulator of the TGF- β signaling pathway.

Thyroid gland growth is stimulated mainly by TSH, via TSH receptor (TSHR)-mediated increases in cAMP and subsequent activation of the PKA pathway (Garcia-Jimenez and Santisteban, 2007). Although normal thyrocyte growth is tightly controlled by TGF-β (Taton et al., 1993) the overexpression of miR-146b-5p in PC-CMV-146b cells increased TSH-independent cell growth and generated a TGF-\beta-resistant phenotype. Therefore, miR-146b-5p may confer enhanced replicative potential to thyroid tumor cells through the ablation of TGF- β autocrine and paracrine loops. Moreover, alterations in the MAPK cascade resulting from RET/PTC rearrangements or RAS- or BRAF-activating point mutations are present in >70% of PTCs (Adeniran *et al.*, 2006). As we observed, the induction of the oncogenes RET/PTC3 and BRAF^{V600E} in PCCL3 cells led to the upregulation of miR-146b-5p (Figure 1). Therefore, in thyroid tumors, the activated MAPK cascade confers positive growth advantages not only by increasing the cell proliferation rate, but also by indirectly inhibiting the TGF- β antiproliferative signal via upregulation of miR-146b-5p. To our knowledge, this is the first functional demonstration of the importance of the MAPK pathway in the induction of *miR-146b-5p* expression in thyroid cells. A computational analysis of the promoter region of miR-146b using TFSEARCH program (Heinemeyer et al., 1998) revealed specific sequence motifs for NFkB and MAPK signaling-related transcription factors (for example, c-ETS and AP-1), suggesting a potential direct and indirect regulation by MAPK pathway. In fact, it has been reported that both miR-146a/b genes are transcriptionally regulated by NFkB in innate and acquired immune responses (Taganov et al., 2006). In thyroid cancer cells, NFkB signaling is activated by the BRAF^{V600E} mutation to increase invasiveness and promotes tumor growth and resistance to chemotherapy via the upregulation of *miR-146a* (Palona *et al.*, 2006; Pacifico *et al.*, 2010).

Notably, *miR-146b-5p* upregulation is not observed in other tumors. In glioma cell lines, hormone-refractory prostate tumors, and metastatic breast cancer cell lines, *miR-146b-5p* is reported to be downregulated, acting as a tumor suppressor gene (Bhaumik et al., 2008; Hurst et al., 2009; Xia et al., 2009). These contrasting roles may be explained by the differences regarding the targets repressed by miR-146b-5p in each tissue. miR-146b-5p may be associated with a complex network of gene expression regulation that could be tissue and stage dependent, targeting different mRNA species in each circumstance. Similarly, the TGF-ß pathway has contrasting roles in cancer, acting as a tumor suppressor in epithelial-derived tumors and as a tumor-promoter factor in mesenchyme-derived tumors and epitheliumderived tumors undergoing epithelial-to-mesenchymal transition (Massague, 2008). The modulation of the TGF- β pathway by *miR-146b-5p* could be, therefore, a unique event in thyroid tissue.

The TGF- β signaling pathway strongly inhibits cell growth in epithelial cells mainly by downregulating the protooncogene *MYC* and upregulating cyclindependent kinase inhibitor *CDKN1A* (Siegel and Massague, 2003; Pei and Xiong, 2005). The proliferative potential of tumor cells depends on their ability to disrupt TGF- β signal transduction and bypass TGF- β mediated cell-cycle arrest. Overexpression of *miR-146b*-*5p* in PC-146b cells was associated with increased expression of *c-Myc*, whereas the inhibition of *miR-146b-5p* in TPC-1 increased *CDKN1A* expression. Moreover, the overexpression of *miR-146b-5p* in PC-CMV-146b cells reversed TGF- β -mediated cell-cycle arrest, indicating impairment of the TGF- β antiproliferative signal.

TGF-β is also an important regulator of thyrocyte differentiation (Taton *et al.*, 1993) by negatively regulating the sodium/iodine symporter (*NIS*) (Kawaguchi *et al.*, 1997), *TSHR* (Morris *et al.*, 1988), thyroperoxidase (*TPO*) (Franzen *et al.*, 1999), and thyroglobulin (*TG*) (Nicolussi *et al.*, 2003). This control is driven by TGF-β through the SMAD-mediated transcriptional inhibition of the transcription factors *PAX-8* and *TITF-1* (Nicolussi *et al.*, 2003; Costamagna *et al.*, 2004). Accordingly, *NIS*, *TPO*, *TG*, and *TSHR* were upregulated in response to overexpression of *miR-146b-5p* in PC-146b cells. However, the overexpression of *miR-146b-5p* was not sufficient to induce detectable changes

⁻

Figure 7 Influence of *miR-146b-5p* on cell growth and death. (a) The rat follicular cell lines PC-CMV- \emptyset and PC-CMV-146b were grown in the presence (rTGF- β 1) or absence of rTGF- β 1 (1 ng/ml) for 24 h. (b) Human TPC-1 cells, 24 h after transfection of anti-miR-146b, were treated or not with rTGF- β 1 (1 ng/ml) for another 24 h. (a, b) Cells were trypsinized, incubated with the FITC-Annexin-V antibody and stained with PI for apoptosis analysis. Left, dot plots display PI fluorescence in *y* axis and FITC fluorescence in *x* axis. Percentage of apoptotic cells is shown in the upper and lower right quadrants. The data shown are representative of two independent experiments. Right, graphs show mean of two independent experiments. (c) PC-CMV- \emptyset and PC-CMV-146b cells were grown in the presence or absence of TSH (no TSH). At days +1, +3, +5, +7, and +9, cells were trypsinized and cell numbers were estimated by counting with a hemocytometer. TPC-1 and BCPAP cells were transfected with anti-miR-146b (anti-146b) or control (mock), and after 24, 48, and 72 h, cells were trypsinized and counted. The data shown are representative of two independent experiments performed in triplicates. Bars represent s.d. **P*<0.05; ***P*<0.01.

in NIS protein levels in PC-146b cells, maybe due to NIS protein half-life, estimated in 5 days (Paire *et al.*, 1997). In contrast, in TPC-1 cells, suppression of *miR*-146b-5p decreased TG mRNA levels, although NIS, TPO, and TSHR were undetectable. Interestingly, the induction of the *BRAF*^{V600E} mutation in PCCL3 cells represses NIS in a TGF- β -dependent manner (Riesco-Eizaguirre *et al.*, 2009), indicating that the TGF- β pathway may have a dual role in regulation of thyroid differentiation.

Genetic alterations in the SMAD4 gene have been reported in pancreatic and gastro-intestinal tract carcinomas (Yang and Yang, 2010). Although it is believed that loss of SMAD4 is not a critical step for cancer initiation, tumor cells bearing other oncogenic pathways develop a more aggressive phenotype in the absence of this molecule. In thyroid tumors, alternative splicing and inactivating mutations combine to decrease SMAD4 gene expression (Lazzereschi et al., 2005). As we demonstrated, the inhibition of *miR-146b-5p* in the papillary carcinoma cell line, TPC-1, led to enhanced SMAD4 levels and decreased cell proliferation and viability, indicating the restoration of cellular responsiveness to the TGF- β anti-proliferative signal. Recently, D'Inzeo et al. (2010) described the disruption of the TGF- β signaling pathway by ablation of SMAD4 in two papillary carcinoma cell lines, BCPAP and TPC-1. The restoration of SMAD4 levels increased the responsiveness of the TGF- β pathway, decreasing cell migration and proliferation. In this context, elevated expression of miR-146b-5p could be a key factor in thyroid cancer progression, decreasing SMAD4 levels to overcome the TGF- β inhibitory signal.

We have previously shown that SMAD4 may be present in thyroid tumors (Matsuo et al., 2010), suggesting that other factors may be involved in thyroid tumorigenesis. Because the overexpression of inhibitory SMAD7 (SMAD7) has been reported in thyroid tumor samples and cell lines (Cerutti et al., 2003; Matsuo et al., 2010), regulation of the TGF- β pathway by SMAD7 and other regulatory proteins may also take part in the refractoriness to the TGF- β signal by thyroid tumor cells. Furthermore, crosstalk between the TGF- β signaling pathway and several other cancer-related pathways may contribute to the disruption of the TGF- β signal (Ellenrieder, 2008). It is important to note that TGF- β signal transduction can also be driven via a non-SMAD pathway (Moustakas and Heldin, 2005).

The human *miR-146* family comprises two miRNA genes located on different chromosomes: *miR-146a* at 5q34, and *miR-146b* at 10q24.32. Both isoforms have been described as deregulated in tumors. Recently, in an acute promyelocytic leukemia model, luciferase experiments revealed that *miR-146a* negatively regulates *SMAD4* by binding to its 3'UTR (Zhong *et al.*, 2010). However, in PTCs, the *miR-146b*, rather than *miR-146a*, is predominantly deregulated.

This study highlights the functionality of miR-146bin thyroid gland oncogenesis. The disruption of TGF- β signal transduction caused by overexpression of miR-146b may be a relevant step for thyroid tumor cells, contributing to PTC establishment and progression. Our findings improve the understanding of the role of miRNAs in the regulation of the TGF- β signaling pathway and shed light on the molecular events related to PTC development.

Materials and methods

DNA constructs

The oligonucleotides Smad4-Fw-wt and Smad4-Rev-wt were annealed to form a segment containing the miR-146b-5p binding site on SMAD4 3'UTR predicted by Targetscan program (http://www.targetscan.org), flanked by XhoI and XbaI restriction enzymes sites (Supplementary Table 1). The miR-146b-5p binding site with a mutated seed region was formed by annealing of Smad4-Fw-Mut and Smad4-Rev-Mut oligonucleotides. The segments were cloned downstream of the luciferase reporter gene in pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega, Madison, WI, USA) generating the plasmids pmiRGlo-SMAD4-3'UTR-wt and -Mut. The plasmids pcDNA3.1-miR-146b and -miR-21, harboring the genomic region of miR-146b-5p and miR-21, were kindly provided by Dr Konstantin D Taganov (California Institute of Technology, Pasadena, CA, USA). This plasmid pcDNA3.1-miR146b was double digested, and the insert was subsequently cloned in vector pUHG10.3 under the control of a tetracycline-responsive promoter, generating plasmid pUHG-146b. This construct was sequenced to confirm the presence of correctly oriented miR-146b-5p. The plasmid p3TP-Lux was kindly donated by Dr Joan Massagué (Cancer Biology and Genetics Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY, USA).

Cell lines and transfections

PCCL3, PCCL3-rtTA, PTC3-5, TPC-1, and ARO cell lines were kindly provided by Dr James A Fagin (Human Oncology and Pathogenesis Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY, USA). BCPAP cells were kindly provided by Dr Massimo Santoro (Medical School, University 'Federico II' of Naples, Naples, Italy). PTC3-5 and PC-BRAF cell lines were derived from PCCL3-rtTA cells (Saavedra et al., 2000) and conditionally express RET/PTC3 and BRAFV600E oncogenes, respectively (Wang et al., 2003; Ricarte-Filho et al., 2009). All cell lines were maintained as described previously (Ricarte-Filho et al., 2009). Plasmid pUHG-146b was transfected into PCCL3-rtTA cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions, to generate the PC-146b cell line. miR-146b-5p expression was induced with the addition of 1µg/ml doxycycline (CalBiochem, San Diego, CA, USA), a tetracycline analog, to the culture medium for 72 h. Plasmid pcDNA3.1-miR-146b was transfected to PCCL3 cells to generate the PC-CMV-146b cell line. Empty pcDNA3.1 vector was transfected as control (PC-CMV-Ø). TPC-1 and BCPAP are human papillary carcinoma cell lines that spontaneously harbor the RET/PTC1 rearrangement (Jhiang et al., 1992) and BRAFV600E oncogene (Fabien et al., 1994), respectively. To inhibit miR-146b-5p expression in the TPC-1 and BCPAP cell lines, anti-miR-146b (Anti-miRmiRNA Inhibitor, hsa-miR-146b-5p, AM10105, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was transfected at 10-25 nm concentrations using Lipofectamine 2000. TPC-1 or BCPAP cells incubated with transfection reagent alone or transfected

10

with a commercially available negative control (anti-miR-1, AM17010; Applied Biosystems) were used as the reference (mock) and negative control (negative), respectively.

Luciferase reporter assays

ARO or TPC-1 cells were seeded in 12-well plates at density of 5×10^4 cells/well. After 24 h, ARO cells were transfected with the plasmids pmiRGlo-SMAD4-3'UTR-wt or -Mut, and pcDNA-miR-146b. The co-transfections of anti-miR-146b or the plasmid pcDNA-miR-21 were used as control. For the quantification of TGF- β pathway activity, TPC-1 cells were transfected with plasmid p3TP-Lux alone or in combination with anti-miR-146b. After 24 h, the cells were treated or not with rTGF- β 1. In both assays, the cells were washed 48 h after transfection, lysed and the luciferase activity was accessed using DualGlo Luciferase Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions.

Treatment with recombinant TGF-\$1

Recombinant TGF- β 1 (rTGF- β 1, Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) was added to culture medium at concentration 1 ng/ml. rTGF- β 1 was added 72h after induction of *miR-146b-5p* (PC-146b) or transfection with anti-miR-146b (TPC-1), and total RNA was extracted 3h after for gene expression analysis or 24h after for MTT cell proliferation assay and 1h for immunofluorescence assay. For cell-cycle and death analysis, rTGF- β 1 was added to culture 24h after seeding.

Gene expression analysis

Total RNA was phenol-chloroform-extracted from cell lines PTC3-5, PC-BRAF, PC-146b, TPC-1, and BCPAP using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. For miRNA expression analysis, 10 ng of total RNA was reverse transcribed using a TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) and RT primers provided with the miR-146b-5p Taqman miRNA Assay (PN4373178; Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. miR-146b-5p expression was detected from the cDNA product, using TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG (Applied Biosystems) and the Taqman MiRNA Assay. The expression of passenger strand of *miR-146b*, *miR-146b-3p*, was not analyzed. Small nucleolar RNA, snoRNA (PN4427975; Applied Biosystems) and RNA, U6 small nuclear 2 (RNU6B) (PN4427975, Applied Biosystems) were used for the normalization of rat and human miRNA input, respectively. For mRNA expression analysis, 1 µg of total RNA was reverse transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol, and PCR products were amplified from the cDNA using 1× SYBR Green Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and specific primers. Ribosomal protein L19 (RPL19) was used as an endogenous control for mRNA normalization. Amplification and detection were performed using an ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). MiRNA and mRNA relative quantifications were calculated based on the data generated by Sequence Detection System (Applied Biosystems) according to the Pfaffl method (Pfaffl, 2001). Primers used in qPCR experiments are listed in Supplementary Table 2.

Protein expression analysis

PC-146b, PC-CMV-Ø, -146b, TPC-1, and BCPAP cells were seeded at density of 1×10^6 cells/plate, trypsinized and lysed in the presence of a 10-µl cocktail of protease inhibitors. Nuclear and cytoplasmic fractions were isolated with a ProteoJET

Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) according to the manufacturer's instructions. Total protein (30-40 µg) or proteins from the nuclear/cytoplasmic fraction (15 µg) were separated by 10% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and then transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond-ECL, GE HealthCare, Buckinghamshire, England). Membranes were incubated with monoclonal anti-SMAD4 antibody (sc-7966) or CYCLIN D1 (sc-753) from Santa Cruz BioTechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA), and anti-NIS antibody, and visualized using an Enhanced ChemoLuminescence kit (ECL, GE HealthCare) according to the manufacturer's instructions. The monoclonal anti- α -tubulin (sc-5286) and polyclonal anti-LAMIN A (sc-20680) antibodies (Santa Cruz BioTechnology) were used to normalize the protein input and as a control of fraction separation.

Immunofluorescence

TPC-1 cells were plated onto glass coverslips in 6-well plates at densities of 3×10^4 cells/well and were transfected 24h later with anti-miR-146b. After treatment with rTGF- β 1, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline, and permeabilized with 0.1% Triton X-100. Cells subsequently were incubated with anti-Smad4 antibody (diluted 1:100) followed by conjugation with Alexa-Fluor 588-anti-mouse IgG (diluted 1:400, Invitrogen). Nuclei were RNase treated and stained with 20µg/ml propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Fluorescence was observed using a Nikon Eclipse TE300 Confocal Laser Microscope (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) and imaged at ×60 optical magnification.

Cell-cycle analysis

PC-CMV- \varnothing and PC-CMV-146b cells were plated in 6-well plates at densities of 5×10^5 cells/well. After 24 h, the complete media were replaced with media lacking fetal bovine serum (FBS) and TSH for synchronization in the G₀/G₁ phase. After 24 h, FBS and TSH were added to the cultures to promote cell-cycle reentry, and the TGF- β -treated group was stimulated. A separate subset of cells (denoted TSH(–)) was maintained without TSH. Cells were collected at times 0, 3, 6 and 12 h for cell-cycle analysis by flow cytometry. Cells were washed, fixed in ice-cold 75% ethanol in phosphate-buffered saline, counted, treated with 20 µg/ml RNase, and stained with PI. Cell-cycle reentry was measured by flow cytometry using a Guava EasyCyte Mini System (Guava Technologies, Billerica, MA, USA). Data were gated using width and pulse area to exclude doublets.

Cell death analysis

PC-CMV- \emptyset , PC-CMV-146b, and TPC-1 cells were seeded in 6-well plates at densities of 5×10^{5} cells/well. TPC-1 cells were transfected with anti-miR-146b or transfection reagent alone (mock). After 24h of transfection (TPC-1 cells) or seeding (PC-CMV cells), the culture was treated or not with rTGF- β 1. After 24h of treatment, cells were collected by trypsinization and cell death was analyzed using Annexin-V FITC Kit (Invitrogen) according to the manufacturer instructions.

Cell proliferation assays

For PC-CMV- \varnothing , -146b, TPC-1, and BCPAP cell counting, 5 × 10⁴ cells/well were seeded into 6-well plates. TPC-1 and BCPAP cells were transfected with anti-miR-146b or transfection reagent alone (mock). Cells were counted at indicated times using a hemacytometer, and the average cell number from triplicate measurements was determined. For the MTT assay, 3×10^4 cells/well were seeded in quintuplicates in 96-well plates. After 24 h, 0.125 mg/ml MTT (Amresco, Solon, OH, USA) was added to the culture. The medium was removed after 3 h, and the cells were solubilized in 100 µl of 0.04 M HCl in isopropanol and measured at A_{595} in a spectrophotometer (Spectra Max Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Statistical analysis

The results of proliferation assays and qPCR are presented as the mean \pm s.d. Data were submitted to Student's *t*-tests to compare results between two groups or to twoway ANOVA, followed by Bonferroni tests, for multiple comparisons (GraphPad Prism Software version 5.00, San Diego, CA, USA). Differences were considered significant at P < 0.05.

References

- Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ et al. (2006). Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. Am J Surg Pathol 30: 216–222.
- Bartel DP. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116: 281–297.
- Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J, Benz CC. (2008). Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene* 27: 5643–5647.
- Cahill S, Smyth P, Finn SP, Denning K, Flavin R, O'Regan EM et al. (2006). Effect of ret/PTC 1 rearrangement on transcription and post-transcriptional regulation in a papillary thyroid carcinoma model. *Mol Cancer* 5: 70.
- Calin GA, Croce CM. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6: 857–866.
- Cerutti JM, Ebina KN, Matsuo SE, Martins L, Maciel RM, Kimura ET. (2003). Expression of Smad4 and Smad7 in human thyroid follicular carcinoma cell lines. J Endocrinol Invest 26: 516–521.
- Chou CK, Chen RF, Chou FF, Chang HW, Chen YJ, Lee YF et al. (2010). miR-146b is highly expressed in adult papillary thyroid carcinomas with high risk features including extrathyroidal invasion and the BRAF(V600E) mutation. *Thyroid* 20: 489–494.
- Costamagna E, Garcia B, Santisteban P. (2004). The functional interaction between the paired domain transcription factor Pax8 and Smad3 is involved in transforming growth factor-beta repression of the sodium/iodide symporter gene. *J Biol Chem* 279: 3439–3446.
- D'Inzeo S, Nicolussi A, Ricci A, Mancini P, Porcellini A, Nardi F et al. (2010). Role of reduced expression of SMAD4 in papillary thyroid carcinoma. J Mol Endocrinol 45: 229–244.
- Dykxhoorn DM. (2010). MicroRNAs and metastasis: little RNAs go a long way. *Cancer Res* 70: 6401–6406.
- Ellenrieder V. (2008). TGFbeta regulated gene expression by Smads and Sp1/KLF-like transcription factors in cancer. *Anticancer Res* 28: 1531–1539.
- Ermak G, Cancasci VJ, Davies KJ. (2003). Cytotoxic effect of doxycycline and its implications for tet-on gene expression systems. *Anal Biochem* 318: 152–154.
- Fabien N, Fusco A, Santoro M, Barbier Y, Dubois PM, Paulin C (1994). Description of a human papillary thyroid carcinoma cell line. Morphologic study and expression of tumoral markers. *Cancer* 73: 2206–2212.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Dr Konstantin D Taganov for donation of pcDNA3.1-miR-146b plasmid, Dr Joan Massagué for donation of p3TP-Lux plasmid, Dr Nancy Carrasco for donation of anti-NIS antibody, Dr Massimo Santoro for BCPAP, and Dr James A Fagin for PCCL3, PCCL3-rtTA, PTC3-5, TPC-1, and ARO cell lines used in this study. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

- Fagin JA. (2002). Minireview: branded from the start-distinct oncogenic initiating events may determine tumor fate in the thyroid. *Mol Endocrinol* 16: 903–911.
- Franzen A, Piek E, Westermark B, ten Dijke P, Heldin NE. (1999). Expression of transforming growth factor-beta1, activin A, and their receptors in thyroid follicle cells: negative regulation of thyrocyte growth and function. *Endocrinology* 140: 4300–4310.
- Fusco A, Berlingieri MT, Di Fiore PP, Portella G, Grieco M, Vecchio G. (1987). One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol Cell Biol* 7: 3365–3370.
- Garcia-Jimenez C, Santisteban P. (2007). TSH signalling and cancer. Arq Bras Endocrinol Metabol 51: 654–671.
- He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S et al. (2005). The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 19075–19080.
- Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV et al. (1998). Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. Nucleic Acids Res 26: 362–367.
- Heldin CH, Landstrom M, Moustakas A. (2009). Mechanism of TGFbeta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* 21: 166–176.
- Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, Benz CC, Vaidya KS, Welch DR. (2009). Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Res* 69: 1279–1283.
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. (2010). Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin 60: 277–300.
- Jhiang SM, Caruso DR, Gilmore E, Ishizaka Y, Tahira T, Nagao M et al. (1992). Detection of the PTC/retTPC oncogene in human thyroid cancers. Oncogene 7: 1331–1337.
- Kawaguchi A, Ikeda M, Endo T, Kogai T, Miyazaki A, Onaya T. (1997). Transforming growth factor-betal suppresses thyrotropininduced Na +/I- symporter messenger RNA and protein levels in FRTL-5 rat thyroid cells. *Thyroid* 7: 789–794.
- Kimura ET, Kopp P, Zbaeren J, Asmis LM, Ruchti C, Maciel RM *et al.* (1999). Expression of transforming growth factor beta1, beta2, and beta3 in multinodular goiters and differentiated thyroid carcinomas: a comparative study. *Thyroid* **9**: 119–125.
- Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. (2003). High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 63: 1454–1457.
- Lazzereschi D, Nardi F, Turco A, Ottini L, D'Amico C, Mariani-Costantini R et al. (2005). A complex pattern of mutations and

12

Oncogene

abnormal splicing of Smad4 is present in thyroid tumours. *Oncogene* **24**: 5344–5354.

Massague J. (1998). TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem 67: 753-791.

Massague J. (2008). TGFbeta in cancer. Cell 134: 215-230.

- Matsuo SE, Fiore AP, Siguematu SM, Ebina KN, Friguglietti CU, Ferro MC et al. (2010). Expression of SMAD proteins, TGF-beta/ activin signaling mediators, in human thyroid tissues. Arq Bras Endocrinol Metabol 54: 406–412.
- Matsuo SE, Leoni SG, Colquhoun A, Kimura ET. (2006). Transforming growth factor-beta1 and activin A generate antiproliferative signaling in thyroid cancer cells. J Endocrinol 190: 141–150.
- Morris III JC, Ranganathan G, Hay ID, Nelson RE, Jiang NS. (1988). The effects of transforming growth factor-beta on growth and differentiation of the continuous rat thyroid follicular cell line, FRTL-5. *Endocrinology* 123: 1385–1394.
- Moustakas A, Heldin CH. (2005). Non-Smad TGF-beta signals. J Cell Sci 118: 3573–3584.
- Nicolussi A, D'Inzeo S, Santulli M, Colletta G, Coppa A. (2003). TGF-beta control of rat thyroid follicular cells differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 207: 1–11.
- Nikiforova MN, Chiosea SI, Nikiforov YE. (2009). MicroRNA expression profiles in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 20: 85–91.
- Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. (2008). MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. J Clin Endocrinol Metab 93: 1600–1608.
- Pacifico F, Crescenzi E, Mellone S, Iannetti A, Porrino N, Liguoro D et al. (2010). Nuclear factor-\{kappa\}B contributes to anaplastic thyroid carcinomas through up-regulation of. J Clin Endocrinol Metab 95: 1421–1430.
- Paire A, Bernier-Valentin F, Selmi-Ruby S, Rousset B. (1997). Characterization of the rat thyroid iodide transporter using antipeptide antibodies. Relationship between its expression and activity. *J Biol Chem* 272: 18245–18249.
- Pallante P, Visone R, Croce CM, Fusco A. (2010). Deregulation of microRNA expression in follicular-cell-derived human thyroid carcinomas. *Endocr Relat Cancer* 17: F91–104.
- Palona I, Namba H, Mitsutake N, Starenki D, Podtcheko A, Sedliarou I et al. (2006). BRAFV600E promotes invasiveness of thyroid cancer cells through nuclear factor kappaB activation. Endocrino logy 147: 5699–5707.

- Pei XH, Xiong Y. (2005). Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene* 24: 2787–2795.
- Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
- Ricarte-Filho JC, Fuziwara CS, Yamashita AS, Rezende E, da-Silva MJ, Kimura ET. (2009). Effects of let-7 microRNA on cell growth and differentiation of papillary thyroid cancer. *Transl Oncol* 2: 236–241.
- Riesco-Eizaguirre G, Rodriguez I, De la Vieja A, Costamagna E, Carrasco N, Nistal M *et al.* (2009). The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer Res* 69: 8317–8325.
- Saavedra HI, Knauf JA, Shirokawa JM, Wang J, Ouyang B, Elisei R et al. (2000). The RAS oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the MAPK pathway. Oncogene 19: 3948–3954.
- Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Fusco A, Vecchio G. (2002). Molecular mechanisms of RET activation in human cancer. Ann NY Acad Sci 963: 116–121.
- Siegel PM, Massague J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. Nat Rev Cancer 3: 807–821.
- Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. (2006). NFkappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl* Acad Sci USA 103: 12481–12486.
- Taton M, Lamy F, Roger PP, Dumont JE. (1993). General inhibition by transforming growth factor beta 1 of thyrotropin and cAMP responses in human thyroid cells in primary culture. *Mol Cell Endocrinol* 95: 13–21.
- Wang J, Knauf JA, Basu S, Puxeddu E, Kuroda H, Santoro M et al. (2003). Conditional expression of RET/PTC induces a weak oncogenic drive in thyroid PCCL3 cells and inhibits thyrotropin action at multiple levels. *Mol Endocrinol* 17: 1425–1436.
- Xia H, Qi Y, Ng SS, Chen X, Li D, Chen S et al. (2009). microRNA-146b inhibits glioma cell migration and invasion by targeting MMPs. Brain Res 1269: 158–165.
- Yang G, Yang X. (2010). Smad4-mediated TGF-beta signaling in tumorigenesis. Int J Biol Sci 6: 1-8.
- Zhong H, Wang HR, Yang S, Zhong JH, Wang T, Wang C et al. (2010). Targeting Smad4 links microRNA-146a to the TGF-beta pathway during retinoid acid induction in acute promyelocytic leukemia cell line. Int J Hematol 92: 129–135.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (http://www.nature.com/onc)

13