ADRIANA SONDERMANN DE AFONSECA

**Identificação de microRNAs associados com
recidiva em carcinoma papilífero da tireoide**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Lenine Garcia Brandão

Coorientadora: Prof^a Dra. Patrícia Severino

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Afonseca, Adriana Sondermann de
Identificação de microRNAs associados com recidiva em carcinoma
papilífero da tireoide / Adriana Sondermann de Afonseca. -- São Paulo,
2015. USP/FM/DBD-031/15
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Clínica Cirúrgica.
Orientador: Lenine Garcia Brandão.
Coorientadora: Patrícia Severino

Descritores: 1.Glândula tireoide 2.Carcinoma papilar 3.Neoplasias da
glândula tireoide 4.MicroRNAs 5.Recidiva 6.Metástase neoplásica

"O que descobrimos muda quem somos."

Peter Morville

Aos meus pais,
que me fizeram ser o que hoje sou.

Ao meu marido,
pelo amor e pela paciência incondicionais

Aos meus filhos,
que me estimulam na busca diária por respostas

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Lenine Brandão, por todos estes anos de confiança e exemplo de dedicação à Medicina. Sem sua insistência este trabalho não teria tido início.

À minha Coorientadora, Prof^a. Dra. Patrícia Severino, por me apresentar ao fascinante universo dos microRNAs, instigando minha curiosidade e meu desejo de estudá-los, vindo a se tornar uma grande amiga. Seu rigor técnico e conhecimento científico foram de inestimável valor.

Ao meu marido e companheiro de longa data, Cesar de Afonseca e Silva Neto, por suportar sempre com compreensão os momentos de minha ausência. Sua determinação, motivo de meu orgulho, foi o exemplo que segui.

À bióloga Flávia Maziero Andreghetto, pela ajuda sem a qual a confecção dos experimentos não seria possível. Por seu carinho, por sua dedicação e principalmente, por sua disposição em dividir comigo seus conhecimentos.

À bióloga Ana Carolina Bernardini Moulatlet, pela assessoria e precisa orientação durante a confecção das lâminas e realização dos experimentos.

À equipe de orientandos da Profa. Dra. Patrícia Severino, em especial a Jean Parpinelli, por sua ajuda e companheirismo.

À Dra. Marília Germanos de Castro, amiga e patologista do Laboratório de Patologia do Hospital Sírio Libanês e da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pelas inúmeras horas de dedicação à revisão anatomopatológica dos casos, bem como incontáveis e frutíferas discussões.

Ao Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes, do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na revisão anatomopatológica.

Ao laboratório de biologia molecular do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Albert Einstein e seus técnicos, por viabilizar a realização deste estudo.

Ao Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia do Hospital Israelita Albert Einstein, por possibilitar a confecção das lâminas para este estudo. À sua equipe técnica, pela gentil disponibilidade e atenção.

Aos Laboratórios de Anatomia Patológica APC, Diagnóstika, CICAP, Mattosinho, do Hospital Israelita Albert Einstein, do Hospital Sírio Libanês e do Instituto do Coração – INCOR, por armazenarem e disponibilizarem os blocos de parafina indispensáveis para esta análise.

À estatística Elivane da Silva Victor, por sua impecável análise estatística.

À secretaria do programa de pós-graduação em Clínica Cirúrgica, Sra. Eliane Falconi Monico Gazetto, por seu suporte.

À Richards do Brasil, em especial à Sra. Luciana Machado Nogueira e ao Sr. Ricardo Machado, por sua colaboração na fase inicial de desenvolvimento do projeto de pesquisa deste trabalho.

À Dra. Beatriz Godoi Cavalheiro, cirurgiã de Cabeça e Pescoço, colega e amiga, pelas sugestões e pelo apoio durante a confecção desta tese.

Ao amigo Izar Tarandach, por seus conselhos e incentivo.

Aos meus familiares, meus colegas Cirurgiões de Cabeça e Pescoço e meus amigos, agradeço o apoio recebido ao longo destes anos.

Àqueles que, de alguma forma, tenham contribuído direta ou indiretamente para a elaboração deste trabalho e que, por involuntária omissão, não foram aqui lembrados, meu sincero agradecimento.

E sobretudo aos pacientes, incluídos ou não neste estudo, razão de nossa busca incessante pela cura, meu respeito e gratidão.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e documentação. "Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias". Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a. ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Carcinoma da glândula tireoide	2
1.1.1	Carcinoma papilífero da glândula tireoide	3
1.1.2	Sistemas de classificação e estadiamento do carcinoma da tireoide	3
1.1.3	Metástases linfonodais e recidiva em carcinoma papilífero da tireoide	6
1.1.4	Mecanismos moleculares da metástase e recidiva em carcinoma da tireoide	8
1.2	MicroRNAs	10
1.2.1	Biogênese dos microRNAs	11
1.2.2	Mecanismos de ação dos microRNAs	13
1.2.3	MicroRNAs e câncer	14
1.2.4	MicroRNAs, metástase e recidiva tumoral	17
1.2.4.1	MiR-10b, metástase e recidiva tumoral	21
1.2.4.2	MiR-21, metástase e recidiva tumoral	23
1.2.4.3	MiR-9, metástase e recidiva tumoral	24

1.2.4.4	MiR-146b, metástase e recidiva tumoral	25
2	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo geral	29
2.2	Objetivos específicos	29
3	MÉTODOS	30
3.1	Ética	31
3.2	Casuística	31
3.3	Método	34
3.3.1	Revisão de prontuários dos indivíduos tratados	34
3.3.2	Revisão anatomopatológica	36
3.3.3	Macrodissecção das amostras e purificação do RNA	37
3.3.4	Síntese de cDNA e PCR em tempo real para detecção de microRNAs	38
3.4	Análise estatística	40
4	RESULTADOS	42
4.1	Caracterização clínico-patológica dos pacientes estudados	43
4.2	Associação das características clínicas e patológicas com recidiva de carcinoma papilífero da tireoide	45
4.3	Associação entre expressão de miR-9, miR-10b, miR-21 e miR-146b e recidiva de carcinoma papilífero da tireoide	50
5	DISCUSSÃO	56
6	CONCLUSÕES	69

7	ANEXOS	71
8	REFERÊNCIAS	81
Apêndices		

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'-UTR	do inglês 3' <i>untranslated region</i> (região 3' não-traduzida)
A	absorbância
AGES	do inglês <i>Age, Grade of tumor, Extrathyroidal extension, Size of the tumor</i> (Idade, Grau do tumor, Extensão extra-tireóidea, Tamanho do tumor) - Sistema AGES de Estadiamento de Carcinoma Papilífero da Tireoide
AKT	do inglês <i>protein kinase B</i> (proteína kinase B)
AMES	<i>Age, distant Metastasis, Extrathyroidal extension, Size of the tumor</i> (Idade, Metástase a distância, Extensão extra-tireóidea, Tamanho do tumor) - Sistema AMES de Estadiamento de Câncer Bem Diferenciado da Tireoide
ATA	do inglês <i>American Thyroid Association</i> (Associação Americana da Tireoide)
AUF1	do inglês <i>AU-Rich element RNA-binding protein 1</i> (proteína ligadora de elementos ricos em adenilato e uridilato no RNA1)
<i>BIM</i>	do inglês <i>bcl-2 interacting mediator of cell death</i> (mediador de morte celular que interage com Bcl-2)
<i>CADM1</i>	do inglês <i>cell adhesion molecule 1</i> (molécula de adesão celular 1)
CAT	carcinoma anaplásico de tireoide
<i>CDH1</i>	do inglês <i>cadherin 1</i> (caderina 1)
cDNA	DNA complementar
CFT	carcinoma folicular da tireoide

cN0	ausência de metástases linfonodais cervicais clinicamente aparentes
CPT	carcinoma papilífero da tireoide
Ct	do inglês <i>cycle threshold</i> (ciclo limiar)
CXCR4	do inglês <i>C-X-C chemokine receptor type 4</i> (receptor de quimocina C-X-C tipo 4)
DGCR8	do inglês <i>DiGeorge syndrome chromosomal region 8</i> (região cromossômica 8 da Síndrome DiGeorge)
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	do inglês <i>deoxyribose nucleoside triphosphates</i> (desoxirribonucleosídeo trifosfato)
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
ed.	edição
EGFR	do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i> (receptor de fator de crescimento epidérmico)
EMT	do inglês <i>epithelial-mesenchymal transition</i> (transição epitélio-mesenquimal)
EORTC	do inglês <i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i> (Organização Européia para a Pesquisa e Tratamento do Câncer)
<i>et al.</i>	e colaboradores
Ets1	do inglês <i>v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1</i> (oncogene homólogo ao vírus da eritroblastose aviária v-ets 1)

FOXO1	do inglês <i>forkhead box protein O1</i> (proteína <i>forkhead</i> box O1)
HIAE	Hospital Israelita Albert Einstein
HMGA1	do inglês <i>High Mobility Group A1</i> (grupo de alta mobilidade A1)
HOXD10	do inglês <i>homeobox D10</i>
hsa	<i>Homo sapiens</i>
http	do inglês <i>hypertext transfer protocol</i> (protocolo de transferência de hipertexto)
IBCC	Instituto Brasileiro de Controle do Câncer
IC	intervalo de confiança
KLF17	do inglês <i>Kruppel-like factor 17</i> (fator Krüppel-like 17)
KLF4	do inglês <i>Krüppel-like factor 4</i> (fator Krüppel-like 4)
LMA	leucemia mielóide aguda
MACIS	do inglês <i>Metastasis, Age, Completeness of resection, Invasion, Size of the tumor</i> (Metástase, Idade, Ressecção completa da lesão, Invasão, Tamanho do tumor) - Sistema MACIS de Estadiamento de Carcinoma Papilífero da Tireoide
MARCKS	do inglês <i>myristoylated alanine-rich protein kinase c substrate</i> (substrato da proteína quinase c rico em alanina miristoilata)
Maspin	do inglês <i>mammary serine protease inhibitor</i> (protease inibidora de serina mamária)
miR	microRNA maduro
miRBase	banco de dados de microRNAs
miRNA	microRNA
MMP	metaloproteinase de matriz extracelular
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro

MSKCC-NY	do inglês <i>Memorial Sloan-Kettering Cancer Center</i> de Nova York
NF- κ B	do inglês <i>nuclear factor kappa B</i> (fator nuclear kappa B)
nt	nucleotídeos
OD	do inglês <i>optical density</i> (densidade óptica)
org.	do inglês <i>organization</i> (organização)
p.	páginas
PCI	pesquisa de corpo inteiro
PCR	do inglês <i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
<i>PDCD4</i>	do inglês <i>programmed cell death 4</i> (programação de morte celular 4)
Pol II	RNA polimerase II
p. ex.	por exemplo
pre-miRNAs	precursores de microRNA
pre-miRs	precursores de microRNA
pri-miR	transcritos primários de miRNAs
pri-miRNA	transcritos primários de miRNAs
Prof	Professor
Prof ^a	Professora
<i>PTEN</i>	do inglês <i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i> (homólogos de fosfatase e tensina deletados no cromossomo 10)
<i>RHOC</i>	do inglês <i>Ras homolog gene family, member C</i> (membro C da família de gene homólogo Ras)

RISC	do inglês <i>RNA-induced silencing complex</i> (complexo de silenciamento induzido por RNA)
RNA	ácido ribonucleico
RNAse	ribonuclease
RNU	RNA nucleolar
RR	risco relativo
RT	do inglês <i>reverse transcriptase</i> (transcriptase reversa)
RX	Raio X
siRNA	do inglês <i>small interfering RNA</i> (pequeno RNA de interferência)
STAT3	do inglês <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> (fator transdutor de sinal e ativador de transcrição 3)
T4livre	tiroxina livre
TGF- β 1	do inglês <i>Transforming growth factor beta</i> (fator de transformação do crescimento beta)
<i>TIAM1</i>	do inglês <i>T lymphoma invasion and metastasis 1</i> (gene invasão e metástase em linfoma de células T)
<i>TIMP3</i>	do inglês <i>tissue inhibitor of metalloproteinase 3</i> (inibidor de metaloproteinase em tecidos 3)
<i>TIP30</i>	do inglês <i>Tat-interacting protein 30</i> (proteína de interação Tat 30)
TNM	do inglês <i>Tumour, Node, Metastasis</i> (Tumor, Linfonodo, Metástase) - Sistema TNM de Classificação de Tumores Malignos
TPM1	do inglês <i>tropomiosina 1</i> (tropomiosina 1)
TSH	do inglês <i>thyroid-stimulating hormone</i> (hormônio estimulador da tireoide)

UHRF1	do inglês <i>ubiquitin-like PHD and RING finger domain-containing protein 1</i> (proteína semelhante à ubiquitina, que contém domínios PHD e Ring finger 1)
UICC	União Internacional Contra o Câncer
www	do inglês <i>world wide web</i> (rede de alcance mundial)
ZEB1	do inglês <i>zinc finger E-box binding homeobox 1</i> (homeobox ligadora de zinc finger E-box 1)
ZNRF3	do inglês <i>zinc and finger 3</i> (zinc e RING finger 3)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
↑	aumentada
cm	centímetros
Δ	delta
↓	diminuída
°C	grau Celsius
=	igual
>	maior
$\geq$	maior ou igual
<	menor
$\leq$	menor ou igual
μL	microlitro
μm	micrometro
mCi	millicurie
mM	milimolar
ng	nanograma
n	número de observações
p	p-valor
%	por cento
TM	trademark
U	unidade
x	vezes

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais microRNAs descritos em carcinoma papilífero de tireoide	16
Tabela 2 -	MicroRNAs associados à recidiva neoplásica e metástase em câncer	18
Tabela 3 -	Descrição das características demográficas, clínicas e histopatológicas da amostra de pacientes	47
Tabela 4 -	Análise simples, segundo modelo de riscos proporcionais de Cox, de risco de recidiva	49
Tabela 5 -	Descrição dos valores médios de ΔC_t dos miRNAs estudados (miR-9, miR-10b, miR-21 e miR-146b)	51
Tabela 6 -	Análises multivariadas entre características clínicas e patológicas e recidiva de CPT, considerando os níveis de expressão de miR-9	54
Tabela 7 -	Análises multivariadas entre características clínicas e patológicas e recidiva de CPT, considerando os níveis de expressão de miR-21	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs	12
Figura 2 -	Níveis de expressão de miR-9, miR-10b, miR-21 e miR-146b	52

RESUMO

Afonseca, AS. *Identificação de microRNAs associados com recidiva em carcinoma papilífero da tireoide* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015. 135p

O carcinoma da glândula tireoide é o câncer endócrino mais prevalente, com crescente incidência anual. Dentre as neoplasias tireóideas, o carcinoma papilífero é o mais frequente, representando 80 a 90% destes tumores. Apesar do excelente prognóstico de seus portadores e da baixa taxa de mortalidade, cerca de 5% a 20% dos indivíduos submetidos à tireoidectomia total desenvolverão recidiva regional e todavia não há consenso sobre os fatores preditivos de recidiva tumoral. MicroRNAs são pequenos RNAs endógenos, que não codificam proteínas, e que medeiam a regulação pós-transcricional da expressão gênica ligando-se seletivamente aos RNAs mensageiros por pareamento de bases. A expressão dos microRNAs de uma forma controlada exerce papel importante em múltiplos processos fisiológicos. Em contrapartida, em câncer, níveis de microRNAs podem estar diminuídos ou aumentados e existem evidências de que microRNAs estão envolvidos no processo de metástase e recidiva. No presente estudo, investigamos se os níveis de miR-9, miR-10b, miR-21 e miR-146b são preditores de recidiva em carcinoma papilífero de tireoide. Utilizando amostras de carcinoma papilífero de tireoide fixadas em formalina e emblocadas em parafina, avaliamos a expressão de miR-9, miR-10b, miR-21 e miR-146b em amostras de tumor

primário de 66 pacientes através da PCR em tempo real. Os pacientes foram reunidos em dois grupos: pacientes que apresentaram recidiva tumoral (n=19) e pacientes que não apresentaram recidiva tumoral (n=47). Todos os pacientes foram submetidos à tireoidectomia total e seguidos por um tempo mínimo de 120 meses para serem considerados livres de recidiva. Comparamos os grupos de pacientes com e sem recidiva tumoral em relação às variáveis idade, sexo, tamanho do tumor, riscos ATA e MSKCC-NY, estadiamento TNM, variante histológica do tumor, presença de multicentricidade, invasão vascular e perineural, extensão extra-tireóidea e metástases linfonodais cervicais. Análises univariadas e multivariadas foram realizadas utilizando-se os modelos de riscos proporcionais de Cox. Conforme análise univariada, tamanho do tumor primário ($p=0,001$) e extensão extra-tireóidea ($p=0,027$) estão associados à recidiva tumoral. Da mesma forma, pacientes em estádios mais avançados (III e IV) segundo TNM ($p=0,001$) ou classificados em grupos de risco mais elevados segundo ATA ($p=0,025$) também apresentam maior risco de evoluírem com recidiva da doença. Observamos níveis de expressão de miR-9 e miR-21 significativamente inferiores nos indivíduos que apresentaram recidiva quando comparados aos que não apresentaram recidiva neoplásica ($p<0,001$ e $p=0,001$, respectivamente). Os resultados deste estudo demonstraram que expressão diminuída de miR-9 ou de miR-21 é fator prognóstico significativo para recidiva em indivíduos portadores de carcinoma papilífero de tireoide quando avaliados em amostras do tumor primário (RR = 1,48; 95% IC: 1,24–1,77 e RR = 1,52; 95% IC: 1,18–1,94; respectivamente), enquanto miR-10b e miR-146 não se mostraram diferentemente expressos entre os dois grupos. A análises multivariada envolvendo os níveis de

expressão de miR-9 e miR-21 e parâmetros clínicos indica que os níveis de expressão destes microRNAs são fatores prognósticos independentes para pacientes com carcinoma papilífero de tireoide. Concluindo, nossos resultados sugerem que o nível de expressão de miR-9 e miR-21 poderia ser utilizado na prática clínica como biomarcador para avaliar o potencial para recidiva em carcinoma papilífero de tireoide.

Descritores: glândula tireoide, carcinoma papilar, neoplasias da glândula tireoide, microRNAs, recidiva, metástase neoplásica.

ABSTRACT

Afonseca, AS. *Recurrence associated MicroRNAs in papillary thyroid cancer* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015. 135p.

Thyroid cancer is the most prevalent endocrine neoplasm, and its annual incidence continues to rise. Papillary thyroid cancer is the most common histological type, accounting for 80-90% of all thyroid cancers. Despite its excellent prognosis and low mortality rates, regional recurrence is observed in 5-20% of patients and there is still no consensus concerning tumor recurrence predictive factors. MicroRNAs are endogenous small noncoding RNAs that mediate, post-transcriptionally, gene expression regulation. MicroRNAs selectively bind to mRNAs, playing important roles in multiple physiological processes. On the other hand, microRNAs levels may be down regulated or over expressed in cancer, and have been implicated in recurrence and metastasis-related processes. In the present study, we investigated whether miR-9, miR-10b, miR-21 and miR-146b expression levels could be predictive factors of papillary thyroid cancer recurrence. Using macrodissection followed by quantitative real-time PCR, we measured miR-9, miR-10b, miR-21 and miR-146b expression levels in formalin-fixed, paraffin-embedded primary tumor samples from 66 patients with papillary thyroid cancer. Patients were categorized into two groups: the recurrent group (n=19) and the non-recurrent group (n=47). All patients underwent total thyroidectomy and were followed for

at least 120 months after surgery to be considered recurrence-free. Both groups were compared for clinical and pathological characteristics, including age, gender, tumor size, ATA and MSKCC-NY risk, TNM stage, multicentricity, vascular and perineural invasion, presence of cervical lymph node metastasis and histological type. Univariate and multivariate analysis were performed using the Cox proportional hazard analysis. Tumor size ($p=0,001$), extrathyroidal extension ($p=0,027$), higher risk ATA groups ($p=0,025$) and advanced TNM stages ($p=0,001$) were associated with recurrence. Expression levels of miR-9 and miR-21 were significantly lower in the recurrent group than in the non-recurrent group ($p<0,001$ and $p=0,001$, respectively). MiR-9 and miR-21 expression levels were considered significant prognostic factors for recurrence in patients with papillary thyroid cancer (RR = 1,48; 95% CI: 1,24–1,77 and RR = 1,52; 95% CI: 1,18–1,94; respectively), but miR-10b and miR-146b were not. Multivariate analysis involving the expression levels of miR-9 and miR-21 and clinical parameters indicates that the expression levels are independent prognostic factor for papillary thyroid cancer patients. In conclusion, our results support the potential clinical value of miR-9 and miR-21 expression levels assessed in primary tumor samples as prognostic biomarkers for recurrence in papillary thyroid cancer.

Descriptors: thyroid gland; carcinoma, papillary; thyroid neoplasms; microRNAs; recurrence; neoplasm metastasis.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma da glândula tireoide

O carcinoma da glândula tireoide é a neoplasia endócrina maligna mais prevalente com taxas de incidência de 6,1 e 18,2 por 100.000 homens e mulheres, respectivamente¹. Nos Estados Unidos da América representa 3,6% dos casos novos de câncer a cada ano – 0,5% em homens e 1,5% em mulheres. Sua incidência aumentou de 4,85% para 11,99% por ano nos últimos 30 anos (em média 6,4% de aumento a cada ano, nos últimos 10 anos), sendo descritos cerca de 62.980 novos casos de câncer de tireoide com 1.890 mortes associadas em 2014²⁻⁴. A incidência mundial de câncer da tireoide é de 300.000 novos casos por ano com cerca de 40.000 óbitos associados⁵. No Brasil as taxas de incidência e mortalidade acompanham as descritas na literatura mundial⁶. O carcinoma da tireoide compreende neoplasias heterogêneas com características clínicas e anatomopatológicas distintas, agrupadas em três categorias: carcinoma bem diferenciado (de origem celular folicular), carcinoma medular derivado das células C tireóideas e carcinoma anaplásico ou indiferenciado. O carcinoma bem diferenciado da tireoide, originário das células epiteliais foliculares, é responsável por 94% das neoplasias desta glândula⁷. Neste grupo estão incluídos o carcinoma papilífero, o carcinoma folicular e o carcinoma de células de Hürthle, uma variante do carcinoma folicular.

1.1.1 Carcinoma papilífero da glândula tireoide

O carcinoma papilífero da tireoide (CPT) é a neoplasia tireóidea mais frequente representando de 80% a 90% dos cânceres da tireoide. É composto de papilas, combinadas ou não a áreas foliculares, sem cápsula bem definida. Suas células contêm núcleos que aparentam estar empilhados, com fendas formadas por dobras na membrana nuclear e aparência típica em função do arranjo de sua cromatina, que lhes confere aspecto em vidro fosco e permite seu diagnóstico⁸. A presença de corpos psamomatosos (estruturas calcificadas e laminadas) no estroma confirma seu diagnóstico^{9,10}. Frequentemente é multifocal e pode evoluir com metástases para linfonodos regionais e a distância, para pulmões e ossos principalmente. O CPT apresenta variantes e é sub-classificado em clássico, folicular, células altas e difuso-esclerosante¹¹⁻¹³. A maioria dos pacientes com CPT pode ser curada, apresentando sobrevida de 90% em 10 anos^{3,14,15}. O tratamento destes pacientes consiste em tireoidectomia, esvaziamento cervical quando indicado, administração de doses terapêuticas de iodo radioativo em casos selecionados, e supressão do hormônio tireoestimulante com levotiroxina exógena¹⁶.

1.1.2 Sistemas de classificação e estadiamento do carcinoma da tireoide

Existem sistemas de classificação e estadiamento do carcinoma da tireoide desenvolvidos com a intenção de prever sobrevida e prognóstico, identificando os pacientes com maior ou menor risco de morte.

Mais difundido e mundialmente utilizado, o sistema de classificação e estadiamento TNM (*Tumour, Node, Metastasis*), idealizado pela UICC (União Internacional Contra o Câncer) 7ª edição¹⁷ para o estadiamento de neoplasias em geral, classifica os pacientes em estadios segundo o tamanho do tumor primário e presença de extensão extra-tireóidea (T), presença de metástase em linfonodos regionais (N) ou a distância (M), analisando a taxa de sobrevida relativa destes pacientes em 5 anos (ANEXO A).

Existem outros sistemas de classificação e estadiamento do carcinoma da tireoide além do TNM, igualmente desenvolvidos visando estimar sobrevida e prognóstico dos pacientes, porém da mesma maneira falhos em prever recidiva tumoral. Entre eles podemos citar EORTC¹⁸ (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*), AGES¹⁹ (*Age, Grade of tumor, Extrathyroidal extension, Size of the tumor*), AMES²⁰ (*Age, distant Metastasis, Extrathyroidal extension, Size of the tumor*) e MACIS²¹ (*Metastasis, Age, Completeness of resection, Invasion, Size of the tumor*).

Existem, contudo, sistemas que permitem a classificação dos pacientes em grupos de risco para recidiva de CPT. Os mais utilizados são os sistemas de classificação do *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* de Nova York (MSKCC-NY)²² (ANEXO B) e da *American Thyroid Association* (ATA)¹⁶ (ANEXO C).

Um grupo de cirurgiões do MSKCC-NY criou uma classificação segundo grupos de risco baseados em fatores prognósticos para os pacientes portadores de neoplasia tireóidea bem diferenciada^{22,23}. Este sistema permite classificá-los quanto ao risco de recidiva do CPT. Levando em consideração fatores como idade do paciente, grau histológico e tamanho do tumor, extensão

extra-tireóidea e presença de metástases a distância, os pacientes são agrupados em grupos de risco baixo, intermediário e alto. O grupo de baixo risco inclui pacientes com menos de 45 anos com tumores de baixo risco (CPT menor do que 4 cm, ausência de extensão extra-tireóidea e de metástase a distância); o grupo de alto risco inclui pacientes com mais de 45 anos e tumores de alto risco (carcinoma folicular da tireoide (CFT) e/ou de alto grau, maior do que 4 cm, com extensão extra-tireóidea ou metástase a distância); e o grupo de risco intermediário inclui pacientes com mais de 45 anos porém com tumores de baixo risco e pacientes com menos de 45 anos porém com tumores de alto risco. Os autores avaliaram, além das taxas de mortalidade, as taxas de recidiva de câncer de tireoide bem diferenciado dentre os pacientes destes grupos, relatando incidências de 13%, 26% e 50% de recidiva global e 10%, 14% e 17% de recidiva regional, respectivamente para os grupos de baixo, intermediário e alto risco²².

A *American Thyroid Association*, em suas diretrizes publicadas em 2009¹⁶, orienta classificar os pacientes com carcinoma bem diferenciado da tireoide em três grupos de risco para recidiva: baixo, intermediário e alto risco. Os pacientes de baixo risco para recidiva não possuem metástases locais ou a distância, submeteram-se à ressecção total da doença, não apresentam invasão tumoral para estruturas ou tecidos locais, não apresentam tumores com histologia agressiva e não apresentam captação anômala de iodo radioativo. Os pacientes classificados como de risco intermediário apresentam invasão tumoral microscópica dos tecidos moles peri-tireóideos à operação inicial; ou metástases linfonodais cervicais ou captação de iodo radioativo no leito tireóideo após ablação; ou tumores com histologia agressiva ou invasão

vascular. Já os pacientes de alto risco apresentam invasão tumoral macroscópica; ou ressecção incompleta do tumor; ou metástases a distância; ou título sérico de tireoglobulina aumentado.

Observamos que os fatores de risco para sobrevida e recidiva tumoral variam entre os diferentes sistemas de classificação e estadiamento vigentes¹⁶⁻²³. Embora alguns fatores prognósticos e preditivos de recidiva tumoral sejam comuns aos diversos modelos, todavia não há consenso entre eles, ao mesmo tempo que verificamos resultados divergentes quando estas classificações são aplicadas em diferentes populações²⁴. Assim sendo, pesquisadores seguem buscando marcadores prognósticos e de recidiva tumoral para o CPT.

1.1.3 Metástases linfonodais e recidiva em carcinoma papilífero da tireoide

O impacto da presença de metástases linfonodais sobre prognóstico e recidiva em CPT é controverso entre os sistemas de classificação e estadiamento existentes. Metástases linfonodais no CPT são frequentes (20-50%)²⁵⁻²⁷ e, a despeito de seu excelente prognóstico e baixa taxa de mortalidade, entre 5% e 20% dos pacientes submetidos à tireoidectomia total desenvolverão recidiva regional sob a forma de metástase linfonodal cervical^{2,28,29}.

Na prática clínica, tanto as metástases linfonodais cervicais que se apresentam concomitantes ao tumor primário tireóideo como as metástases que ocorrem na forma de recidiva linfonodal cervical após a ressecção do tumor primário podem ser consideradas metástases tumorais.

Alguns autores acreditam que as metástases linfonodais cervicais sejam preditoras de recidiva tumoral, embora sem influência sobre a taxa de sobrevida^{14,26,30-37}.

Em esvaziamentos linfonodais cervicais profiláticos realizados em pacientes com CPT, o índice de micrometástases linfonodais encontradas é de até 90% em pacientes com ausência de metástases linfonodais cervicais clinicamente aparentes (cN0), submetidos a esvaziamento cervical profilático do compartimento central³⁸⁻⁴⁰. Observou-se, por outro lado, discrepância entre a elevada incidência de linfonodos acometidos e a baixa taxa de recidiva linfonodal nos pacientes submetidos a esvaziamento eletivo (0,4%) ou não (0,65%), sugerindo a ineficácia do esvaziamento profilático em diminuir riscos de recidiva tumoral⁴⁰. Fato é que o excelente prognóstico observado em pacientes com CPT torna difícil comprovar os benefícios do esvaziamento linfonodal cervical profilático à sobrevida^{15,41,42}.

De acordo a classificação TNM¹⁷, pacientes com metástases clinicamente aparentes em linfonodos cervicais no compartimento lateral (N1b) são classificados como de maior risco que aqueles com metástases em compartimento central apenas (N1a). Ito et al. em estudos de 2006⁴³ e 2009⁴⁴, porém, verificaram que o CPT pode evoluir com metástases para ambos os compartimentos com igual frequência e que pacientes com metástases linfonodais clinicamente aparentes nos compartimentos centrais e/ou laterais apresentaram sobrevida livre de doença e sobrevida específica causal menores que aqueles sem metástases detectadas antes do tratamento cirúrgico.

Este estudo justifica-se, portanto, pela necessidade de marcadores adicionais capazes de complementar os sistemas de classificação hoje disponíveis quanto ao risco de recidivas regional e/ou metástases linfonodais.

1.1.4 Mecanismos moleculares da metástase e recidiva em carcinoma da tireoide

Originalmente, a palavra grega metástase significa “deslocamento de um lugar para outro”⁴⁵.

O processo metastático compreende diversas etapas e interações entre células cancerosas e seu microambiente produzindo alterações que permitem a estas células transcender seu comportamento programado⁴⁶. Este complexo processo exige que as células tumorais dissociem-se do tumor primário, invadam os tecidos adjacentes, entrem na corrente linfática ou sanguínea, disseminem-se pelos vasos linfáticos ou sanguíneos e finalmente extravasem e proliferem em um sítio secundário⁴⁷⁻⁴⁹. O entendimento deste processo de invasão e metástase pelas células tumorais é fundamental na busca por fatores prognósticos e preditivos de recidiva no CPT.

Durante a primeira etapa do processo de metástase, as células cancerosas precisam desfazer os contatos célula-célula, remodelar os locais de adesão célula-matriz, e, degradando proteínas, abrir caminho através da matriz extracelular e se desprender. Em seguida, penetrando as barreiras teciduais no sítio tumoral primário, invadem os tecidos adjacentes. Isto torna-se possível por alteração das moléculas de adesão cálcio-dependentes que medeiam a

interação célula-célula nas junções aderentes, as caderinas, sendo E-caderina a mais frequentemente alterada em tumores epiteliais^{46,50-53}.

Ao mesmo tempo em que as células tumorais perdem sua capacidade de aderência intercelular, elas devem ter a capacidade de migrar e invadir o estroma adjacente. As células passam então por um processo denominado transição epitélio-mesenquimal (EMT). Durante a EMT, células epiteliais imóveis, polarizadas e aderidas via junções célula-célula, dissolvem suas junções e convertem-se em células mesenquimais móveis, não polarizadas e invasivas¹⁸⁶. Para que esta migração aconteça é necessário que haja degradação da matriz extracelular, função esta exercida pelas metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs)⁵⁴, entre outros fatores. Atividade aumentada de MMPs está associada a crescimento tumoral, invasão e metástases⁵⁵⁻⁶⁴.

Além dos processos de invasão e migração descritos, para que ocorram metástases a distância uma série de etapas subsequentes são necessárias, incluindo o deslocamento de células malignas através dos vasos sanguíneos e/ou linfáticos, colonização e adaptação das células disseminadas no local e ambiente metastático, além de adequada nutrição destas células através da formação de novos vasos pelo processo chamado angiogênese⁴⁸.

Apesar dos avanços no conhecimento do comportamento das metástases, seus mecanismos moleculares ainda não são completamente conhecidos. Estudos recentes associaram microRNAs a múltiplos passos da cascata invasão-metástase em câncer⁶⁵ e a análise da expressão dos microRNAs em neoplasias demonstra que podem ser utilizados como biomarcadores de metástases e recidivas^{66,67}.

1.2 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos ácidos ribonucleicos (RNAs) endógenos funcionais, com 19 a 25 nucleotídeos, de fita simples, e que não codificam proteínas.

Eles atuam principalmente na regulação pós-transcricional da expressão gênica ligando-se seletivamente aos RNAs mensageiros (mRNAs) por pareamento de bases. A expressão dos miRNAs de uma forma controlada exerce papel importante em múltiplos processos fisiológicos, incluindo controle do ciclo celular, renovação, diferenciação, proliferação, apoptose e homeostase celular e organogênese, levando à inibição da tradução ou à degradação do mRNA⁶⁸.

Em humanos, os genes que codificam miRNAs estão localizados em todos os cromossomos com exceção do cromossomo Y⁶⁹.

O primeiro miRNA, lin-4, foi identificado em 1993^{70,71}, enquanto o segundo miRNA, let-7, foi descrito em 2000, ambos em *Caenorhabditis elegans*, uma espécie de nematódeo⁷². Porém, foi em 2001 que o termo miRNA foi introduzido para designar esta classe de RNAs de fita simples^{73,74}. Desde então, o campo dos miRNAs tem sido extensivamente explorado, havendo 2588 miRNAs maduros humanos registrados na miRBase versão 21, de julho de 2014 (<http://www.mirbase.org>).

1.2.1 Biogênese dos microRNAs

Genes que codificam miRNA são transcritos pela RNA polimerase II (Pol II) em transcritos primários de miRNAs (pri-miRNAs ou pri-miRs). Os genes que codificam miRNAs são aparentemente induzidos e regulados por fatores de transcrição de uma maneira similar, se não idêntica, aos genes que codificam mRNAs convencionais⁷⁵.

Os pri-miRNAs são processados, ainda no núcleo celular, pela enzima endonuclease RNase III Drosha, em conjunto com cofatores DGCR8 (*DiGeorge syndrome chromosomal region 8*) e helicase RNA, para formarem estruturas do tipo “*stem-loop*” (ou “*hairpin*” = forma de grampo) imperfeitas de 60-70 nt, chamados de precursores de miRNA (pre-miRNAs ou pre-miRs)⁷⁶⁻⁷⁸.

Os pre-miRNAs são transportados ativamente, com ajuda da exportina-5, do núcleo para o citoplasma^{79,80} onde sofrem ação de outra ribonuclease, a Dicer, e seus cofatores^{77,80}. Dicer remove a alça do pre-miRNA para produzir uma dupla fita contendo o miRNA maduro (fita dominante), e um fragmento de tamanho similar (miRNA*, fita passageira), de aproximadamente 22 nucleotídeos.

Estes produtos de dupla fita são desenrolados por uma helicase e, dependendo das características termodinâmicas e da estabilidade dos pares de base na porção 5' da dupla hélice, a fita dominante é acoplada ao complexo multi-proteico RISC (*RNA-induced silencing complex*), enquanto a fita passageira (miRNA*) separa-se do duplex e é geralmente degradada^{76,81}. Por sua vez, o RISC carregado com miRNA liga-se ao mRNA alvo graças a um pareamento imperfeito do miRNA com sequências alvo localizadas na região

3'UTR (3' *untranslated region*) do mRNA alvo, assim regulando a expressão gênica. A complementariedade e especificidade deste pareamento são mediadas principalmente pelos nucleotídeos 2-8 na porção 5' do miRNA, a chamada “sequência *seed*”, evolutivamente conservada^{78,82}. A **Figura 1** ilustra a biogênese e os mecanismos de ação dos miRNAs.

Figura 1: Biogênese e mecanismos de ação dos miRNAs. DGCR8: *DiGeorge syndrome chromosomal region 8*; Pol II: polimerase II; pre-miRNA: precursor de miRNA; pri-miRNA: transcrito primário de miRNA; RISC: *RNA-induced silencing complex*; RNAm: RNA mensageiro; ORF: *open reading frame*; TRBP: *TAR RNA Binding Protein*. Adaptado de *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* (atlasgeneticsoncology.org).

1.2.2 Mecanismos de ação dos microRNAs

MiRNAs podem regular a expressão gênica por dois mecanismos pós-transcricionais distintos: clivagem do mRNA ou repressão da tradução proteica. O mecanismo de ação é determinado apenas pelo grau de complementariedade na região de ligação miRNA-mRNA. O miRNA induzirá a clivagem do mRNA se o mRNA alvo apresentar complementariedade completa com o miRNA, ou irá reprimir a tradução caso o mRNA não tenha a complementariedade suficiente, conforme ilustrado na **Figura 1**^{78,82,83}. No primeiro caso, o miRNA age como siRNA (*small interfering RNA*) e quebra o RNA alvo entre os nucleotídeos de pareamento 10 e 11 do miRNA^{84,85}. Este modo de repressão é dominante em plantas, porém em animais quase todos os alvos não têm o pareamento extenso necessário para clivagem, uma vez que apenas uma pequena proporção de miRNAs é complementar ao mRNA^{86,87}. Esta complementariedade reduzida entre miRNA e seu mRNA alvo geralmente cria incompatibilidades e saliências na região central do duplex miRNA-mRNA (na posição 10-12 da sequência do miRNA maduro) que impedem a clivagem do mRNA alvo. A maioria dos miRNAs produz uma modesta redução (menos que duas vezes) na concentração de seu mRNA alvo, sendo responsável por um “ajuste fino” na expressão proteica⁸⁷.

Um único miRNA pode ter como alvo mRNAs de centenas de genes distintos, de modo que estes pequenos RNAs regulam a expressão de grande parte dos genes codificadores de proteínas, otimizando seus padrões de expressão^{86,88}. Estima-se que mais de um terço de todos os genes humanos possam ser alvos de miRNAs⁸⁹.

Padrões de expressão de miRNAs específicos de células e tecidos já foram identificados, porém, as funções precisas e os alvos de cada miRNA ainda devem ser verificados e validados experimentalmente. O melhor modo de inferir a função de um miRNA é através de seus genes alvo. No entanto, a identificação dos alvos dos miRNAs é difícil, pois apenas uma pequena parte do miRNA (6-8 bases) combina-se perfeitamente com a região 3'UTR do mRNA alvo^{90,91}. Atualmente, utilizam-se métodos computacionais para identificar genes alvos dos miRNAs, e estes possíveis candidatos a alvo requerem validação *in vivo*.

1.2.3 MicroRNAs e câncer

A importância dos miRNAs em câncer foi sugerida por Calin et al. em 2002⁹², quando genes que codificam os miRNAs miR-15 e miR-16 foram encontrados deletados especificamente em pacientes portadores de leucemia linfocítica crônica.

O envolvimento dos miRNAs com câncer humano pode estar relacionado ao fato de mais de 50% dos genes do miRNA estarem localizados em sítios frágeis de cromossomos que estão frequentemente deletados ou rearranjados em câncer^{93,94}. Estudos demonstram a existência de uma complexa rede de miRNAs que funcionam como reguladores, direcionando a carcinogênese ou induzindo sua progressão⁹⁵⁻⁹⁷. A análise da expressão global de miRNA em pacientes com câncer mostra padrões diversos. Esta expressão encontra-se aumentada ou diminuída em tecidos tumorais comparados com normais em várias neoplasias⁹⁸ como leucemia linfocítica crônica^{92,99}, neoplasia

colorretal¹⁰⁰, linfoma de células B¹⁰¹, câncer de pulmão¹⁰², câncer de mama¹⁰³ e glioblastomas^{104,105}.

O papel biológico dos miRNAs na carcinogênese tireóidea ainda deve ser elucidado. Análises da expressão de miRNAs em tumores tireóideos evidenciaram desregulação de miRNAs nos tecidos tumorais comparados aos não patológicos. Além disso, o perfil de expressão de miRNAs apresenta significativa variação entre os diferentes tipos de câncer tireóideo¹⁰⁶⁻¹²⁰. Assim como em outros tipos tumorais, as diferentes populações de miRNAs expressas no tecido neoplásico, quando comparadas a tecidos livres de tumor, sugerem que os tumores tireóideos podem apresentar uma “assinatura de miRNA”^{107,115,121-123}. Um resumo dos principais miRNAs descritos em CPT, assim como seus efeitos em outros tumores onde já foram identificados, encontra-se na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Principais microRNAs descritos em carcinoma papilífero de tireoide

MiRNA	Tipo de neoplasia tireóidea	Outros tumores onde aparece descrito¹²⁴	Efeito	Referências
let-7	CPT, CAT	leucemia, mama, pulmão, gástrico, coloretal, fígado, pâncreas	Inibe a proliferação celular e transformação maligna	117
miR-21	CPT, CAT	mama, esôfago, gástrico, coloretal, fígado, pâncreas, próstata	Promove crescimento descontrolado e aumenta poder de invasão celular	109,119,123
miR-26	CPT, CAT	bexiga, mama, fígado	Supressão tumoral	115,119
miR-30	CPT	mama	Atua sobre a progressão tumoral	109
miR-31	CPT	pulmão, coloretal, pâncreas, próstata, bexiga	Atua sobre a progressão tumoral	109
miR-146b	CPT,CFT, CAT	pulmão, glioblastomas, pâncreas, gástrico	Associado com comportamento tumoral agressivo e recidiva	106,107,110, 119,123,125-128,
miR-155	CPT, CFT	leucemia, mama, cabeça e pescoço, pulmão, pâncreas, fígado	Promove migração celular e invasão	107,121
miR-181b	CPT, CFT	próstata, glioma, estômago, leucemia	Promove proliferação e invasão celular	108,123,125
miR-200	CAT	pâncreas, rim, cabeça e pescoço, pulmão, coloretal, fígado, mama, bexiga	Supressão da EMT	116
miR-221	CPT, CFT	fígado, bexiga, próstata, pâncreas, gástrico, pulmão	Aumenta proliferação celular, promove invasão e metástase	106-110,115,119,123,125-128
miR-222	CPT, CFT	fígado, próstata, pâncreas, gástrico, pulmão	Aumenta proliferação celular, promove invasão e metástase	106-110,115,119,123,125-128

NOTA: CPT: carcinoma papilífero de tireoide, CFT: carcinoma folicular de tireoide, CAT: carcinoma anaplásico de tireoide, EMT: transição epitélio-mesenquimal

MiRNAs também foram associados às diferentes etapas da cascata metastática em câncer, como, por exemplo, à modificação do microambiente tumoral, invasão local, sobrevivência celular nos vasos sanguíneos e linfáticos, e proliferação em locais distantes do tumor primário⁶⁵.

1.2.4 MicroRNAs, metástase e recidiva tumoral

MiRNAs exercem papel regulador em metástases, com efeitos pró e anti-metastáticos. O termo “metastamiRs” foi introduzido por Hurst et al. (2009)⁹⁷ para se referir aos miRNAs que promovem ou suprimem etapas na migração das células cancerosas e metástase. Em função da disponibilidade de modelos para estudos sobre metástases, a maior parte destes metastamiRs foi identificada em linhagens celulares derivadas de tumor de mama¹²⁹. Na **Tabela 2**, relacionamos miRNAs associados à recidiva tumoral e metástase em diversos tipos de câncer. Podemos observar que são poucos os miRNAs coincidentes entre os diferentes estudos.

Tabela 2 - MicroRNAs associados à recidiva neoplásica e metástase em câncer

Carcinoma	Autor	MiRNA	Expressão	Efeito
Mama	Tavazoie (2008) ¹³⁰	miR-335 miR-126 miR-206	↓	Menor tempo até recidiva
	Huang (2008) ¹³¹	miR-373	↑	Metástases linfonodais
	Ma (2010) ¹³²	miR-9	↑	Metástases linfonodais
	Ota (2011) ⁶⁶	mir-21	↑	Recidiva tumoral
	Zhao (2012) ¹³³	miR-10b	↑	Metástases ósseas
	Liu (2012) ¹³⁴	miR-10b	↑	Metástases linfonodais
	Zhou (2012) ¹³⁵	miR-9	↑	Risco aumentado de recidiva local
	Ahmad (2014) ¹³⁶	miR-10b	↑	Metástases cerebrais
Hepatocelular	Li Q-J (2012) ¹³⁷	miR-10b	↑	Efeito pró-metastático
	Huang (2012) ¹³⁸	miR-15b	↑	Recidiva e menor sobrevida livre de recidiva
	Han (2012) ¹³⁹	miR-155	↑	Recidiva
	Huang (2012) ¹³⁸	miR-155	↑	
	Zhu H (2012) ¹⁴⁰	miR-29a-5p	↑	Invasão e recidiva precoce
	Xia (2012) ¹⁴¹	miR-214	↓	
	Yang (2013) ¹⁴²	miR-636	↑	Recidiva
		miR-145	↓	
Próstata	Sun (2013) ¹⁴³	miR-9	↑	Metástases linfonodais
	Leite (2011) ⁶⁷	miR-100	↑	Recidiva bioquímica
	Li T (2012) ¹⁴⁴	miR-21	↑	
	Kobayashi (2012) ¹⁴⁵	miR-30d	↑	Recidiva
	Barron (2012) ¹⁴⁶	miR-200a	↓	
	Ren (2014) ¹⁴⁷	miR-21	↓	Metástase

Carcinoma	Autor	MiRNA	Expressão	Efeito
Colorectal	Chang (2011) ¹⁴⁸	miR-21	↑	Recidiva tumoral
	Li Z (2012) ¹⁴⁹	miR-10b	↑	Metástases linfonodais
	Zhu L (2012) ¹⁵⁰	miR-9	↑	Metástases linfonodais
	Christensen (2013) ¹⁵¹	miR-362-3p	↑	Bom prognóstico e risco reduzido de recidiva
Cólon	Weissmann-Brenner (2012) ¹⁵²	miR-21	↑	Menor sobrevida livre de doença
		miR-29a	↓	Maior risco de recidiva
	Oue (2014) ¹⁵⁴ Kjaer-Frifeldt (2012) ¹⁵³	miR-21	↑	Recidiva tumoral
Carcinoma Renal	Hildebrandt (2010) ¹⁵⁵	miR-9	↓	Metástase
	Heinzelmann (2011) ¹⁵⁶	miR-10b	↓	Metástase
		miR-127-3p	↓	Menor sobrevida livre de recidiva
	Slaby (2012) ¹⁵⁷	miR-145	↓	
		miR-126	↓	
Estômago	Wang (2013) ¹⁵⁸	miR-10b	↑	Metástases linfonodais
	Zheng (2013) ¹⁵⁹	miR-9	↓	Metástase
	Li (2014) ¹⁶⁰	miR-10b	↓	Metástases linfonodais
Ovário	Laios (2008) ¹⁶¹	miR-9	↓	Metástase
	Lee (2012) ¹⁶²	miR-30d	↓	Recidiva
Bexiga	Zaravinos (2012) ¹⁶³	miR-21	↑	Recidiva tumoral
	Wang (2012) ¹⁶⁴	miR-146a	↓	Risco de recidiva
Pulmão	Yang (2013) ¹⁶⁵	mir-21	↑	Recidiva tumoral
	Xu (2013) ¹⁶⁶	miR-9	↑	Metástases linfonodais

Carcinoma	Autor	MiRNA	Expressão	Efeito
Osteossarcoma	Xu (2014) ¹⁶⁷	miR-9	↑	Metástases linfonodais
Nasofaringe	Lu (2014) ¹⁶⁸	miR-9	↓	Metástase
LMA	Maki (2012) ¹⁶⁹	miR-9	↑	Menor sobrevida livre de doença
Esôfago	Hu (2011) ¹⁷⁰	miR-30e	↑	Recidiva
Glioblastoma	Qiu (2013) ¹⁷¹	miR-323	↑	Em pacientes sem recidiva
		miR-329	↑	
Endométrio	Torres (2013) ¹⁷²	miR-205	↑	Recidiva
		miR-183	↑	

NOTA: LMA: leucemia mielóide aguda

A descoberta de marcadores tumorais de recidiva em CPT, que pudessem complementar os atuais sistemas de avaliação de risco, propiciariam aos pacientes a possibilidade de tratamentos diferenciados, talvez mais conservadores no que diz respeito, por exemplo, à extensão da intervenção cirúrgica realizada e às doses de iodo radioativo utilizadas nos casos classificados como de baixo risco para recidiva.

Neste estudo avaliamos a expressão de 4 miRNAs em tecidos tireóideos de pacientes com CPT, buscando biomarcadores preditores de recidiva tumoral: miR-10b, miR-21 e miR-9 relacionados em estudos prévios à recidiva e metástases; e miR-146, frequentemente superexpresso em tumores tireóideos.

Tendo em vista o longo período de seguimento que este tipo de análise demanda, optou-se pela utilização de amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina, disponíveis nos arquivos de laboratórios de anatomia patológica. MiRNAs são estáveis e uniformemente preservados em tecidos parafinados e sua expressão não é afetada por fixação em formalina^{109,173-175}, mesmo quando armazenados durante longos períodos de tempo^{176,177}.

1.2.4.1 MiR-10b, metástase e recidiva tumoral

O aumento de expressão de miR-10b foi inicialmente descrito em linhagens celulares derivadas de câncer de mama metastático. Ma et al. (2007)¹⁷⁸ demonstraram que o fator de transcrição promotor de metástases Twist ativa a transcrição do gene de miR-10b, que por sua vez inibe a síntese da proteína supressora tumoral HOXD10 (*homeobox D10*), permitindo a expressão do gene pró-metastático *RHOC* (*Ras homolog gene family, member C*) e favorecendo migração e invasão celular.

Estudos com linhagens celulares derivadas de diversos tumores sólidos identificaram outros genes supressores tumorais como alvos de miR-10b: *CADM1* (*cell adhesion molecule 1*) em carcinoma hepatocelular¹³⁷, *KLF4* (*Krüppel-like factor 4*) em câncer esofágico¹⁷⁹, *TIP30* (*Tat-interacting protein 30*) em adenocarcinoma de pâncreas¹⁸⁰, *BIM* (*bcl-2 interacting mediator of cell death*) em câncer colorretal¹⁸¹, *Tiam1* (*T lymphoma invasion and metastasis 1*) em câncer de mama¹⁸² e *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) em células de tireoide¹⁸³. Estes estudos relataram migração e

invasão celular resultantes de superexpressão de miR-10b e consequente inibição destes genes supressores tumorais.

Níveis elevados de expressão de miR-10b podem induzir EMT em células em cultura, por ativação da via de sinalização TGF- β 1 (*Transforming growth factor beta*) e aumento da expressão de EGFR (*epidermal growth factor receptor*)^{180,184}, e promover metástase por inibição da expressão de E-caderina e aumento de MMP-9^{134,185}.

Em conformidade com os estudos citados acima, a superexpressão de miR-10b foi associada a metástases linfonodais¹³⁴, cerebrais¹³⁶ e ósseas em pacientes com câncer de mama¹³³. O aumento da expressão de miR-10b foi também relacionado a metástases linfonodais e a distância em câncer gástrico, coloretal e em hepatocarcinomas^{137,149,158}.

Em contrapartida, observou-se redução da expressão de miR-10b em amostras de tecidos de carcinoma renal de células claras metastático quando comparados a tecidos de carcinoma não-metastático¹⁵⁶. Além disso, baixa expressão de miR-10b em espécimes de câncer gástrico relacionou-se significativamente à presença de metástases linfonodais¹⁶⁰. Nesses tumores, a diminuição da expressão de miR-10b - ocasionada por metilação do DNA - acarretou diminuição da expressão de Tiam1 ao mesmo tempo que relacionou-se à presença de metástases linfonodais. Concomitantemente, a superexpressão deste miRNA em células derivadas destes tumores suprimiu migração e invasão celular¹⁶⁰.

No que tange ao câncer de tireoide, superexpressão de miR10b foi associada a metástases em carcinoma folicular microinvasivo¹⁸⁶. Mussnich et al. (2013)¹⁸³ demonstraram que, em células de carcinoma da tireoide, mir-10b é

regulado diretamente pelas proteínas HMGA1 (*High Mobility Group A1*), usualmente associadas a fenótipos de malignidade.

Não encontramos, porém, estudos na literatura que relacionaram a expressão de miR-10b e recidiva em CPT.

1.2.4.2 MiR-21, metástase e recidiva tumoral

MiR-21 foi um dos primeiros miRNAs descritos como um oncogene (oncomiR), envolvido na gênese e progressão das neoplasias humanas, bem como em múltiplas etapas do processo de metástase.

A superexpressão deste miRNA está associada à recidiva tumoral em câncer de cólon¹⁵²⁻¹⁵⁴, colorretal¹⁴⁸, bexiga¹⁶³, pulmão¹⁶⁵, mama⁶⁶, pâncreas¹⁸⁷ e próstata^{144,188}; e ao aparecimento de metástases linfonodais em câncer de esôfago^{189,190}, cólon¹⁵⁴, mama⁶⁶ e próstata¹⁴⁴.

Nestas neoplasias, miR-21 age interferindo na expressão de genes e proteínas supressores tumorais e do processo metastático – PTEN¹⁹¹⁻¹⁹³, *PDCD4 (programmed cell death 4)*^{148,194,195}, *MARCKS (myristoylated alanine-rich protein kinase c substrate)*^{144,196}, TPM1 (*tropomiosina 1*) e maspin (*mammary serine protease inhibitor*)¹⁹⁵ - aumentando o poder de invasão e migração das células tumorais e promovendo metástase.

Por outro lado, a expressão diminuída de miR-21 foi associada a metástases em câncer de próstata¹⁴⁷ e Riordan et al. (2012)¹⁹⁷ não encontraram diferenças na expressão de miR-21 entre os pacientes que apresentaram e os que não apresentaram recidiva de câncer de reto.

Em neoplasias de tireoide, miR-21 foi descrito como superexpresso em tecidos com carcinoma (folicular, papilífero e anaplásico), quando comparados a tecidos tireóideos não-neoplásicos, correlacionando-se à diminuição da expressão de PDCD4 intranuclear e, portanto, à indução de metástases¹⁹⁸.

Neste estudo avaliamos a associação entre os níveis de expressão de miR-21 e a recidiva em CPT.

1.2.4.3 MiR-9, metástase e recidiva tumoral

O aumento da expressão de miR-9 foi relacionado à presença de metástases linfonodais em neoplasia pulmonar tipo não-pequenas células¹⁶⁶, hepatocarcinoma¹⁴³, câncer de mama¹³² e câncer colorretal¹⁵⁰; e à presença de metástases a distância em osteossarcomas¹⁶⁷. Ademais, em pacientes com tumores de mama receptores de estrógeno positivos, a superexpressão de miR-9 foi associada a risco aumentado de recidiva local¹³⁵.

Alguns alvos, através dos quais miR-9 é capaz de modular EMT, invasão e metástase, já foram descritos: o gene codificador de E-caderina *CDH1 (cadherin 1)*¹³² e o fator de transcrição *FOXO1 (forkhead box protein O1)*¹⁹⁹ em câncer de mama; o gene promotor de metástases *CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4)* em carcinoma de nasofaringe¹⁶⁸; o gene *KLF17 (Kruppel-like factor 17)* em hepatocarcinoma¹⁴³; α -catenina em câncer colorretal¹⁵⁰; e ciclina D1 e fator de transcrição *Ets1* em células de câncer gástrico¹⁵⁹.

Por outro lado, miR-9 foi identificado como supressor tumoral e sua expressão diminuída está associada ao desenvolvimento de metástases em

carcinoma renal de células claras¹⁵⁵, de nasofaringe¹⁶⁸, câncer gástrico¹⁵⁹ e adenocarcinomas de ovário¹⁶¹. Em neoplasia pulmonar e carcinoma renal de células claras, o gene que codifica miR-9 parece estar hipermetilado e portanto, silencioso, e sua baixa expressão estando associada à menor sobrevida²⁰⁰, recidiva e ao desenvolvimento de metástases linfonodais^{155,201}.

Em leucemia linfoblástica aguda, a superexpressão de miR-9 mostrou-se fator prognóstico independente para sobrevida global, não apresentando, porém, relação com recidiva²⁰².

MiR-9 não foi estudado, até o momento, em carcinomas de tireoide.

1.2.4.4 MiR-146b, metástase e recidiva tumoral

Em células de câncer de pâncreas²⁰³, mama^{97,204} e gliomas, miR-146b atua como supressor tumoral diminuindo migração e invasão através da inibição de MMP16²⁰⁵. Em células de linhagem de osteossarcoma, miR-146b inibe as características mesenquimais pró-metastáticas através da repressão da proteína AUF1 (*AU-Rich element RNA-binding protein 1*), a qual tem como alvos o fator de transcrição ZEB1 (*zinc finger E-box binding homeobox 1*) e a proteína kinase AKT (*protein kinase B*)²⁰⁶.

Em células de câncer gástrico, a superexpressão de miR-146b acarreta supressão de invasão e metástase através da inibição de UHRF1 (*ubiquitin-like PHD and RING finger domain-containing protein 1*)²⁰⁷. Em câncer de mama, miR-146 ativado pelo fator de transcrição STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) modula negativamente a via de sinalização NF-κB (*nuclear factor kappa B*), agindo como supressor de EMT e metástases²⁰⁸.

No que diz respeito à neoplasia da glândula tireoide, em 2010 Chou et al.¹¹³ demonstraram, pela primeira vez, associação entre expressão de miRNAs e características clínico-patológicas dos CPTs em humanos. Os autores identificaram relação entre superexpressão de miR-146b, invasão extra-tireóidea e alto risco de óbito pela doença segundo estadiamento TNM, relação esta corroborada em estudos posteriores^{113,209,210}.

Em CPT mais agressivo, ou seja apresentando extensão extra-tireóidea e/ou metástase regional ou a distância, observa-se aumento da expressão de miR-146b²¹¹ e inibição dos genes supressores tumorais *TIMP3* (*tissue inhibitor of metalloproteinase 3*) e *ZNRF3* (*zinc and finger 3*), identificados como alvos de miR-146b²¹⁰.

In vitro, a superexpressão de miR-146b promove migração e invasão celular em células de CPT e CFT, aumentando sua agressividade^{209,212-214}.

Chou et al. (2013)²¹², em estudo com 71 indivíduos com CPT, relataram que pacientes com tumores primários expressando níveis mais elevados de miR-146b possuíam menor índice de sobrevida livre de doença do que os pacientes com menores níveis de expressão de miR-146b, demonstrando que este miRNA pode agir como marcador molecular de prognóstico em pacientes com CPT.

Concomitantemente, Lee et al. (2013)¹²⁸ observaram níveis de expressão de miR-146b significativamente aumentados em tecidos de CPT associado à recidiva. Os autores também confirmaram aumento dos níveis de expressão plasmática de miR-146b em pacientes, tanto com CPT quanto com bócio multinodular, previamente à tireoidectomia total, quando comparados a

voluntários sadios, além de posterior redução destes níveis, em ambos os grupos, após tireoidectomia total.

Tendo em vista seu papel em carcinomas de tireoide, neste estudo avaliamos sua associação com o potencial para recidiva do CPT através do estudo dos seus níveis de expressão em tumores primários.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar se os níveis de expressão dos miRNAs miR-9, miR-10b, miR-21 e miR-146b podem ser utilizados como biomarcadores preditivos de recidiva tumoral em indivíduos portadores de carcinoma papilífero da glândula tireoide.

2.2 Objetivos específicos

- 1.** Realizar análise por PCR em tempo real dos níveis de expressão dos quatro miRNAs em tecidos tireóideos fixados em formalina e incluídos em parafina de indivíduos com CPT recidivado e de indivíduos com CPT que não apresentaram recidiva em um período de tempo mínimo de 120 meses de seguimento clínico.
- 2.** Comparar os níveis de expressão de miR-9, miR-10b, miR-21 e miR-146b entre os indivíduos com e sem recidiva de CPT.
- 3.** Realizar análises de riscos proporcionais univariada e multivariada e verificar se há relação entre as características clínicas dos indivíduos tratados, histopatológicas do tumor e níveis de expressão de miR-9, miR-10b, miR-21 e miR-146b e recidiva tumoral.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Ética

O presente estudo teve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – CEP – FMUSP, como Protocolo de Pesquisa inscrito sob o número 404/10, intitulado: “Identificação de microRNAs associados com recidiva em carcinoma papilífero de tireoide” (APÊNDICE 1). O mesmo projeto foi também aprovado pela Comissão de Trabalhos Científicos do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer – CTC do IBCC (APÊNDICE 2) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein (CEP – HIAE) (APÊNDICE 3).

3.2 Casuística

Foram estudados casos de indivíduos submetidos à tireoidectomia total por carcinoma papilífero de tireoide no período entre 1995 e 2010. Os indivíduos foram acompanhados, através de exame clínico em consultório, dosagens séricas de títulos de T4 livre (tiroxina livre), TSH (*thyroid-stimulating hormone*), tireoglobulina e anticorpos anti-tireoglobulina, ultrassonografia cervical e raio X de tórax, até setembro de 2014. Dados relativos à evolução pós-operatória e ocorrência de recidiva que eventualmente não constassem nos prontuários foram colhidos através de contato telefônico com os indivíduos.

Como critérios de inclusão no estudo, foram considerados os indivíduos:

1. submetidos à tireoidectomia total ou tireoidectomia total e esvaziamento linfonodal cervical nos casos de metástases linfonodais cervicais presentes ao diagnóstico inicial;
2. que não apresentaram doença residual após a realização da tireoidectomia total, ao exame de Pesquisa de Corpo Inteiro (PCI) com iodo radioativo e dosagem de título sérico de tireoglobulina, realizados em todos os indivíduos tratados 3 a 4 semanas após o procedimento cirúrgico;
3. que permaneceram sem recidiva tumoral após um período mínimo de seguimento de 10 anos (120 meses) – para o grupo de indivíduos tratados caracterizados como livres de recidiva tumoral, e
4. que apresentaram recidiva da doença somente após 12 meses da data do tratamento cirúrgico inicial, de modo a caracterizar recidiva e não persistência tumoral – para o grupo de indivíduos tratados caracterizados como tendo evoluído com recidiva tumoral.

Foram excluídos do estudo os indivíduos:

1. cujos dados clínicos e anatomopatológicos a serem estudados não constavam em seus prontuários médicos;
2. cujos espécimes cirúrgicos não se encontravam disponíveis;
3. cujos blocos parafinados contendo os espécimes cirúrgicos não se encontravam razoavelmente conservados, não permitindo a confirmação do diagnóstico, comprovação da presença de tumor ou

mesmo a confecção de lâminas adequadas e que permitissem extração de RNA, ou

4. que abandonaram seguimento antes do período de 120 meses e não puderam ser localizados para confirmação de seu atual *status* clínico, para o grupo de indivíduos tratados considerados livres de recidiva tumoral.

Desta forma, uma vez que os critérios de inclusão foram bastante rígidos e os casos de recidiva são escassos, optamos por utilizar indivíduos de dois Serviços distintos.

Foram selecionados, partindo dos critérios acima citados, 66 indivíduos - 10 casos do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do IBCC em São Paulo e 56 casos de clínica privada, também em São Paulo - para este estudo retrospectivo de caso-controle não pareado.

Estes indivíduos foram então agrupados segundo a presença ou não de recidiva tumoral.

Tendo sido os indivíduos relacionados no presente estudo tratados com tireoidectomia total, as recidivas, quando ocorreram, deram-se na forma de metástases linfonodais cervicais. Ou seja, foram recidivas regionais e não locais. Nenhum dos paciente incluídos no estudo apresentou metástase a distância diagnosticada até o encerramento do estudo.

O tipo de esvaziamento cervical realizado foi ditado pela localização das metástases linfonodais: de compartimento central (linfonodos em níveis cervicais VI e VII) e/ou de compartimentos laterais do pescoço (linfonodos em níveis cervicais I, II, III, IV e/ou V) unilateral ou bilateralmente. Linfonodos do

compartimento central foram considerados como cervicais, independentemente do nível VII referir-se ao mediastino superior.

Tratamento complementar com iodo radioativo foi realizado em indivíduos tratados considerados de risco e em todos os indivíduos tratados que apresentaram metástases linfonodais (em alguns indivíduos tratados mais de uma vez). A dose terapêutica utilizada variou caso a caso e foi definida pelo médico da medicina nuclear.

Tratamento com levotiroxina em dose supressora do TSH foi oferecido a todos os indivíduos tratados, e sua eficácia comprovada através de exames laboratoriais.

3.3 Método

3.3.1 Revisão de prontuários dos indivíduos tratados

A revisão dos prontuários dos indivíduos tratados, com o intuito de selecionar os indivíduos tratados para este estudo, foi realizada através de protocolo contendo:

- Identificação do doente: nome, sexo, data de nascimento e idade no momento do ato operatório;
- Características clínicas pré-operatórias: queixa principal e sua duração; exames laboratoriais – T4 livre, TSH e anticorpos anti-tireóideos séricos; exame ultrassonográfico e/ou tomográfico da região cervical e exame

citológico do material obtido por punção aspirativa por agulha fina de nódulo(s) tireóideo(s);

- Avaliação quanto à presença de metástases linfonodais cervicais e/ou a distância ao diagnóstico inicial: por exame clínico, laboratorial e radiológico (ultrassonografia e/ou tomografia computadorizada, RX de tórax);
- Dados referentes ao tratamento cirúrgico: data e tipo de procedimento realizado;
- Resultados do exame anatomopatológico e características histológicas do carcinoma papilífero: variante, diâmetro máximo do tumor, presença de tireoidite, infiltrado inflamatório e bócio associados, multicentricidade do carcinoma, presença de extensão extra-tireóidea, invasão vascular e invasão perineural;
- Características clínicas pós-operatórias: dados da PCI (data e porcentagem de captação do radioisótopo), dados da radioiodoterapia complementar, quando realizada (data e dose de iodo marcado em mCi), e exames laboratoriais – títulos de T4 livre, TSH, tireoglobulina e anticorpos anti-tireoglobulina séricos; resultados de ultrassonografias e RX de tórax;
- Seguimento: tempo total de seguimento em meses e ocorrência de recidiva tumoral. Consideramos recidiva tumoral o reaparecimento da neoplasia após 12 meses do tratamento cirúrgico e persistência tumoral em período inferior a 12 meses;

- Classificação: como referência para o estadiamento dos indivíduos tratados estudados, foi utilizado o sistema de classificação TNM UICC 7^a ed.¹⁷, atualizado em 2009. Classificamos ainda os indivíduos tratados em grupos de risco segundo as diretrizes da ATA¹⁶ e os critérios do Serviço de Cabeça e Pescoço do MSKCC-NY²²;

3.3.2 Revisão anatomopatológica

Foram selecionados espécimes cirúrgicos de tireoide fixados em formalina e incluídos em blocos de parafina, tendo todos sido classificados como contendo CPT à época do procedimento cirúrgico.

Para fins deste estudo, cortes histológicos de 3 µm oriundos de cada bloco de parafina foram montados sobre lâminas e corados por hematoxilina-eosina para revisão e confirmação do diagnóstico por dois patologistas (Dra. Marília Germanos de Castro – Laboratório de Patologia do Hospital Sírio Libanês e da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes – Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo). Os mesmos desconheciam o diagnóstico prévio das lâminas avaliadas. Os casos foram reavaliados quanto à presença, tipo e variável histológica do tumor, assim como presença de multicentricidade, extensão extra-tireóidea, invasão vascular, linfática e neural. As áreas contendo tumor foram identificadas e demarcadas para futura macrodissecção.

Para cada caso foi selecionado um bloco de parafina mais representativo do carcinoma. A partir destes blocos foram confeccionadas as lâminas para extração de RNA.

As lâminas foram confeccionadas no Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia do Hospital Israelita Albert Einstein.

3.3.3 Macrodissecção das amostras e purificação do RNA

Para cada paciente, quatro cortes histológicos de 10 μ m do material parafinado contendo o tumor foram montados sobre lâminas de vidro. As áreas contendo tecido com CPT foram demarcadas, tendo como molde as lâminas coradas por hematoxilina-eosina previamente marcadas pelos patologistas, e então macrodissecadas.

A macrodissecção é uma técnica manual de enriquecimento de amostras com células de interesse, por exemplo, células tumorais. Utilizando lâmina de bisturi, o espécime cortado e fixado na lâmina é excisado, removendo-se os tecidos adjacentes livres de tumor e isolando o material tumoral²¹⁵. Desta forma procuramos aumentar a fidedignidade dos resultados ao analisar a expressão gênica quase que exclusivamente do material tumoral.

O material resultante da macrodissecção foi, a seguir, desparafinado através de uma série de lavagens com xileno e etanol. A extração do RNA total foi realizada de acordo com as instruções do kit de extração *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation* (Ambion, Grand Island, NY, EUA). O RNA foi purificado utilizando-se uma membrana acoplada à coluna proveniente do kit de extração.

O espectrofotômetro *NanoVue Spectrophotometer (GE Healthcare)* foi utilizado para avaliação da qualidade (pureza) e quantificação (concentração) do RNA total extraído das amostras. A integridade do RNA foi avaliada em um *Agilent 2100 Bioanalyzer* utilizando o *kit RNA 6000 LabChip*. Apenas amostras com OD A260/A280 razão próxima de 2.0, o que indica pureza do RNA, foram subsequentemente analisadas.

3.3.4 Síntese de cDNA e PCR em tempo real para detecção de microRNAs

A partir de 100 ng de RNA total, a síntese de cDNA (DNA complementar) foi efetuada pelo kit *TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription*, utilizando os *primers* específicos para detecção de miRNAs (*TaqMan MicroRNA Assays, Life Technologies, Foster City, CA, EUA*) - hsa-miR-9 (000583), hsa-miR-10b (002315), hsa-miR-21 (000391) e hsa-miR-146b (001097). Utilizou-se a expressão do gene RNU48 (001006), um pequeno RNA nucleolar de expressão constitutiva, como normalizador para a expressão dos miRNAs²¹⁶. Para cada reação de cDNA utilizou-se, conforme recomendação do fabricante, 20x *RT primer*, 100 mM *dNTP*, *Multiscribe Reverse Transcriptase* (50U/μL), 10x *RT Buffer*, *RNAse inhibitor* (20U/μL), amostra em volume adequado para conter 100 ng e água livre de nuclease para completar um volume de 15 μL. A síntese foi realizada no termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient*. A reação de síntese foi incubada por 30 minutos a 16°C, seguida de aquecimento a 42°C por 30 minutos, e 85°C por 5 minutos, de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante.

A PCR (*polymerase chain reaction*) em tempo real foi realizada através do kit *TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Life Technologies Corporation™*, Foster City, CA, EUA), seguindo instruções do fabricante. Foram feitas reações específicas para o miR-9, miR-10b, miR-21 e miR-146b, além do RNU48. As reações contiveram TaqMan 2X Master Mix, TaqMan 20XRT primer, cDNA (sem diluição) e água livre de nuclease. As reações de amplificação foram preparadas em tubos ópticos, em duplicata, levadas ao Termociclador 7500 *Real-Time PCR System (Life Technologies™*, Foster City, CA, EUA), submetidas às seguintes condições de ciclagem: 95°C por 10 minutos, seguidas por 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Os valores de expressão dos miRNAs foram obtidos de cada amostra em Ct (*cycle threshold*). O valor de Ct indica o ciclo limiar de detecção, ou seja, o número mínimo de ciclos que permite detectar uma amplificação. Para a quantificação relativa de uma amostra, seu Ct deve ser corrigido pelo Ct do gene referência. O Ct é proporcional ao logaritmo da quantidade inicial de cDNA do gene de interesse em uma determinada amostra. Quanto menor for o Ct obtido, maior a quantidade inicial do cDNA de interesse.

O Δ Ct foi calculado, para cada amostra, obtendo-se a diferença entre Ct do miRNA de interesse e o Ct do gene de referência (RNU48).

Como as reações foram realizadas em duplicata, foi calculado um valor médio entre os Δ Cts para cada amostra analisada.

3.4 Análise estatística

Os dados foram descritos por frequências absolutas e porcentagens no caso das variáveis categóricas e por médias, medianas, desvio-padrão, 1º e 3º quartis e valores mínimos e máximos no caso das variáveis quantitativas (valores de expressão de miRNA). A homogeneidade dos grupos que apresentaram ou não recidiva quanto às variáveis categóricas de interesse foi avaliada por testes Qui-Quadrado de Pearson ou testes exatos de Fisher nos casos de frequências esperadas menores que 5.

A avaliação da relação entre os fatores de interesse (sexo, idade, risco ATA, risco MSKCC, estadio TNM, tamanho tumoral, multicentricidade, extensão extra-tireóidea, metástase linfonodal cervical, subtipo histológico, invasão vascular e perineural, expressão dos miRNAs miR-9, miR-10b, miR-21 e miR-146b), ocorrência e o tempo até a ocorrência de recidiva foi feita de forma simples e múltipla por modelos de riscos proporcionais de Cox. Os indivíduos que não apresentaram recidiva até o final do tempo de seguimento foram considerados nesta análise como censura. A suposição de proporcionalidade dos riscos foi avaliada graficamente por curvas de risco. Na análise múltipla não foram incluídas no mesmo modelo variáveis que são correlacionadas, a fim de evitar a multicolinearidade. Os resultados dos modelos foram apresentados por razões de risco (*Hazard Ratio*), intervalos de 95% de confiança e valores p.

Para a análise múltipla foram incluídas as variáveis que apresentaram valor p menor ou igual a 0,10 na análise simples, incluindo os valores de expressão de miR-9 e miR-21.

Adicionalmente, para avaliar a relação entre os níveis de expressão dos miRNAs estudados entre si e com o tempo até a ocorrência de recidiva, para aqueles pacientes que apresentaram recidiva, utilizamos o coeficiente de correlação de Pearson.

Para todas as análises realizadas, o nível de significância adotado foi 5%.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote SPSS (*Statistical Package for Social Science* for Windows Inc. Released 2008. SPSS Statistics for Windows, Version 17.0. Chicago: SPSS Inc).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização clínico-patológica dos indivíduos tratados estudados

Inicialmente foram identificados 289 indivíduos operados por carcinoma papilífero de tireoide no período entre 1995 e 2010. Deste total, foram elegíveis para a análise 66 indivíduos.

Os 66 indivíduos selecionados foram divididos em grupo de indivíduos que apresentaram recidiva do CPT após tratamento inicial (19 indivíduos) e grupo de indivíduos que evoluíram sem recidiva tumoral após o tratamento inicial (47 indivíduos).

Os dados referentes às características clínicas dos indivíduos, procedimentos cirúrgicos realizados e resultados histológicos do tumor, encontram-se nos ANEXOS D e E.

A média etária do grupo de indivíduos não recidivados foi calculada em 46,9 anos (máxima de 71 anos e mínima de 22 anos), com desvio padrão de 12,9 anos. Já no grupo de indivíduos recidivados, a média etária foi de 46,5 anos (máxima de 79 anos e mínima de 23 anos), com desvio padrão de 13,8 anos.

Para o paciente de número 14, não havia descrição no laudo anatomopatológico original quanto à invasão vascular ou perineural pelo tumor, e tampouco foi possível, dadas as condições do material parafinado remanescente, avaliar estes parâmetros durante a revisão histológica realizada pelo patologista. Desta forma, este caso em particular não foi incluído na

análise de homogeneidade dos grupos quanto às variáveis invasão vascular e perineural.

Dois indivíduos (casos 13 e 18) foram submetidos inicialmente à tireoidectomia parcial. A operação de totalização da tireoidectomia ocorreu 9 e 105 meses, respectivamente, após o procedimento inicial. Em ambos os casos não foi encontrado tumor nos lobos remanescentes e o laudo anatomopatológico revelou apenas bócio nodular.

No grupo dos indivíduos que não apresentaram recidiva da doença, sete indivíduos foram submetidos a esvaziamento cervical por suspeita de metástase linfonodal cervical ao diagnóstico inicial. Destes indivíduos, apenas cinco foram confirmados como portadores de doença metastática linfonodal ao exame anatomopatológico.

O período até a ocorrência de recidiva tumoral variou entre 12 e 119 meses. Seis indivíduos (31,6%) recidivaram no período de até 3 anos após o tratamento inicial; levando-se em consideração um período de até 5 anos após o tratamento inicial, 12 indivíduos (63,2%) apresentaram recidiva; e 17 indivíduos (89,5%) o fizeram considerando-se um período de até 8 anos após a ressecção do tumor primário. Na casuística estudada, nenhum paciente apresentou recidiva da lesão após 120 meses de acompanhamento.

Os indivíduos do grupo com recidiva foram seguidos por uma média de 114 meses, com mínima de 46 e máxima de 172 meses. Já no grupo de indivíduos que não apresentou recidiva, o tempo médio de seguimento foi de 146 meses, com mínima de 122 meses e máxima de 234 meses.

Observou-se que 10 indivíduos de nossa casuística eram portadores de metástases linfonodais cervicais ao diagnóstico inicial e submeteram-se a

esvaziamento cervical concomitante à tireoidectomia total como tratamento inicial. Deste total, cinco indivíduos (50%) evoluíram sem recidiva tumoral. A localização dos linfonodos metastáticos entre indivíduos recidivados e não recidivados foi equivalente: no compartimento central em dois indivíduos e no compartimento lateral em três indivíduos.

Em relação à classificação dos doentes por grupo de risco, cinco (26,3%) indivíduos classificados como de baixo risco ATA para recidiva tumoral evoluíram com recidiva neoplásica. Destes, três (15,8%) indivíduos foram também classificados como de baixo risco para recidiva pela classificação MSKCC-NY. Por outro lado, seis (12,8%) indivíduos classificados como de alto risco para recidiva, segundo classificação MSKCC-NY, não apresentaram recidiva tumoral até o término do seguimento.

Extensão neoplásica extra-tireóidea foi observada em 12 indivíduos com recidiva (63,2%) e em 16 indivíduos sem recidiva tumoral (34%). Dentre estes indivíduos com extensão extra-tireóidea, 10 (35,7%) possuíam idade ≥ 50 anos e dois (7,1%) possuíam tumor > 4 cm.

Cinco indivíduos que não apresentaram recidiva tumoral apresentaram tumores multicêntricos tanto de variantes histológicas clássica quanto folicular, tendo sido classificados separadamente quanto ao subtipo histológico.

4.2 Associação das características clínicas e patológicas com recidiva de carcinoma papilífero da tireoide

Os grupos de indivíduos com e sem recidiva tumoral foram comparados em relação às variáveis idade; sexo; tamanho do tumor (representado pela

medida do maior diâmetro da maior lesão); riscos ATA e MSKCC-NY; estadiamento TNM; presença ou não de multicentricidade, invasão vascular e perineural, extensão extra-tireóidea e metástases linfonodais cervicais; e variante histológica do tumor. Os resultados encontram-se descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Descrição das características demográficas, clínicas e histopatológicas da amostra de indivíduos

VARIÁVEL		RECIDIVA						p - homogeneidade
		Não (47)		Sim (19)		TOTAL (66)		
		n	%	n	%	n	%	
Sexo	feminino	38	80,90%	17	89,50%	55	83,30%	0,489*
	masculino	9	19,10%	2	10,50%	11	16,70%	
	TOTAL	47	100,00%	19	100,00%	66	100,00%	
Idade (anos)	< 45 anos	23	48,90%	7	36,80%	30	45,50%	0,372#
	≥ 45 anos	24	51,10%	12	63,20%	36	54,50%	
	TOTAL	47	100,00%	19	100,00%	66	100,00%	
Risco ATA	baixo	27	57,40%	5	26,30%	32	48,50%	0,022#
	intermediário	20	42,60%	14	73,70%	34	51,50%	
	alto	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	
	TOTAL	47	100,00%	19	100,00%	66	100,00%	
Risco MSKCC-NY	baixo	10	21,30%	3	15,80%	13	19,70%	0,043*
	intermediário	31	66,00%	8	42,10%	39	59,10%	
	alto	6	12,80%	8	42,10%	14	21,20%	
	TOTAL	47	100,00%	19	100,00%	66	100,00%	
Estadio TNM	I	41	87,20%	9	47,40%	50	75,80%	0,001*
	II	0	0,00%	1	5,30%	1	1,50%	
	III	6	12,80%	7	36,80%	13	19,70%	
	IV	0	0,00%	2	10,50%	2	3,00%	
	TOTAL	47	100,00%	19	100,00%	66	100,00%	
Tamanho (cm)	≤ 2	42	89,40%	8	42,10%	50	75,80%	<0,001#
	2 < tamanho ≤ 4	4	8,50%	8	42,10%	12	18,20%	
	> 4	1	2,10%	3	15,80%	4	6,10%	
	TOTAL	47	100,00%	19	100,00%	66	100,00%	
Metástase linfonodal cervical	não	42	89,40%	14	73,70%	56	84,80%	0,136*
	sim	5	10,60%	5	26,30%	10	15,20%	
	TOTAL	47	100,00%	19	100,00%	66	100,00%	
Invasão vascular	não	32	68,10%	10	55,60%	42	64,60%	0,344#
	sim	15	31,90%	8	44,40%	23	35,40%	
	TOTAL	47	100,00%	18	100,00%	65	100,00%	
Invasão perineural	não	42	89,40%	13	72,20%	55	84,60%	0,124*
	sim	5	10,60%	5	27,80%	10	15,40%	
	TOTAL	47	100,00%	18	100,00%	65	100,00%	
Extensão extra-tireóidea	não	31	66,00%	7	36,80%	38	57,60%	0,030#
	sim	16	34,00%	12	63,20%	28	42,40%	
	TOTAL	47	100,00%	19	100,00%	66	100,00%	
Subtipo histológico	clássico	33	70,20%	15	78,90%	48	72,70%	0,427*
	folicular	9	19,10%	4	21,10%	13	19,70%	
	clássico e folicular	5	10,60%	0	0,00%	5	7,60%	
	TOTAL	47	100,00%	19	100,00%	66	100,00%	
Multicentricidade	ausente	31	66,00%	9	47,40%	40	60,60%	0,162#
	presente	16	34,00%	10	52,60%	26	39,40%	
	TOTAL	47	100,00%	19	100,00%	66	100,00%	

NOTA: *: Teste exato de Fisher; #: Teste Qui-Quadrado de Pearson

Os dois grupos, com e sem recidiva tumoral, foram homogêneos em relação à idade ($p = 0,372$), sexo ($p = 0,489$), multicentricidade ($p = 0,162$), presença de linfonodos comprometidos ao diagnóstico inicial ($p = 0,136$), invasão vascular ($p = 0,344$) e perineural ($p = 0,124$) e variante histológica ($p = 0,427$).

Observamos que os indivíduos que evoluíram com recidiva apresentavam tumores maiores ($p < 0,001$), com presença mais frequente de extensão extra-tireóidea ($p = 0,03$), estadios avançados segundo sistema de estadiamento TNM ($p = 0,001$), bem como riscos MSKCC-NY ($p = 0,043$) e ATA ($p = 0,022$) para recidiva mais elevados.

Para a análise simples de Cox, baseada na ocorrência ou não de recidiva tumoral, os grupos de estadio I e II segundo classificação TNM foram agrupados, assim como os de estadio III e IV. Excluimos da análise simples os cinco casos com variantes histológicas clássica e folicular concomitantes. Os resultados desta análise encontram-se descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Análise simples, segundo modelo de riscos proporcionais de Cox, de risco de recidiva

	RR	IC 95% para RR		p
		Limite inferior	Limite superior	
Idade ≥ 45 anos	1,67	0,66	4,26	0,279
Sexo				
masculino x feminino	1,85	0,43	8,00	0,412
Risco ATA				
intermediário x baixo	3,23	1,16	8,97	0,025
Risco MSKCC-NY				
intermediário x baixo	0,93	0,25	3,49	0,910
alto x baixo	3,59	0,95	13,61	0,060
Multicentricidade presente	1,85	0,75	4,55	0,182
Tamanho do tumor (cm)				
$2 < \text{tamanho} \leq 4 \text{ x } \leq 2$	5,70	2,11	15,40	0,001
$> 4 \text{ x } \leq 2$	6,00	1,58	22,84	0,009
Metástase linfonodal cervical	2,27	0,82	6,31	0,116
Estadio TNM				
III/IV x I/II	4,63	1,87	11,49	0,001
Invasão vascular	1,67	0,66	4,24	0,280
Invasão perineural	2,37	0,84	6,66	0,102
Extensão extra-tireóidea	2,88	1,13	7,32	0,027
Variante histológica				
folicular x clássica	1,05	0,35	3,17	0,929
Média de ΔCt miR-9	1,48	1,24	1,77	$<0,001$
Média de ΔCt miR-10b	1,24	0,84	1,81	0,276
Média de ΔCt miR-21	1,52	1,18	1,94	0,001
Média de ΔCt miR-146b	0,94	0,74	1,19	0,599

NOTA: RR: risco relativo; IC: intervalo de confiança

Conforme os resultados desta análise simples, idade acima de 45 anos, sexo masculino, subtipos histológicos, risco MSKCC-NY elevado ou intermediário, presença de multicentricidade, invasão vascular ou perineural e metástase linfonodal cervical, não apresentaram indícios de associação com recidiva.

Por outro lado, nossos resultados mostraram que tamanho do tumor primário [$2\text{cm} < \text{tamanho} \leq 4 \text{ cm x } \leq 2 \text{ cm}$] (RR = 5,7; IC 95%: 2,11 – 15,4;

$p=0,001$) e $> 4 \text{ cm} \times \leq 2 \text{ cm}$ ($RR = 6$; IC 95%: 1,58 – 22,84; $p=0,009$)], e extensão extra-tireóidea ($RR = 2,88$; 95% IC: 1,13 – 7,32; $p=0,027$) estão associados à recidiva tumoral. Da mesma forma, indivíduos em estádios mais avançados (III e IV) segundo o sistema de estadiamento TNM ($RR = 4,63$; IC 95%: 1,87-11,49; $p = 0,001$), ou classificados em grupo de risco intermediário ou alto segundo classificação ATA ($RR = 3,23$; IC 95%: 1,16 – 8,97; $p = 0,025$) também apresentaram maior risco de evoluírem com recidiva da doença.

4.3 Associação entre expressão de miR-9, miR-10b, miR-21 e miR-146b e recidiva de carcinoma papilífero da tireoide

Avaliamos os níveis de expressão de miR-9, miR-10b, miR-21 e miR146b em cada uma das 66 amostra de tecido contendo CPT, através de PCR em tempo real. A descrição dos valores médios de ΔCt dos miRNAs estudados encontra-se na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Descrição dos valores médios de ΔCt dos miRNAs estudados (miR-9, miR-10b, miR-21 e miR-146b)

		Recidiva		
		Não	Sim	TOTAL
Média ΔCt miR-9	Mediana	7,8	9,3	8,5
	Mínimo	4,8	4,6	4,6
	1º quartil	7,2	8,7	7,3
	3º quartil	9,2	12,6	9,6
	Máximo	10,6	15,7	15,7
	n	47	19	66
Média ΔCt miR-10b	Mediana	8,0	8,1	8,0
	Mínimo	4,6	4,1	4,1
	1º quartil	7,3	7,4	7,3
	3º quartil	8,6	9,7	8,7
	Máximo	9,5	11,1	11,1
	n	47	19	66
Média ΔCt miR-21	Mediana	-2,2	-1,0	-1,9
	Mínimo	-5,1	-4,0	-5,1
	1º quartil	-2,6	-2,2	-2,5
	3º quartil	-1,3	0,6	-1
	Máximo	0,7	3,5	3,5
	n	47	19	66
Média ΔCt miR-146b	Mediana	-3,7	-4,3	-3,8
	Mínimo	-7,2	-6,7	-7,2
	1º quartil	-4,6	-5,4	-4,6
	3º quartil	-2,5	-1,9	-2,4
	Máximo	2,7	1,9	2,7
	n	47	19	66

Análises simples e múltiplas utilizando modelos de riscos proporcionais de Cox foram realizadas para avaliação da associação da expressão de miR-9, miR-10b, miR-21 e miR-146b com recidiva tumoral.

Como apresentado na **Figura 2**, e de acordo com análise simples realizada segundo modelo de riscos proporcionais de Cox (**Tabela 4**), os níveis de expressão de miR-9 e miR-21 foram significativamente menores nos tecidos de

CPT recidivado quando comparados aos tecidos de CPT não-recidivado e menores níveis de expressão de miR-9 (RR = 1,48; IC 95%: 1,24–1,77; $p < 0,001$) e miR-21 (RR = 1,52; CI 95%: 1,18–1,94; $p = 0,001$) estavam associados à recidiva.

Por outro lado, não observamos diferença estatisticamente significativa dos níveis de expressão de miR-10b ($p = 0,276$) ou miR-146b ($p = 0,599$) entre os grupos com e sem recidiva tumoral.

Figura 2: Níveis de expressão de miR-9, miR-10b, miR-21 e miR-146b, representados em valores de ΔCt , comparando-se o grupo de indivíduos que apresentaram recidiva e o grupo de indivíduos que não apresentaram recidiva. Valores mais elevados de ΔCt indicam menor expressão. p: valor p, obtido por análise simples realizada segundo modelo de riscos proporcionais de Cox.

Na análise múltipla foram incluídas as variáveis que apresentaram valor p menor ou igual a 0,10 na análise simples (risco ATA e MSKCC-NY, estadio TNM, tamanho tumoral e presença de extensão extra-tireóidea), incluindo os miRNAs miR-9 e miR-21 como marcadores.

A relação entre miR-9 e miR-21 foi avaliada por meio do coeficiente de correlação de Pearson e observou-se que as variáveis são positiva e moderadamente correlacionadas entre si ($r=0,650$, $p<0,001$), de modo que não foram incluídas conjuntamente em um mesmo modelo. Assim, foram ajustados modelos de análise múltipla com miR-9 ou com miR-21, considerando cada uma das variáveis separadamente.

A relação entre as variáveis de risco ATA e MSKCC-NY, estadio TNM, tamanho tumoral e presença de extensão extra-tireóidea também foi investigada. Observamos relação entre presença de extensão extra-tireóidea e grupo de risco MSKCC-NY ($p<0,001$), grupo de risco ATA ($p<0,001$), tamanho tumoral ($p=0,024$) e estadio TNM ($p<0,001$); bem como entre estadio TNM e grupos de risco MSKCC-NY ($p<0,001$) e ATA ($p<0,001$); e entre os grupos de risco MSKCC-NY e ATA ($p<0,001$). Como as variáveis são altamente relacionadas entre si, não houve justificativa para mantê-las todas no modelo ao mesmo tempo.

Em consequente, a relação entre miR-9 e miR-21 e recidiva foi investigada através de análises múltiplas considerando-se cada variável de uma vez.

O estudo dos modelos ajustados com as variáveis uma a uma e o miRNA-9 não mostrou interação significativa de primeira ordem, ou seja, o

efeito do miRNA-9 na recidiva não depende das categorias das demais variáveis. O mesmo foi observado nos modelos considerando o miR-21.

Assim sendo, segundo as análises múltiplas do modelo de risco proporcional de Cox, identificamos expressão de miR-9 e expressão de miR-21 como fatores prognósticos independentes e significantes para indivíduos portadores de carcinoma papilífero de tireoide. Os riscos relativos estimados da expressão de miR-9 e miR-21 e outros parâmetros clínicos derivados deste modelo de Cox estão indicados nas **Tabelas 6 e 7**, respectivamente.

Tabela 6 - Análises multivariadas entre características clínicas e patológicas e recidiva de CPT, considerando os níveis de expressão de miR-9

MiR-9	RR	IC 95%		p
		Limite inferior	Limite superior	
Risco MSKCC-NY				
Baixo x Alto	0,323	0,089	1,481	0,158
Intermediário x Alto	0,292	0,101	0,847	0,023
Média miR-9	1,404	1,175	1,677	<0,001
Risco ATA				
Intermediário x Baixo	2,412	0,829	7,02	0,106
Média miR-9	1,406	1,175	1,683	<0,001
Tamanho do tumor (cm)				
2 < tamanho ≤ 4 x ≤ 2	4,359	1,522	12,485	0,006
> 4 x ≤ 2	1,541	0,301	7,895	0,604
Média miR-9	1,414	1,128	1,772	0,003
Estadio TNM				
III/IV x I/II	4,152	1,549	11,133	0,005
Média miR-9	1,392	1,169	1,657	<0,001
Extensão extra-tireóidea				
Média miR-9	1,46	1,218	1,75	<0,001
Metástase linfonodal cervical				
Média miR-9	1,457	1,21	1,754	<0,001

NOTA: RR: risco relativo; IC: intervalo de confiança

Tabela 7 - Análises multivariadas entre características clínicas e patológicas e recidiva de CPT, considerando os níveis de expressão de miR-21

MiR-21	RR	IC 95%		p
		Limite inferior	Limite superior	
Risco MSKCC-NY				
Baixo x Alto	0,358	0,091	1,416	0,143
Intermediário x Alto	0,272	0,099	0,748	0,012
Média miR-21	1,472	1,141	1,898	0,003
Risco ATA				
Intermediário x baixo	2,796	0,98	7,974	0,054
Média miR-21	1,418	1,119	1,797	0,004
Tamanho do tumor (cm)				
2 < tamanho ≤ 4 x ≤ 2	4,99	1,806	13,786	0,002
> 4 x ≤ 2	2,735	0,53	14,114	0,23
Média miR-21	1,369	1,015	1,848	0,04
Estadio TNM				
III/IV x I/II	4,284	1,679	10,931	0,002
Média miR-21	1,457	1,134	1,87	0,003
Extensão extra-tireóidea				
Média miR-21	3,562	1,366	9,287	0,009
Média miR-21	1,577	1,229	2,023	<0,001
Metástase linfonodal cervical				
Média miR-21	1,778	0,605	5,228	0,296
Média miR-21	1,455	1,138	1,861	0,003

NOTA: RR: risco relativo; IC: intervalo de confiança

Não foram observadas evidências de correlação entre o intervalo de tempo até a ocorrência de recidiva e os valores de expressão de miR-9 e miR-21. O coeficiente de correlação de Pearson assumiu valor 0,001 para miR-9 ($p = 0,997$) e valor 0,061 para miR-21 ($p = 0,804$), de tal forma que, apesar de verificarmos associação entre os níveis de expressão de miR-9 e miR-21 e a ocorrência de recidiva, não conseguimos relacionar os valores de expressão de miR-9 e miR-21 ao intervalo de tempo até sua ocorrência.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Na prática clínica diária nos deparamos com a incerteza de quais indivíduos apresentarão recidiva neoplásica, fator de angústia tanto para o paciente quanto para seu médico. Apesar da sobrevida de 90% em 10 anos^{3,14,15}, entre 5% e 20% dos pacientes submetidos à tireoidectomia total desenvolverão recidiva regional na forma de metástases linfonodais cervicais^{2,3,28,29}. Parte destes pacientes apresentarão recidivas tumorais apesar de classificados como de baixo risco pelos sistemas de classificação vigentes, ainda que submetidos a tratamentos cirúrgicos considerados adequados e ideais, e apesar de receberem doses máximas de iodo radioativo, instigando a busca por preditores de recidiva mais efetivos e que permitam tratamento eficaz destes doentes.

Os sistemas atuais de classificação e estadiamento do carcinoma da tireoide utilizam fatores de risco, como idade e sexo dos pacientes, tamanho tumoral, presença de extensão extra-tireóidea ou doença metastática, visando prever sobrevida e prognóstico dos doentes¹⁷⁻²¹, porém são falhos na predição de recidiva tumoral. Os sistemas de classificação sugeridos pela ATA e pelo grupo de cirurgiões do MRKCC-NY, permitem ainda classificar os pacientes segundo grupos de risco, identificando os indivíduos com maior ou menor risco para recidiva de CPT.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, os pacientes classificados como de maior risco segundo as classificações ATA e MRKCC-NY apresentaram de fato maiores taxas de recidiva tumoral. No entanto, 5 pacientes classificados como de baixo risco para recidiva segundo

estadiamento ATA e MSKCC evoluíram com recidiva da doença, representando 26,3% (5/19) de sub-estadiamento em nossa casuística, reiterando a necessidade de buscarmos adicionais marcadores de risco para recidiva tumoral.

A identificação de novos marcadores prognósticos capazes de complementar os sistemas atuais quanto à avaliação do risco para a recidiva tumoral em indivíduos portadores de CPT propiciaria um tratamento mais preciso destes indivíduos, permitindo a seleção de candidatos a ressecções tumorais mais conservadoras e que não incluíssem esvaziamentos cervicais linfonodais profiláticos, e que tampouco necessitassem de tratamento com iodo radioativo adjuvante.

Com o intuito de identificar possíveis novos marcadores de recidiva neoplásica em CPT, investigamos a associação de expressão de quatro miRNAs (miR-9, miR-10b, miR-21 e miR-146b) e recidiva tumoral.

Trata-se de um estudo caso-controle não randomizado e retrospectivo. Apesar dos problemas inerentes a este tipo de estudo, tais como a dificuldade na coleta de dados, documentação incompleta e dificuldades na obtenção de material, estudos randomizados prospectivos se tornam praticamente inviáveis em função da baixa incidência de recidivas em CPT^{14,217}.

Para esta análise, partimos de um universo de 289 pacientes operados entre 1995 e 2010. Este número de pacientes não representa, porém, o universo de indivíduos com CPT operados nesse período, e sim o número de pacientes com prontuários disponíveis para esta pesquisa. Assim sendo, não se pode considerar que a amostra estudada tenha valor epidemiológico ou represente a população de afetados pelo CPT em nosso meio. Foram

encontradas dificuldades para obtenção dos espécimes parafinados entre os 289 pacientes selecionados inicialmente para análise: em 16 casos, os blocos contendo o material parafinado não puderam ser aproveitados pelo péssimo estado de conservação em que se encontravam; sete casos foram desprezados por ausência de tumor nos blocos remanescentes e em 49 casos os blocos com material haviam sido descartados pelo laboratório responsável por seu armazenamento. Nos deparamos também com dificuldades na coleta de informação sobre indivíduos operados há mais de 10 anos. Cento e cinquenta e um pacientes abandonaram seguimento antes do período de 120 meses, não puderam ser localizados para confirmação de seu atual *status* clínico e/ou não se encaixaram nos critérios de inclusão do estudo. Foram descartados ainda os casos nos quais a completa ressecção do tumor e a extensão da tireoidectomia não puderam ser comprovadas. Apenas os casos de indivíduos submetidos à tireoidectomia total foram considerados para o estudo no intuito de minimizar-se a incidência de recidiva em glândula tireoide remanescente, e para que os títulos séricos de tireoglobulina pudessem ser usados como parâmetro de ausência de doença no seguimento clínico dos pacientes. Por fim, 66 pacientes remanescentes foram incluídos no estudo. Dentre estes, 47 não apresentaram recidiva e 19 pacientes apresentaram recidiva tumoral na forma de metástases linfonodais cervicais. Nenhum paciente deste estudo evoluiu com metástases a distância ou óbito pela doença.

Dadas a excelente sobrevida em 10 anos que os indivíduos portadores de CPT apresentam^{3,14,15} e a natureza indolente da doença, o tempo de seguimento clínico dos doentes deve ser prolongado para a averiguação de

recidiva tumoral e morte pela doença. No entanto, na falta de estudos atualizados prospectivos e controlados, não se encontrou consenso na literatura quanto a este período de tempo mínimo para seguimento, tampouco orientações nas diretrizes da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (<http://www.endocrino.org.br/diretrizes-da-sbem/>) ou da ATA, apenas sugestão de seguimento por tempo mais prolongado dos pacientes classificados como de alto risco. Assim sendo, para considerar os pacientes livres de doença, e uma vez que todos os indivíduos em nossa casuística apresentaram recidiva em período inferior a 10 anos da data da operação, estabelecemos 120 meses como período de tempo mínimo de seguimento.

Na casuística avaliada, 12 (63,2%) indivíduos recidivaram nos primeiros 5 anos, sendo seis (31,6%) nos primeiros 3 anos. Dois (10,5%) indivíduos apresentaram recidiva tumoral com mais de 8 anos de acompanhamento, porém nenhum paciente recidivou após 10 anos de acompanhamento. Neste aspecto, os dados apresentados estão de acordo com publicação recente de Durante et al. (2013)²¹⁸, que descreve 13 casos de recidiva em uma série com 948 indivíduos. Embora relate recidivas um pouco mais precoces do que em nossa série, o autor também não observou recidivas após 10 anos de acompanhamento. Recidivas mais tardias, ou seja, que ocorrem após 10 anos do tratamento inicial, são relatadas em raros estudos que englobam períodos de acompanhamento mais longos, porém estes estudos reúnem diferentes tipos de tratamentos cirúrgicos realizados e indivíduos que não foram tratados com iodo radioativo^{21,219}.

Em um primeiro momento avaliamos o potencial da análise de variáveis clínicas e histopatológicas na predição da recidiva em CPT para as amostras deste estudo.

Tamanho do tumor primário e extensão extra-tireóidea foram confirmados como fatores de risco para recidiva tumoral em nossas análises, o que está de acordo com trabalhos recentemente publicados²²⁰⁻²²², e também com a classificação de risco proposta pelo grupo de cirurgiões do MSKCC. Segundo a classificação sugerida pela ATA, extensão extra-tireóidea é fator de risco para recidiva, embora tamanho tumoral não o seja. Entretanto, extensão extra-tireóidea parece ocorrer com maior frequência em indivíduos mais idosos e em tumores de maior tamanho^{223,224}. Embora análise estatística para avaliar a relação entre extensão extra-tireóidea, idade dos indivíduos e tamanho do tumor não tenha sido realizada (por não ser o escopo do estudo), verificamos que, dentre os indivíduos incluídos no estudo e que apresentaram extensão extra-tireóidea do CPT, apenas 10 (35,7%) possuíam idade ≥ 50 anos e 2 (7,1%) possuíam tumor > 4 cm, sinalizando divergência em relação aos resultados publicados na literatura.

Indivíduos classificados como estadios III ou IV, segundo estadiamento TNM, apresentaram maiores taxas de recidiva tumoral do que os indivíduos estadios I ou II, e inferimos que as variáveis tamanho do tumor primário e extensão extra-tireóidea tenham sido os fatores determinantes de recidiva nestes indivíduos, uma vez que metástase linfonodal ao diagnóstico inicial não foi considerada fator de risco para recidiva e nenhum paciente apresentou metástase a distância.

De acordo com a literatura, tumores com maior volume estão associados a maiores taxas de acometimento linfonodal e pior sobrevida livre de doença^{43,225}. Tamanho tumoral também é considerado fator preditivo para metástases linfonodais em compartimento central em indivíduos com CPT clinicamente cN0^{43,226-228}.

Sexo masculino, idade acima de 45 anos, linfonodos cervicais comprometidos ao diagnóstico e presença de invasão vascular não foram considerados fatores de risco para recidiva de CPT no presente estudo.

Invasão vascular por células metastáticas não é considerada fator de risco para sobrevida pelos diversos sistemas de estadiamento vigentes¹⁷⁻²¹. Tampouco é considerada fator de risco para recidiva pelos sistemas de classificação de risco de recidiva ATA e MSKCC, consoante nossos resultados.

Ainda em conformidade com nossos resultados, Londero et al. (2015)²²⁰, em recente trabalho publicado, e a classificação em grupos de risco para recidiva proposta pela ATA não consideram sexo e idade como fatores de risco para recidiva. No entanto, estas variáveis constituem fator de risco para sobrevida segundo alguns sistemas de classificação^{17,19-21,23}, e para recidiva segundo Choi et al. (2014)²²².

O valor prognóstico das metástases linfonodais cervicais não está estabelecido, assim como não existe consenso sobre sua influência sobre sobrevida ou recidiva tumoral^{14,26,30-36}. Segundo Mazzaferri e Jhiang (1994)¹⁴, em indivíduos com carcinoma bem diferenciado da glândula tireoide tratados com tireoidectomia total, a presença de metástases linfonodais cervicais foi fator preditor independente de recidiva e metástase. Sugitani et al. (2004)²²⁹

revelaram que metástases linfonodais aumentam a taxa de recidiva em indivíduos jovens na presença de 5 ou mais linfonodos metastáticos²²⁹, e Wang et al. (2014)²²⁶ descreveram metástases linfonodais cervicais como a mais importante variável para o aumento do risco de recidiva local. No nosso estudo, análises de riscos proporcionais não identificaram presença de linfonodos comprometidos ao diagnóstico inicial como fator de risco para recidiva de CPT na amostra estudada. Tampouco McConahey et al. (1986)²³⁰ ou Shah et al. (1992)²³¹ relataram impacto da presença de metástases cervicais em recidiva tumoral de indivíduos portadores de carcinoma bem diferenciado da glândula tireoide. Condizente com nossos resultados soma-se o fato de metástases linfonodais não estarem incluídas como fatores prognósticos de sobrevida ou recidiva tumoral nos sistemas de classificação de risco AMES, AGES, MSKCC ou EORTC, embora estejam incluídas no estadiamento TNM e no sistema de classificação de risco de recidiva ATA.

A indicação de esvaziamento cervical profilático do compartimento central no intuito de se diminuir risco de recidiva tumoral permanece controversa, dada sua morbidade e falta de evidências de seu benefício em termos de recidiva e sobrevida^{39-42,225,232}. Identificam-se na literatura trabalhos que relatam micrometástases linfonodais em até 90% dos pacientes com ausência de metástases linfonodais cervicais clinicamente aparentes³⁸⁻⁴⁰, porém observa-se discrepância entre a elevada incidência de linfonodos acometidos e a baixa taxa de recidiva linfonodal⁴⁰. Sendo assim, o impacto das micrometástases no prognóstico dos portadores da doença não está claro, uma vez que a maioria destas permanece dormente ou parece regredir, e raramente evoluem para tornar-se doença clínica significativa.

Utilizando PCR em tempo real, avaliamos a expressão de miR-9, miR-10b, miR-21 e miR-146b em tecidos tireóideos de pacientes com CPT recidivado e comparamos aos de pacientes com CPT não recidivado. No início do nosso estudo constatamos que a expressão dos miRNAs estudados não era afetada pela fixação em formalina, mesmo em blocos de parafina armazenados por mais de 10 anos, em concordância com outros autores^{123,173,175-177}.

O fato de podermos utilizar tecidos emblocados em parafina representa enorme vantagem dada a disponibilidade deste material em laboratórios de anatomia patológica. O procedimento de macrodissecção permitiu limitar a contaminação com células adjacentes ao tumor, de forma que a análise da expressão gênica foi realizada quase que exclusivamente do material tumoral.

Neste estudo não observamos diferença estatisticamente significativa entre os níveis de expressão de miR-146b dos pacientes que apresentaram recidiva e dos pacientes que não apresentaram recidiva tumoral. Mir-146b encontra-se superexpresso em CPTs de alto risco¹¹³ e está relacionado à agressividade tumoral e extensão extra-tireóidea²¹¹. Níveis elevados de expressão de miR-146b foram correlacionados a menor sobrevida livre de doença em indivíduos com CPT, sugerindo que este miRNA possa ter valor prognóstico para seguimento destes indivíduos. Chou et al. (2013)²¹² avaliaram 71 indivíduos, sendo 41 considerados livres de doença e 30 com doença ativa. Os autores, no entanto, não fornecem informações sobre o tipo de procedimento cirúrgico realizado, além de mesclar indivíduos com persistência e recidiva tumoral.

Superexpressão de miR-146b foi associada à recidiva de CPT em trabalho publicado por Lee et al., em 2013¹²⁸. No referido estudo, porém, o

tempo de seguimento dos indivíduos considerados livres de recidiva variou entre 12 e 60 meses, com mediana de 24 meses apenas, sendo a casuística composta de somente 9 pacientes com recidiva e 17 sem recidiva.

As funções biológicas do miR-146b diferem de acordo com os tipos de tumores. Reduzindo a expressão de EGFR, miR-146b inibe a migração e invasão em células de linhagem de glioma²³³ e câncer de mama⁹⁷. Em câncer de pâncreas e células de linhagem de glioma, miR-146b inibe a migração e invasão tendo como alvo MMP16, uma protease com atividade proteolítica contra a matriz extracelular²⁰⁵. Em contrapartida, superexpressão de miR-146b aumentou significativamente a migração e invasão das células em CPT²⁰⁹. Deve-se cogitar a possibilidade de 66 amostras tumorais talvez não terem sido suficientes para testar a relação de miR-146b com recidiva tumoral.

Percebemos uma tendência a menor expressão de miR-10b no grupo com recidiva, porém sem significância estatística. Tampouco identificamos na literatura estudos que relacionem expressão alterada de miR-10b com recidiva de CPT. MiR-10b foi descrito inicialmente como superexpresso em linhagens celulares de câncer de mama metastático¹⁷⁸ e está relacionado ao aparecimento de metástases nos carcinomas de mama^{134,234}, nasofaringe¹⁸⁵, fígado^{138,139,142,235}, pâncreas¹⁸⁰ e colorretal¹⁴⁹. Em carcinomas de tireoide, níveis elevados de expressão de miR-10b estão relacionados com metástase em pacientes com carcinoma folicular microinvasivo¹⁸⁶.

Alguns autores relataram diferença de expressão de miR-10b entre o tumor primário e o tumor metastático em carcinoma renal²³⁶ e colorretal¹⁴⁹. No presente trabalho estudamos apenas os tumores primários; não avaliamos a expressão deste miRNA nos linfonodos metastáticos correspondentes.

Demonstramos que a expressão de miR-21 foi significativamente menor em pacientes com CPT com recidiva tumoral, quando comparados aos que não tiveram recidiva. Os mesmos resultados foram recentemente verificados em tumores de próstata metastáticos¹⁴⁷. Em oposição aos nossos resultados, superexpressão de miR-21 foi relacionada à recidiva tumoral em cânceres de cólon¹⁵²⁻¹⁵⁴, bexiga¹⁶³, pulmão¹⁶⁵, mama⁶⁶ e próstata¹⁴⁴; e a metástases linfonodais em câncer de esôfago^{189,190}. Não encontramos na literatura estudos que relacionem miR-21 à recidiva em CPT e acreditamos que nosso trabalho seja o primeiro a identificar miR-21 como fator preditor de recidiva neste tipo de neoplasia.

Nosso estudo identificou menor expressão de miR-9 em tecidos tireóideos de pacientes com recidiva de CPT quando comparados aos de pacientes sem recidiva, e é o primeiro a relacionar baixa expressão de miR-9 à recidiva neste tipo de neoplasia. Assim como neste estudo, outros pesquisadores identificaram miR-9 como supressor tumoral associado ao desenvolvimento de recidiva metastática, porém em câncer gástrico¹⁵⁹ e em carcinoma renal de células claras¹⁵⁵. Em câncer gástrico, miR-9 atua inibindo expressão de Ets 1 (*v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*), membro da família de fatores de transcrição ETS, que participa da invasão tumoral e metástase através da regulação transcricional de alguns genes responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular, migração e invasão²³⁷. O gene que codifica MiR-9 foi descrito como estando hipermetilado (e portanto silencioso) em câncer de pulmão, cabeça e pescoço, cólon, mama e melanoma, relacionando-se ao desenvolvimento de metástases linfonodais nestas neoplasias²⁰¹.

Segundo as análises múltiplas de riscos proporcionais realizadas, miR-9 e miR-21 foram considerados fatores de risco associados à recidiva independentes das demais variáveis também consideradas relevantes para recidiva – tamanho tumoral, extensão extra-tireóidea, risco elevado segundo as classificações ATA e MSKCC e estadios TNM III ou IV.

Aventamos a hipótese de haver relação entre os níveis de expressão dos miRNAs estudados e o intervalo de tempo até a ocorrência de recidiva, conjecturando relacionar valor de expressão dos miRNAs a recidivas mais precoces. Não observamos, no entanto, correlação entre os níveis de expressão de miR-9 e miR-21 e o intervalo de tempo até a ocorrência de recidiva.

Tendo em vista os resultados obtidos e os numerosos supracitados trabalhos publicados, podemos inferir que existem múltiplas funções para miR-9, miR-10b, miR-21 e miR-146b em distintos microambientes. Com base nos trabalhos disponíveis na literatura e nos nossos resultados, observamos um papel contexto-dependente para os diferentes miRNAs em metástase e recidiva entre os diversos tipos de câncer. Um único miRNA pode regular a expressão de múltiplos alvos em um microambiente específico e, em diferentes contextos celulares e teciduais, o mesmo miR pode exibir diversas funções dependendo dos seus mRNAs alvos diretos²³⁸. Concomitantemente, mais do que um miRNA pode atuar sobre um único alvo.

Invasão tumoral e metástase são processos complexos, compostos de várias etapas, e evidências comprovam o envolvimento de miRNAs nestes processos. Os resultados do presente estudo sugerem que miR-9 e miR-21 podem ser considerados fatores de risco para recidiva de CPT independentes e

significantes. Serão necessários estudos complementares com maior número de indivíduos para a confirmação destes dados. Os resultados apresentados acrescentam informação sobre o envolvimento dos miRNAs em metástase de CPT. O desafio que se impõe, a seguir, é de elucidar os mecanismos moleculares específicos através dos quais estes miRNAs regulam processos associados à recidiva tumoral em CPT. Dando continuidade a este estudo, pretendemos averiguar os possíveis alvos de miR-9 e miR-21 em CPT, considerando a perspectiva de utilização destes miRNAs como alvos terapêuticos. Seguindo esta mesma linha de pesquisa, avaliar se a identificação de miRNAs associados à recidiva em amostras de aspirados citológicos obtidos por punção aspirativa por agulha fina se faz possível, o que seria de grande valia para a prática clínica uma vez que acrescentaria valor prognóstico a este método diagnóstico.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Todos os objetivos propostos para este estudo foram atingidos.

Segundo análise de riscos proporcionais univariada, tamanho tumoral, presença de extensão extra-tireóidea, estadio TNM e risco de recidiva ATA constituíram fatores de risco para recidiva de CPT. No entanto, idade, sexo, subtipos histológicos, risco MSKCC-NY, presença de multicentricidade, invasão vascular ou perineural e metástase linfonodal cervical, não foram considerados fatores de risco para recidiva de acordo com esta análise. Comparando os níveis de expressão de miR-9, miR-10b, miR-21 e miR-146b em tecidos de tumor primário de tireoide, fixados em formalina e incluídos em parafina, de indivíduos com e sem recidiva tumoral, observamos que os níveis de expressão de miR-9 e de miR-21 são significativamente menores em pacientes com CPT e recidiva tumoral, quando comparados aos que não tiveram recidiva. Percebemos uma tendência a menor expressão de miR-10b no grupo com recidiva, porém sem significância estatística. Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de expressão de miR-146b entre os dois grupos de pacientes.

MiR-9 e miR-21 foram identificados como fatores preditores de recidiva em CPT de acordo com as análises multivariada de riscos proporcionais, e podem ser considerados como potenciais biomarcadores moleculares no seguimento dos pacientes. Este é o primeiro estudo a relacionar baixa expressão de miR-9 e miR-21 à recidiva neste tipo de neoplasia.

7 ANEXOS

Anexo A - Sistema de Estadiamento TNM para o Carcinoma Papilífero da Tireoide, proposto pela “Union Internationale Contre le Cancer” (UICC), 7ª Edição, 2009¹⁷

Tumor primário (T):

TX: O tumor primário não pode ser avaliado

T0: Ausência de evidência de tumor primário

T1: Tumor de 2 cm ou menos em seu maior diâmetro, limitado à tireoide

T1a: Tumor de 1 cm ou menos em seu maior diâmetro, limitado à tireoide

T1b: Tumor de mais de 1 cm, mas não mais de 2 cm em seu maior diâmetro, limitado à tireoide

T2: Tumor de mais de 2 cm, mas não mais que 4 cm, em seu maior diâmetro, limitado à tireoide.

T3: Tumor de mais de 4 cm em seu maior diâmetro e limitado à tireoide ou qualquer tumor com extensão extratireóidea mínima (ex.: extensão para músculo esternocleidomastóideo ou tecidos moles peritireóideos)

T4a: Tumor de qualquer diâmetro que se estende além da cápsula tireóidea e invade tecido celular subcutâneo, laringe, traquéia, esôfago ou nervo laríngeo recorrente

T4b: Tumor de qualquer diâmetro que invade fáscia pré-vertebral, envolve artéria carótida ou vasos mediastinais

Linfonodos Regionais (N):

NX: Linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0: Ausência de metástases para linfonodos regionais

N1: Metástase para linfonodos regionais:

N1a: Metástase para linfonodos do nível VI, pré-traqueais, para-traqueais ou pré-laríngeos

N1b: Metástase para linfonodos laterais unilaterais, bilaterais ou contralaterais ou para linfonodos do mediastino superior

Metástases Distantes (M):

M0: Ausência de metástases a distância

M1: Presença de metástases a distância

Grupos de Estádios:**Pacientes com menos de 45 anos**

Estádio I	qualquer T	qualquer N	M0
Estádio II	qualquer T	qualquer N	M1

Pacientes com 45 anos ou mais

Estádio I	T1	N0	M0.
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T3	N0	M0
	T1	N1a	M0
	T2	N1a	M0
	T3	N1a	M0
Estádio IVA	T4a	N0	M0
	T4a	N1a	M0
	T1	N1b	M0
	T2	N1b	M0
	T3	N1b	M0
	T4a	N1b	M0
Estádio IVB	T4b	qualquer N	M0
Estádio IVC	qualquer T	qualquer N	M1

Anexo B – Grupos de risco baseados em fatores prognósticos, segundo classificação do *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center – New York* (MSKCC-NY)

Fatores prognósticos	Baixo	Intermediário		Alto
Idade (anos)	< 45	< 45	> 45	> 45
Tamanho tumoral (cm)	< 4	> 4	< 4	> 4
Extensão extratireóidea	Ausente	Presente	Ausente	Presente
Metástase a distância	M0	M+	M0	M+
Grau/tipo histológico	Papilífero	Folicular e/ou alto grau	Papilífero	Folicular e/ou alto grau

NOTA: M0: ausência de metástase a distância; M+: presença de metástase a distância

Anexo C – Grupos de risco baseados em fatores prognósticos, segundo classificação da *American Thyroid Association* (ATA)

Pacientes de baixo risco possuem as seguintes características:

1. Ausência de metástases locais ou a distância
2. Ressecção completa do tumor macroscópico
3. Ausência de invasão tumoral de tecidos ou estruturas locorregionais
4. Tumor sem histologia agressiva (por exemplo: células altas, insular ou carcinoma de células colunares) ou invasão vascular
5. E, caso I^{131} seja dado, não exista captação fora do leito tireóideo no primeiro exame de Pesquisa de Corpo Inteiro realizado após o tratamento

Pacientes de risco intermediário possuem quaisquer das seguintes características:

1. Invasão tumoral dos tecidos moles peritireóideos microscópica à cirurgia inicial
2. Metástases linfonodais cervicais ou captação de I^{131} fora do leito tireóideo no primeiro exame de Pesquisa de Corpo Inteiro realizado após ablação do remanescente tireóideo
3. Tumor com histologia agressiva ou invasão vascular

Pacientes de alto risco possuem quaisquer das seguintes características:

1. Invasão tumoral macroscópica
2. Ressecção incompleta do tumor
3. Metástase a distância
4. E possivelmente, níveis séricos de tireoglobulina desproporcionais ao verificado no exame de Pesquisa de Corpo Inteiro realizado após o tratamento

Anexo D - Dados clínicos, patológicos e operações realizadas dos pacientes que apresentaram recidiva tumoral

Caso	Paciente	Sexo	Idade quando operado (anos)	Cirurgia	Data da cirurgia	Tamanho do tumor (cm)	Invasão vascular	Invasão perineural	Extensão extra-tumoral	Multicentricidade	Variante histológica	Classificação TNM	Estadio TNM	Risco ATA	Risco MSKCC-NY	Tempo até recidiva (meses)	Tempo de seguimento (meses) até 08/09/2014
1	AMNL	F	59	TT EC II a V dire VI bilat EC dir, II a VI esq	29.03.10 19.06.13 14.08.14	2,5	S	S	S	N	clássica	pT3N0M0	III	I	A	38	59,4
2	CSRM	F	45	TT + EC II a V esq e VI bilat EC II a V esq	29.09.11 20.10.12	0,7	N	N	S	N	folicular	pT3pN1M0	IV A	I	I	12	41,1
3	CSRF	F	53	TT EC II a V esq EC VI bilat	25.09.13 13.11.14 04.11.15	1	S	N	N	N	clássica	pT1aM0	I	I	I	13	16,9
4	CPP	F	79	TT EC II a V dir	10.11.10 10.06.15	6	S	S	S	S	clássica	pT3N0M0	III	I	A	56	95,0
5	FFG	F	25	TT EC II a V esq	06.05.07 18.09.13	2,3	N	S	S	S	clássica	pT3N0M0	I	I	I	76	94,7
6	FLL	F	46	TT EC II a V dire VI bilat	12.12.06 16.02.12	0,7	N	N	N	N	clássica	pT1aM0	I	B	I	70	99,5
7	HTSS	F	56	TT EC II a IV dire VI bilat	31.01.07 04.11.13	2,6	N	N	S	N	folicular	pT3N0M0	III	I	A	81	97,8
8	JBL	F	23	TT + EC II a VI bil EC III a VI dire e II a IV esq	20.04.09 06.06.13	3	N	N	N	N	clássica	pT2pN1M0	I	B	B	49	70,8
9	LCDS	F	30	TT EC VI e VII bilat	07.07.04 14.07.10	2,5	N	N	N	S	clássica	pT2N0M0	I	B	B	72	129,1
10	LACB	M	38	TT + EC II a V esq e VI bilat EC II a IV esq	14.08.09 05.09.10	2	N	N	S	S	clássica	pT3pN1aM0	I	I	I	12	67,0
11	MJP	M	35	TT + EC VI bilat EC II a VI esq EC II a VI dir	03.10.05 30.03.14 16.09.15	4,2	S	N	N	S	clássica	pT3pN1aM0	I	I	I	101	114,0
12	MFLUB	F	39	TT + EC VI bilat EC II a IV dir	05.10.06 17.01.14	0,8	N	S	S	S	clássica	pT3pN1aM0	I	I	I	87	101,8
13	MSPM	F	47	TP (LD + istmo) TP (LE) EC II a VI dir	12.09.07 02.07.08 04.06.09	0,7	S	N	S	N	folicular	pT3N0M0 bócio	III	I	A	12	90,4
14	MASG	F	46	TT EC II a V dir	21.11.11 14.01.15	2,7	n/a	n/a	S	S	clássica	pT4aM0	IV A	I	A	37	39,3
15	MIVS	F	61	TT EC VI e VII bilat	26.10.11 19.11.15	2,3	S	S	S	S	folicular	pT3N0M0	III	I	A	36	40,2
16	MSP	F	55	TT EC II a V esq	11.05.08 21.08.11	2,5	N	N	N	S	clássica	pT2N0M0	II	B	I	39	82,3
17	MFEMO	F	47	TT EC II a V esq	13.11.14 11.12.15	0,9	S	N	S	S	clássica	pT3N0M0	III	I	A	12	3,1
18	SD	F	40	TP (LE + istmo) TP (LD) EC II a V esq e VI bilat	09.10.05 04.08.14 21.09.15	0,8	N	N	N	N	clássica	pT1aM0 hiperplasia folicular	I	B	B	119	113,8
19	DP	F	60	TT	28.05.12	5,5	S	N	S	N	clássica	pT3N0M0	III	I	A	38	33,0

NOTA: F: feminino; M: masculino; TT: tireoidectomia total; TP: tireoidectomia parcial; EC: esvaziamento cervical; dir: direita; esq: esquerda; bilat: bilateral; LD: lobo direito; LE: lobo esquerdo; S: sim; N: não; n/a: não aplicável; I: intermediário; B: baixo; A: alto

Anexo E - Dados clínicos, patológicos e operações realizadas dos pacientes que não apresentaram recidiva tumoral

Grupo sem recidiva	Paciente	Sexo	Idade qdo operado (anos)	Cirurgia	Data da cirurgia	Tamanho do tumor (cm)	Invasão vascular	Invasão perineural	Extensão extra-tiroidea	Multicentricidade	Variante histológica	Classificação TNM	Estadio TNM	Risco ATA	Risco MSKCC-NY	Tempo de seguimento (meses) até 06/09/2014
20	ABN	M	39	TT	18.03.02	0,8	N	N	N	N	clássica	pT1aNO0	I	B	I	157,2
21	ARI	M	42	TT	18.01.02	0,4	S	N	S	S	clássica	pT3NO0	I	I	I	159,1
22	AMGC	F	60	TT	11.12.03	1	S	N	S	S	clássica e foliolar	pT3NO0	III	I	A	136,1
23	AMMPT	F	39	TT	13.03.03	1	S	N	S	N	clássica	pT3NO0	I	I	I	145,2
24	CACR	F	41	TT	26.09.02	1,8	N	N	S	S	clássica	pT3NO0	I	I	I	150,8
25	CPB	F	33	TT	05.04.02	1	S	N	S	N	foliolar	pT3NO0	I	I	I	156,6
26	DMM	F	57	TT	22.06.95	0,6	N	N	N	S	clássica	pT1aNO0	I	B	I	239,2
27	DFVG	M	22	TT	07.11.02	0,7	N	N	N	N	clássica	pT1aNO0	I	B	I	149,4
28	DAP	M	66	TT	01.10.03	1	N	N	N	N	foliolar	pT1aNO0	I	B	I	138,4
29	DCA	F	32	TT	20.10.00	2	N	N	S	S	clássica	pT3NO0	I	I	I	174,3
30	EAM	M	58	TT	19.08.02	0,3	N	N	N	N	foliolar	pT1aNO0	I	B	I	152,0
31	EF	F	36	TT	24.05.02	1,6	N	N	N	N	clássica	pT1bNO0	I	B	B	154,9
32	EBS	F	71	TT	07.04.03	0,6	N	N	N	N	clássica	pT1aNO0	I	B	I	144,3
33	FLSS	F	35	TT + EC VI bilat	24.10.03	0,7	N	N	S	N	clássica	pT3pN1aM0	I	I	I	137,7
34	FMZ	F	53	TT	12.01.04	2	S	N	N	S	foliolar	pT1bNO0	I	I	I	135,0
35	JAVS	F	44	TT	03.05.02	0,6	N	N	N	S	clássica e foliolar	pT1aNO0	I	B	B	155,6
36	LJI	F	57	TT	05.04.02	1	S	N	S	S	clássica e foliolar	pT3NO0	III	I	A	156,6
37	LAFS	F	69	TT	10.10.02	0,5	N	N	N	N	clássica	pT1aNO0	I	B	I	150,3
38	LCTM	F	41	TT	21.02.03	0,8	N	N	N	N	foliolar	pT1aNO0	I	B	B	145,8
39	LMB	F	38	TT	27.10.03	1,4	N	N	N	N	clássica	pT1bNO0	I	B	B	137,6
40	LPR	F	57	TT	22.04.03	0,8	S	N	N	N	clássica	pT1aNO0	I	I	I	143,8
41	LASF	M	40	TT	30.10.03	6,5	N	N	N	N	clássica	pT3NO0	I	B	I	137,5
42	MCLL	F	26	TT + EC VI bilat	12.06.02	0,9	N	S	N	N	clássica	pT1apNO0	I	B	B	154,3
43	MCPP	F	43	TT	11.12.02	0,4	N	N	N	N	clássica	pT1aNO0	I	B	B	148,2
44	MMV	F	48	TT	16.12.02	0,9	S	N	N	S	clássica e foliolar	pT1aNO0	I	I	I	148,1
45	MAR	F	36	TT	11.11.02	0,5	N	N	N	S	foliolar	pT1aNO0	I	B	B	149,2
46	MKK	F	57	TT	03.04.03	4	S	S	S	S	clássica e foliolar	pT3NO0	III	I	A	144,5
47	MNA	F	64	TT	01.04.04	1	N	N	S	N	clássica	pT3NO0	III	I	A	132,3
48	MAB	F	34	TT	27.10.03	0,3	N	N	N	N	clássica	pT1aNO0	I	B	B	137,6
49	PMDM	M	48	TT	07.01.03	1,3	S	N	N	N	clássica	pT1bNO0	I	I	I	147,3
50	RTC	F	34	TT + EC II a IV bilat	27.11.03	2,5	S	S	S	N	clássica	pT3pN1bM0	I	I	I	136,5
51	RH	M	35	TT + EC VI bilat	22.05.02	4	S	S	S	S	clássica	pT3pN1aM0	I	I	I	155,0
52	RCW	F	70	TT	06.02.03	0,3	N	N	N	N	foliolar	pT1aNO0	I	B	I	146,3
53	SMN	F	59	TT	27.06.03	1,7	N	N	N	S	clássica	pT1bNO0	I	B	I	141,6
54	TR	F	47	TT	30.01.04	0,7	N	N	N	N	clássica	pT1aNO0	I	B	I	134,4
55	TMI	F	53	TT + EC VI bilat	25.11.02	0,7	N	N	N	N	clássica	pT1apNO0	I	B	I	148,8
56	MRS	F	59	TT	12.06.03	1,2	N	S	S	N	clássica	pT1bNO0	III	I	A	142,1
57	EMP	F	53	TT	04.12.03	1,6	N	N	N	N	clássica	pT1bNO0	I	B	I	136,3
58	OFO	F	25	TT + EC II a IV dir e VI bilat	13.12.96	0,5	S	N	S	S	clássica	pT3pN1bM0	I	I	I	221,2
59	MSBS	F	37	TT	20.08.02	1,7	N	N	N	S	clássica	pT1bNO0	I	B	B	152,0
60	MAHPL	F	48	TT	17.11.00	1,1	N	N	N	N	clássica	pT1bNO0	I	B	I	173,4
61	HE	F	52	TT	14.01.00	0,3	N	N	N	N	clássica	pT1aNO0	I	B	I	183,6
62	MLPY	F	54	TT	26.08.04	0,7	N	N	N	N	clássica	pT1aNO0	I	B	I	127,4
63	LARF	M	35	TT + EC II a IV dir e VI bilat	30.01.02	2,5	S	N	S	S	foliolar	pT3pN1aM0	I	I	I	158,7
64	AMS	F	62	TT	17.05.02	1,2	N	N	N	N	clássica	pT1bNO0	I	B	I	155,2
65	CBB	F	48	TT	14.02.03	0,5	S	N	S	N	foliolar	pT3NO0	III	I	A	146,1
66	ECS	F	24	TT	02.11.01	0,5	N	N	N	N	clássica	pT1aNO0	I	B	B	161,7

NOTA: F: feminino; M: masculino; TT: tireoidectomia total; EC: esvaziamento cervical; dir: direita; bilat: bilateral; S: sim; N: não; I: intermediário; B: baixo; A: alto

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Ruhl J, Howlader N, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Cronin K, Feuer EJ, Stinchcomb DG, Edwards BK (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/, based on November 2009 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2010.
2. Mazzaferri EL, Kloos RT. Clinical review 128: current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:1447–63.
3. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. *Cancer.* 1998;83:2638–48.
4. [NCI] National Cancer Institute Surveillance Epidemiology and End Results Database, US National Institutes of Health. URL. Disponível em: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>.
5. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC CancerBase No. 5. version 2.0, IARCPress, Lyon, 2004.
6. Coeli CM, Brito AS, Barbosa FS, Ribeiro MG, Sieiro APAV, Vaisman M. Incidência e mortalidade por câncer de tireóide no Brasil. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;49(4):503-9.
7. Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet.* 2003;361:501–11.
8. Chan JK, Saw D. The grooved nucleus: A useful diagnostic criterion of papillary carcinoma of the thyroid. *Am J Surg Pathol.* 1986;10:672-9.

9. Batsakis JG, Nishiyama RH, Rich CR. Microlithiasis (calcospherites) and carcinoma of the thyroid gland. *Arch Pathol.* 1960;69:493-8.
10. Klink GH, Winship T. Psammoma bodies and thyroid cancer. *Cancer.* 1959;12:656-62.
11. Livolsi V. Papillary neoplasms of the thyroid: Pathologic and prognostic features. *Am J Clin Pathol.* 1992;97:426-34.
12. Robbins J, Merino MJ, Boice JD Jr, Ron E, Ain KB, Alexander HR, Norton JA, Reynolds J. Thyroid cancer: A lethal endocrine neoplasm. *Ann Intern Med.* 1991; 115(2):133-47.
13. Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis R: Tumors of the thyroid gland. Atlas of Tumor Pathology, 3rd series. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1992.
14. Mazzaferri EL, Jhiang S. Long term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med.* 1994;97:418-28.
15. Gilliland FD, Hunt WC, Morris DM, Key CR. Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 151,698 cases from Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program 1973-1991. *Cancer.* 1997;79:564-73.
16. Revised American Thyroid Association Management Guidelines For Patients With Thyroid Nodules And Differentiated Thyroid Cancer, November 2009 The American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2009;19(11):1167-214.
17. Sobin LH, Wittekind C, eds. UICC: TNM classification of malignant tumors, 7th ed. New York: Wiley-Liss, 2009.
18. Byar DP, Green SB, Dor P, Williams ED, Colon J, van Gilse HA, Mayer M, Sylvester RJ, Van Glabbeke M. A prognostic index for thyroid

- carcinoma. A study of the E.O.R.T.C. Thyroid Cancer Cooperative Group. *Eur J Cancer*. 1979;15:1033-41.
19. Hay ID, Grant CS, Taylor WF, MaConahey WM. Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobar resection in papillary thyroid carcinoma: a retrospective analysis of survival outcome using a novel prognostic scoring system. *Surgery*. 1987;102:1088-95.
 20. Cady B, Rossi R. An expanded view of risk group definition in differentiated thyroid carcinoma. *Surgery*. 1988;104:947-53.
 21. Hay ID, Bergstrahl EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. *Surgery*. 1993;114:1050-8.
 22. Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Patterns of failure in differentiated carcinoma of the thyroid based on risk groups. *Head Neck*. 1998;20:26-30.
 23. Shaha A, Loree TR, Shah JP. Intermediate risk group for differentiated carcinoma of the thyroid. *Surgery* 1994;116:1036–1042.
 24. Wong RM, Bresee C, Braunstein GD. Comparison with Published Systems of a New Staging System for Papillary and Follicular Thyroid Carcinoma. *Thyroid*. 2013;23(5):566-74.
 25. Scheumann GF, Gimm O, Wegener G, Hundeshagen H, Dralle H. Prognostic significance and surgical management of locoregional lymph node metastases in papillary thyroid cancer. *World J Surg*. 1994;18:559-67.
 26. Grebe SK, Hay ID. Thyroid cancer nodal metastases: biological significance and therapeutic considerations. *Surg Oncol Clin N Am*. 1996;5:43-63.
 27. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Sherman SI, Tuttle RM. American Thyroid

- Association Guidelines Taskforce. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2006;16:109-42.
28. Hay ID, Thompson GB, Grant CS, Bergstralh EJ, Dvorak CE, Gorman CA, Maurer MS, McIver B, Mullan BP, Oberg AL, Powell CC, van Heerden JA, Goellner JR. Papillary thyroid carcinoma managed at the Mayo Clinic during six decades (1940-1999): temporal trends in initial therapy and long-term outcome in 2444 consecutively treated patients. *World J Surg*. 2002;26:879-85.
 29. Pellegriti G, Scollo C, Lumera G, Regalbuto C, Vigneri R, Belfiore A. Clinical behaviour and outcome of papillary thyroid cancers smaller than 1,5 cm in diameter: study of 299 cases. *J Clin Endocr Metabol*. 2004;89:3713-20.
 30. Sato N, Oyamatsu M, Koyama Y, Emura I, Tamiya Y, Hatakeyama K. Do the level of nodal disease according to the TNM classification and the number of involved cervical nodes reflect prognosis in patients with differentiated carcinoma of the thyroid gland? *J Surg Oncol*. 1998;69:151-5.
 31. Wada N, Suganuma N, Nakayama H, Masudo K, Rino Y, Masuda M, Imada T. Microscopic regional lymph node status in papillary thyroid carcinoma with and without lymphadenopathy and its relation to outcomes. *Langenbecks Arch Surg*. 2007;392:417-22.
 32. Hughes CJ, Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Impact of lymph node metastasis in differentiated carcinoma of the thyroid: a matched-pair analysis. *Head and Neck*. 1996;18:127-32.
 33. Ito Y, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, Mija A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Kuma K, Miyauchi A. Clinical significance of metastasis to the central compartment from papillary microcarcinoma of the thyroid. *World J Surg*. 2006;30:91-9.

34. Lundgren CI, Hall P, Dickman PW, Zedenius J. Clinically significant prognostic factors for differentiated thyroid carcinoma: a population-based, nested case-control study. *Cancer*. 2006;106:524-31.
35. Beasley NJP, Lee J, Eski S, Walfish P, Witterick I, Freeman JL. Impact of nodal metastases on prognosis in patients with well-differentiated thyroid cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002;128:825-8.
36. Bardet S, Malville E, Rame JP, Babin E, Samama G, Raucourt D, Michels JJ, Reznik Y, Amar MH. Macroscopic lymph-node involvement and neck dissection predict lymph-node recurrence in papillary thyroid carcinoma. *Eur J Endocr*. 2008;158:551-60.
37. Lee J, Song Y, Soh EY. Prognostic Significance of the Number of Metastatic Lymph Nodes to Stratify the Risk of Recurrence. *World J Surg*. 2014;38:858–62.
38. Noguchi S, Noguchi A, Murakami N. Papillary carcinoma of the thyroid. I. Developing pattern of metastasis. *Cancer*. 1970;26:1053-60.
39. Costa S, Giugliano G, Santoro L, Ywata de Carvalho A, Massaro MA, Gibelli B, de Fiori E, Grosso E, Ansarin M, Calabrese L. Role of prophylactic central neck dissection in cN0 papillary thyroid cancer. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*. 2009;29:61-9.
40. Wada N, Duh QY, Sugino K, Iwasaki H, Kameyama K, Mimura T, Ito K, Takami H, Takanashi Y. Lymph node metastasis from 259 papillary thyroid microcarcinomas. *Ann Surg*. 2003;237(3):399-407.
41. Nixon IJ, Ganly I, Patel SG, Palmer FL, Whitcher MM, Tuttle RM, Shaha A, Shah JP. Thyroid lobectomy for treatment of well differentiated intrathyroid malignancy. *Surgery*. 2012;151:571-9.
42. Takami H, Ito Y, Okamoto T, Onoda N, Noguchi H, Yoshida A. Revisiting the Guidelines Issued by the Japanese Society of Thyroid Surgeons and Japan Association of Endocrine Surgeons: A Gradual Move Towards Consensus Between Japanese and Western Practice in

- the Management of Thyroid Carcinoma. *World J Surg.* 2014;38:2002–10.
43. Ito Y, Jikuzono T, Higashiyama T, Asahi S, Tomoda C, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Kuma K, Miyauchi A. Clinical significance of lymph node metastasis of thyroid papillary carcinoma located in one lobe. *World J Surg.* 2006;30:1821-8.
 44. Ito Y, Fukushima M, Tomoda C, Inoue H, Kihara M, Higashiyama T, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Miyauchi A. Prognosis of patients with papillary thyroid carcinoma having clinically apparent metastasis to the lateral compartment. *Endocrine Journal.* 2009;56(6):759-66.
 45. Babiniotis G. *Dicionário de grego moderno.* 2a ed. Atenas: Lexikolotias; 2002.
 46. Chiang AC, Massague J. Molecular Basis of Metastasis. *N Engl J Med.* 2008;359:2814-23.
 47. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28:15–33.
 48. Geiger TR, Peeper DS. Metastasis mechanisms. *Biochim. Bio- phys. Acta.* 2009;1796:293–308.
 49. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science.* 2011;331:1559–64.
 50. Vleminckx K, Vakaet Jr L, Mareel M, Fiers W, Van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell.* 1991;66(1):107-19.
 51. Wu Y, Lin Y, Liu H, Li J. Inhibition of invasion and up-regulation of E-cadherin expression in human malignant melanoma cell line A375 by epigallocatechin-3-gallate. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 2008;28:356–9.

52. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*. 1998;392:190-3.
53. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:442-54.
54. Woessner Jr, JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J*. 1991;5(8):2145–54.
55. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):161–74.
56. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobniak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, Guise TA, Massagué J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. 2003;3:537-49.
57. Baldini E, Toller M, Graziano FM, Russo FP, Pepe M, Biordi L, Marchioni E, Curcio F, Ulisse S, Ambesi-Impiombato FS, D'Armiento M. Expression of matrix metalloproteinases and their specific inhibitors in normal and different human thyroid tumor cell lines. *Thyroid*. 2004;14:881–8.
58. Minn AJ, Kang Y, Serganova I, Grupta GP, Giri DD, Doubrovin M, Ponomarev V, Gerald WL, Blasberg R, Massagué J. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest*. 2005;115:44- 55.
59. Yeh MW, Rougier JP, Park JW, Duh QY, Wong M, Werb Z, Clark OH. 2006 Differentiated thyroid cancer cell invasion is regulated through epidermal growth factor receptor-dependent activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2/gelatinase A. *Endocrine-Related Cancer*. 2006;13:1173–83.
60. Deryugina EI, Quigley IP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*. 2006;25:9–34.

61. Lopez-Otin C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:800-8.
62. Martin MD, Matrisian LM. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26:717-24.
63. Frasca F, Nucera C, Pellegriti G, Gangemi P, Attard M, Stella M, Loda M, Vella V, Giordano C, Trimarchi F, Mazzon E, Belfiore A, Vigneri R. BRAF(V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2008;15:191–205.
64. Cavalcheiro BG, Junqueira CR, Brandão LG. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in medullary thyroid carcinoma: prognostic implications. *Head and Neck*. 2010;32(1):58-67.
65. Shi M, Liu D, Duan H, Shen B, Guo N. Metastasis-related miRNAs, active players in breast cancer invasion, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29:785-99.
66. Ota D, Mimori K, Yokobori T, Iwatsuki M, Kataoka A, Masuda N, Ishii H, Ohno S, Mori M. Identification of recurrence-related microRNAs in the bone marrow of breast cancer patients. *International Journal of Oncology*. 2011;38:955-62.
67. Leite KRM, Tomiyama A, Reis ST, Sousa-Canavez JM, Sañudo A, Dall'Oglio MF, Camara-Lopes LH, Srougi M. MicroRNA-100 Expression is Independently Related to Biochemical Recurrence of Prostate Cancer. *The journal of urology*. 2011;185:1118-22.
68. Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br. J. Cancer*. 2006;94:776–80.
69. Negrini M, Ferracin M, Sabbioni S, Croce CM. MicroRNAs in human cancer: from research to therapy. *J Cell Sci*. 2007;120:1833–40.
70. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843–54.

71. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75:855–62.
72. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408:86–9.
73. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294:858–62.
74. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294:862–4.
75. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006;13:1097–101.
76. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002;21:4663–70.
77. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425:415–9.
78. Zeng Y, Cullen BR. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA*. 2003;9:112–23.
79. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17:3011–6.
80. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303:95–8.

81. Tang G. siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends in Biochemical Sciences*. 2005;30(2):106–14.
82. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 2002;297:2056–60.
83. Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol. Cell*. 2002;9:1327–33.
84. Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*. 2002;297(5589):2053–56.
85. Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 2004;304(5670):594–6.
86. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136:215–33.
87. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010;466:835–40.
88. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19:92–105.
89. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15–20.
90. Jayaswal V, Lutherborrow M, Ma DD, Yang YH. Identification of microRNA-mRNA modules using microarray data. *BMC Genomics*. 2011;12:138.
91. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that

some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs.

Nature. 2005;433:769–73.

92. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:15524–9.
93. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(9):2999–3004.
94. Lamy P, Andersen CL, Dyrskjot L, Topping N, Orntoft T, Wiuf C. Are microRNAs located in genomic regions associated with cancer? *Br J Cancer*. 2006;95:1415–8.
95. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*. 2009;10:704–14.
96. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Molecular Oncology*. 2012;6(6):590-610.
97. Hurst DR, Edmonds MD, Welch DR. Metastamir: The field of metastasis-regulatory microRNA is spreading. *Cancer Res*. 2009;69:7495–8.
98. Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Research*. 2006;66(15):7390–4.
99. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A microRNA signature associated

- with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;353(17):1793–801.
100. Michael MZ, O'Connor SM, Van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific MicroRNAs in colorectal neoplasia. *Molecular Cancer Research*. 2003;1(12):882–91.
 101. Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(10):3627–32.
 102. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Research*. 2004;64(11):3753–6.
 103. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research*. 2005;65(16):7065–70.
 104. Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;334(4):1351–8.
 105. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Research*. 2005;65(14):6029–33.
 106. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagry R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:19075–80.

107. Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:1600-8.
108. Pallante P, Visone R, Ferracin M, Ferraro A, Berlingieri MT, Troncone G, Chiappetta G, Liu CG, Santoro M, Negrini M, Croce CM, Fusco A. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocrine-Related Cancer.* 2006;13(2):497–508.
109. Tetzlaff MT, Liu A, Xu X, Master SR, Baldwin DA, Tobias JW, Livolsi VA, Baloch ZW. Differential expression of miRNAs in papillary thyroid carcinoma compared to multinodular goiter using formalin fixed paraffin embedded tissues. *Endocrine Patholog.* 2007;18(3):163-73.
110. Chen YT, Kitabayashi N, Zhou XK, Fahey III TJ, Scognamiglio T. MicroRNA analysis as a potential diagnostic tool for papillary thyroid carcinoma. *Modern Pathology.* 2008;21(9):1139–46.
111. Wilson C. Cancer: microRNA expression provides clues about the aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Nature Reviews Endocrinology.* 2010;6(8):416.
112. Sheu SY, Grabellus F, Schwertheim S, Handke S, Worm K, Schmid KW. Lack of correlation between BRAF V600E mutational status and the expression profile of a distinct set of miRNAs in papillary thyroid carcinoma. *Hormone and Metabolic Research.* 2009;41(6):482–7.
113. Chou CK, Chen RF, Chou FF, Chang HW, Chen YJ, Lee YF, Yang KD, Cheng JT, Huang CC, Liu RT. MiR-146b is highly expressed in adult papillary thyroid carcinomas with high risk features including extrathyroidal invasion and the BRAF mutation. *Thyroid.* 2010;20(5):489–94.
114. Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, Frilling A, Eng C. A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2006;91(9):3584–91.

115. Visone R, Pallante P, Vecchione A, Cirombella R, Ferracin M, Ferraro A, Volinia S, Coluzzi S, Leone V, Borbone E, Liu CG, Petrocca F, Troncone G, Calin GA, Scarpa A, Colato C, Tallini G, Santoro M, Coce CM, Fusco A. Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. *Oncogene*. 2007;26(54):7590–5.
116. Braun J, Hoang-Vu C, Dralle H, Hüttelmaier S. Downregulation of microRNAs directs the EMT and invasive potential of anaplastic thyroid carcinomas. *Oncogene*. 2010;29(29):4237–44.
117. Ricarte-Filho JCM, Fuziwara CS, Yamashita AS, Rezende E, Da-Silva MJ, Kimura ET. Effects of let-7 microRNA on cell growth and differentiation of papillary thyroid cancer. *Translational Oncology*. 2009;2(4):236–41.
118. Takakura S, Mitsutake N, Nakashima M, Namba H, Saenko VA, Rogounovitch TI, Nakazawa Y, Hayashi T, Ohtsuru A, Yamashita S. Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells. *Cancer Science*. 2008;99(6):1147–54.
119. Mitomo S, Maesawa C, Ogasawara S, Iwaya T, Shibazaki M, Yashima-Abo A, Kotani K, Oikawa H, Sakurai E, Izutsu N, Kato K, Komatsu H, Ikeda K, Wakabayashi G, Masuda T. 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.
120. Israel A, Sharan R, Ruppin E, Galun E. Increased MicroRNA Activity in Human Cancers. *PLoS ONE*. 2009;4(6):e6045.
121. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A micro-RNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:2257–61.

122. Cummins JM, Velculescu VE. Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis. *Oncogene*. 2006;25:6220-7.
123. Sheu SY, Grabellus F, Schwertheim S, Worm K, Preuss MB, Schmid KW. Differential miRNA expression profiles in variants of papillary thyroid carcinoma and encapsulated follicular thyroid tumors. *Br J Cancer*. 2010;102(2):376-82.
124. Xia H, Hui KM. MicroRNAs involved in regulating epithelial–mesenchymal transition and cancer stem cells as molecular targets for cancer therapeutics. *Cancer Gene Therapy*. 2012;19(11):723-30.
125. Pallante P, Visone R, Croce CM, Fusco A. Deregulation of miRNA in follicular cell-derived human thyroid carcinomas. *Endocrine-Related Cancer*. 2010;17:91-104.
126. Schwertheim S, Sheu SY, Worm K, Grabellus F, Schmid KW. Analysis of deregulated miRNAs is helpful to distinguish poorly differentiated thyroid carcinoma from papillary thyroid carcinoma. *Horm Metab Res*. 2009;41:475-81.
127. Braun J, Hüttelmaier S. Pathogenic mechanisms of deregulated microRNA expression in thyroid carcinomas of follicular origin. *Thyroid Research*. 2011;4(Suppl 1):S1.
128. Lee JC, Zhao JT, Clifton-Bligh RJ, Gill A, Gundara JS, Ip JC, Glover A, Sywak MS, Delbridge LW, Robinson BG, Sidhu SB. MicroRNA-222 and microRNA-146b are tissue and circulating biomarkers of recurrent papillary thyroid cancer. *Cancer*. 2013;119:4358-65.
129. Harquail J, Sami Benzina S, Robichaud GA. MicroRNAs and breast cancer malignancy: An overview of miRNA-regulated cancer processes leading to metastasis. *Cancer Biomarkers*. 2012;11: 269–80.
130. Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massagué J. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*. 2008;451:147–52.

131. Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, Egan DA, Li A, Huang G, Klein-Szanto AJ, Gimotty PA, Katsaros D, Coukos G, Zhang L, Puré E, Agami R. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol.* 2008;10:202–10.
132. Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, Teruya-Feldstein J, Reinhardt F, Onder TT, Valastyan S, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J, Weinberg RA. Mir-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol.* 2010;12(3): 247–56.
133. Zhao F-L, Hu G-D, Wang X-F, Zhang X-H, Y-K Zhang Y-K, Yu Z-S. Serum overexpression of microRNA-10b in patients with bone metastatic primary breast cancer. *The Journal of International Medical Research.* 2012;40:859 – 66.
134. Liu Y, Zhao J, Zhang PY, Zhang Y, Sun S-Y, Yu S-Y, Xi Q-S. MicroRNA-10b targets E-cadherin and modulates breast cancer metastasis. *Med Sci Monit.* 2012;18(8):BR299-308.
135. Zhou X, Marian C, Makambi KH, Kostı O, Kallakury BVS, Loffredo CA, Zheng Y-L. MicroRNA-9 as Potential Biomarker for Breast Cancer Local Recurrence and Tumor Estrogen Receptor Status. *PLoS ONE.* 2012; 7(6): e39011. doi:10.1371/journal.pone.0039011.
136. Ahmad A, Sethi S, Chen W, Ali-Fehmi R, Mittal S, Fazlul H Sarkar FH. Up-regulation of microRNA-10b is associated with the development of breast cancer brain metastasis. *Am J Transl Res.* 2014;6(4):384-90.
137. Li Q-J, Zhou L, Yang F, Wang G-X, Zheng H, Wang D-S, He Y; Dou K-F. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through CADM1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Tumor Biol.* 2012;33:1455-65.
138. Huang Y-H, Lin K-H, Chen H-C, Chang M-L, Hsu C-W, Lai MW, Chen TC, Lee WC, Tseng YH, Yeh CT. Identification of Postoperative

- Prognostic MicroRNA Predictors in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE*. 2012;7(5): e37188.
139. Han Z, Chen HY, Fan JW, Wu JY, Tang HM, Peng ZH. Up-regulation of microRNA-155 promotes cancer cell invasion and predicts poor survival of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138:153–61.
 140. Zhu HT, Dong QZ, Sheng YY, Wei JW, Wang G, Zhou HJ, Ren N, Jia HL, Ye QH, Qin LX. MicroRNA-29a-5p Is a Novel Predictor for Early Recurrence of Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma after Surgical Resection. *PLoS ONE*. 2012;7(12): e52393.
 141. Xia H, Ooi LLPJ, Hui KM. MiR-214 Targets b-Catenin Pathway to Suppress Invasion, Stem-Like Traits and Recurrence of Human Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE*. 2012;7(9): e44206.
 142. Yang Z, Miao R, Li G, Wu Y, Robson SC, Yang X, Zhao Y, Zhao H, Zhong Y. Identification of Recurrence Related microRNAs in Hepatocellular Carcinoma after Surgical Resection. *Int. J. Mol. Sci*. 2013;14,1105-18.
 143. Sun Z, Han Q, Zhou N, Wang S, Lu S, Bai C, Robert Chunhua Zhao RC. MicroRNA-9 enhances migration and invasion through KLF17 in hepatocellular carcinoma. *Molecular Oncology*. 2013;7:884-94.
 144. Li T, Li RS, Li YH, Zhong S, Chen YY, Zhang CM, Hu MM, Shen ZS. miR-21 as an Independent Biochemical Recurrence Predictor and Potential Therapeutic Target for Prostate Cancer. *J Urol*. 2012;187:1466-72.
 145. Kobayashi N, Uemura H, Nagahama K, Okudela K, Furuya M, Ino Y, Ito Y, Hirano H, Inayama Y, Aoki I, Nagashima Y, Kubota Y, Ishiguro H. Identification of miR-30d as a novel prognostic maker of prostate cancer. *Oncotarget*. 2012;3(11):1455-71.

146. Barron N, Keenan J, Gammell P, Martinez VG, Freeman A, Masters JR, Clynes M. Biochemical Relapse Following Radical Prostatectomy and miR-200a Levels in Prostate Cancer. *The Prostate*. 2012;72:1193-9.
147. Ren Q, Liang J, Wei J, Basturk O, Wang J, Daniels G, Gellert LL, Li Y, Osman I, Zhao J, Melamed J, Lee P. Epithelial and stromal expression of miRNAs during prostate cancer progression. *Am J Transl Res*. 2014 Jul 18;6(4):329-39.
148. Chang KH, Miller N, Kheirelseid EAH, Ingoldsby H, Hennessy E, Curran CE, Curran S, Smith MJ, Regan M, McAnena OJ, Kerin MJ. MicroRNA-21 and PDCD4 expression in colorectal cancer. *EJSO*. 2011;37:597-603.
149. Li Z, Gu X, Fang Y, Xiang J, Chen Z. MicroRNA expression profiles in human colorectal cancers with brain metastases. *Oncol Lett*. Feb 2012;3(2):346–50.
150. Zhu L, Chen H, Zhou D, Li D, Bai R, Zheng S, Ge W. MicroRNA-9 up-regulation is involved in colorectal cancer metastasis via promoting cell motility. *Med Oncol*. 2012;29:1037–43.
151. Christensen LL, Tobiasen H, Holm A, Schepeler T, Ostensfeld MS, Thorsen K, Rasmussen MH, Birkenkamp-Demtroeder K, Sieber OM, Gibbs P, Lubinski J, Lamy P, Laurberg S, Øster B, Hansen KQ, Hagemann-Madsen R, Byskov K, Ørntoft TF, Andersen CL. MiRNA-362-3p induces cell cycle arrest through targeting of E2F1, USF2 and PTPN1 and is associated with recurrence of colorectal cancer. *Int. J. Cancer*. 2013;133:67–79.
152. Weissmann-Brenner A, Kushnir M, Yanai GL, Aharonov R, Gibori H, Purim O, Kundel Y, Morgenstern S, Halperin M, Niv Y, Brenner B. Tumor microRNA-29a expression and the risk of recurrence in stage II colon cancer. *Int J Oncol*. 2012;40(6):2097-2103.

153. Kjaer-Frifeldt S, Hansen TF, Nielsen BS, Joergensen S, Lindebjerg J, Soerensen FB. The prognostic importance of mir-21 in stage II colon cancer: a population-based study. *British Journal of Cancer*. 2012;107:1169–74.
154. Oue N, Anami K, Schetter AJ, Moehler M, Okayama H, Khan MA, Bowman ED, Mueller A, Schad A, Shimomura M, Hinoi T, Aoyagi K, Sasaki H, Okajima M, Ohdan H, Galle PR, Yasui W, Harris CC. High mir-21 expression from FFPE tissues is associated with poor survival and response to adjuvant chemotherapy in colon cancer. *Int. J. Cancer*. 2014;134:1926–34.
155. Hildebrandt MAT, Gu J, Lin J, Ye Y, Tan W, Tamboli P, Wood CG, Wu X. Hsa-miR-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2010;29:5724–8.
156. Heinzelmann J, Henning B, Sanjmyatav J, Posorski N, Steiner T, Wunderlich H, Gajda MR, Junker K. Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *World J Urol*. 2011;29:367–73.
157. Slaby O, Redova M, Poprach A, Nekvindova J, Iliev R, Radova L, Lakomy R, Svoboda M, Vyzula R. Identification of MicroRNAs Associated with Early Relapse After Nephrectomy in Renal Cell Carcinoma Patients. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2012;51:707–16.
158. Wang Y-Y, Ye Z-Y, Zhao Z-S, Li L, Wang Y-X, Tao H-Q, Wang H-J, He X-J. Clinicopathologic significance of miR-10b expression in gastric carcinoma. *Human Pathology*. 2013;44:1278–85.
159. Zheng L, Qi T, Yang D, Qi M, Li D, Xiang X, Huang K, Tong Q. MicroRNA-9 suppresses the proliferation, invasion and metastasis of gastric cancer cells through targeting cyclin D1 and Ets1. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e55719.

160. Li Z, Lei H, Luo M, Wang Y, Dong L, Ma Y, Liu C, Song W, Wang F, Zhang J, Shen J, Yu J. DNA methylation downregulated mir-10b acts as a tumor suppressor in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2014. DOI 10.1007/s10120-014-0340-8.
161. Laios A, O'Toole S, Flavin R, Martin C, Kelly L, Ring M, Finn SP, Barrett C, Loda M, Gleeson N, D'Arcy T, McGuinness E, Shells O, Sheppard B, O'Leary J. Potential role of miR-9 and miR-223 in recurrent ovarian cancer. *Mol Cancer*. 2008 Apr 28;7:35.
162. Lee H, Park CS, Deftereos G, Morihara J, Stern JE, Hawes SE, Swisher E, Kiviat NB, Feng Q. MicroRNA expression in ovarian carcinoma and its correlation with clinicopathological features. *World Journal of Surgical Oncology*. 2012;10:174.
163. Zaravinos A, Radojicic J, Lambrou GI, Volanis D, Delakas D, Stathopoulos EN, Spandidos DA. Expression of MiRNAs involved in angiogenesis, tumor cell proliferation, tumor suppressor inhibition, epithelial-mesenchymal transition and activation of metastasis in bladder cancer. *The journal of urology*. 2012;188:615-23.
164. Wang M, Chu H, Li P, Yuan L, Fu G, Ma L, Shi D, Zhong D, Tong N, Qin C, Yin C, Zhang Z. Variants in miRNAs Predict Bladder Cancer Risk and Recurrence. *Cancer Res*. 2012;72(23):6173-82.
165. Yang M, Shen H, Qiu C, Ni Y, Wang L, Dong W, Liao Y, Du J. High expression of mir-21 and mir-155 predicts recurrence and unfavorable survival in non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer*. 2013;49:604-15.
166. Xu T, Liu X, Han L, Shen H, Liu L, Shu Y. Up-regulation of mir-9 expression as a poor prognostic biomarker in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Transl Oncol*. 2013 DOI 10.1007/s12094-013-1106-1.

167. Xu S-H, Yang Y-L, Han S-M, Wu Z-H. MicroRNA-9 expression is a prognostic biomarker in patients with osteosarcoma. *World Journal of Surgical Oncology*. 2014;12:195.
168. Lu J, Xu X, Liu X, Peng Y, Zhang B, Wang L, Luo H, Peng X, Li G, Tian W, He M, Li X. Predictive value of miR-9 as a potential biomarker for nasopharyngeal carcinoma metastasis. *British Journal of Cancer*. 2014;110:392-98.
169. Maki K, Yamagata T, Sugita F, Nakamura Y, Sasaki K, Mitani K. Aberrant expression of MIR9 indicates poor prognosis in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2012;158:283–96.
170. Hu Y, Correa AM, Hoque A, Guan B, Ye F, Huang J, Swisher SG, Wu TT, Ajan JA, Xu X-C. Prognostic significance of differentially expressed miRNAs in esophageal cancer. *Int J Cancer*. 2011;128(1):132–143. doi:10.1002/ijc.25330.
171. Qiu S, Lin S, Hu D, Feng Y, Tan Y, Peng Y. Interactions of miR-323/miR-326/miR-329 and miR-130a/miR-155/miR-210 as prognostic indicators for clinical outcome of glioblastoma patients. *Journal of Translational Medicine*. 2013;11:10.
172. Torres A, Torres K, Pesci A, Ceccaroni M, Paszkowski T, Cassandrini P, Zamboni G, Maciejewski R. Diagnostic and prognostic significance of miRNA signatures in tissues and plasma of endometrioid endometrial carcinoma patients. *Int. J. Cancer*. 2013;132:1633–45.
173. Moulatlet ACB, Sondermann A, Andreghetto FM, Soares RM, Caló F, Nunes FD, Borge F, Brandão L, Severino P. MicroRNA-146b and immune response: a study using formalin-fixed and paraffin-embedded papillary thyroid cancer tissue. *Revista Einstein*. 2010;8:71.
174. Moulatlet ACB. *MicroRNAs como biomarcadores no carcinoma papilífero de tireoide: associação com mutações somáticas frequentes e significado biológico* [dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

175. Leite KRM, Canavez JMS, Reis ST, Tomiyama AH, Piantino CB, Sañudo A, Camara-Lopes LH, Srougi M. Comparison between formalin-fixed paraffin embedded and fresh-frozen tissue. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2011;29:533–7.
176. Ma Z, Lui W-O, Fire A, Dadras SS. Profiling and discovery of novel miRNAs from formalin-fixed, paraffin-embedded melanoma and nodal specimens. *J Mol Diagn*. 2009;11:420–9.
177. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, Ju J. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA*. 2007;13:1668–74.
178. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 2007;449:682– 8.
179. Tian Y, Luo A, Cai Y, Su Q, Ding F, Chen H, Liu Z. MicroRNA-10b Promotes Migration and Invasion through KLF4 in Human Esophageal Cancer Cell Lines. *J Biol Chem*. 2010;285(11):7986–94.
180. Ouyang H, Gore J, Deitz S, Korc M. microRNA-10b enhances pancreatic cancer cell invasion by suppressing TIP30 expression and promoting EGF and TGF- β actions. *Oncogene*. 2014;33:4664–74.
181. Nishida N, Yamashita S, Mimori K, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Yamamoto H, Ishii H, Doki Y, Mori M. MicroRna-10b is a prognostic indicator in colorectal cancer and confers resistance to the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil in colorectal cancer cells. *Oncol*. 2012;19:3065–71.
182. Moriarty CH, Pursell B, Mercurio AM. MiR-10b targets Tiam1: implications for Rac activation and carcinoma migration. *J Biol Chem*. 2010;285(27):20541–6.

183. Mussnich P, D'Angelo D, Leone V, Croce CM, Fusco A. The High Mobility Group A proteins contribute to thyroid cell transformation by regulating miR-603 and miR-10b expression. *Molecular Oncology*. 2013;7:531-42.
184. Han X, Yan S, Weijie Z, Feng W, Liuxing W, Mengquan L, Qingxia F. Critical role of miR-10b in transforming growth factor- β 1-induced epithelial–mesenchymal transition in breast cancer. *Cancer Gene Therapy*. 2014;21:60–7.
185. Sun XJ, Liu H, Zhang P, Zhang ZD, Jiang ZW, Jiang CC. miR-10b promotes migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(9):5533-7.
186. Jikuzono T, Kawamoto M, HIROSHI Yoshitake H, Kikuchi K, Akasu H, Ishikawa H, Hirokawa M, Miyauchi A, Tsuchiya SI, Shimizu K, Takizawa T. The miR-221/222 cluster, miR-10b and miR-92a are highly upregulated in metastatic minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *International journal of oncology*. 2013;42:1858-68.
187. Hwang J-H, Voortman J, Giovannetti E, Steinberg SM, Leon LG, Kim YT, Funel N, Park JK, Kim MA, Kang GH, Kim SW, Del Chiaro M, Peters GJ, Giaccone G. Identification of MicroRNA-21 as a Biomarker for Chemoresistance and Clinical Outcome Following Adjuvant Therapy in Resectable Pancreatic Cancer. *PLoS ONE*. 2010;5(5):e10630. doi:10.1371/journal.pone.0010630.
188. Amankwah EK, Anegebe E, Park H, Pow-Sang J, Hakam A, Park JY. MiR-21, miR-221 and miR-222 expression and prostate cancer recurrence among obese and non-obese cases. *Asian Journal of Andrology*. 2013;15:226–30.
189. Hummel R, Hussey DJ, Michael MZ, Haier J, Bruewer M, Senninger N, Watson DI. MiRNAs and their association with locoregional staging and survival following surgery for esophageal carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2011;18:253–60.

190. Akagi I, Miyashita M, Ishibashi O, Mishima T, Kikuchi K, Makino H, Nomura T, Hagiwara N, Uchida E, Takizawa T. Relationship between altered expression levels of *MIR21*, *MIR143*, *MIR145*, and *MIR205* and clinicopathologic features of esophageal squamous cell carcinoma. *Diseases of the Esophagus*. 2011;24:523–30.
191. Meng F, Henson R, Wehbe–Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007;133:647–58.
192. Zhang BG, Li JF, Yu BQ, Zhu ZG, Liu BY, Yan M. MicroRNA-21 promotes tumor proliferation and invasion in gastric cancer by targeting PTEN. *Oncology Reports*. 2012;27:1019-26.
193. Liu Z-L, Wang H, Liu J, Wang Z-X. MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN. *Mol Cell Biochem*. 2013;372:35-45.
194. Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. 2008;27:2128–36.
195. Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo Y-Y. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Research*. 2008;18:350-9.
196. Li T, Li D, Sha J, Sun P, Huang Y. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;383:280–85.
197. Riordan AM, Thomas MK, Ronnekleiv-Kelly S, Warner T, Geiger PG, Kennedy GD. Utility of micro-ribonucleic acid for predicting recurrence of rectal cancer. *Journal of Surgical Research*. 2012;177:87-92.

198. Pennelli G, Fassan M, Mian C, Pizzi M, Balistreri M, Barollo S, Galuppini F, Guzzardo V, Pelizzo M, Rugge M. PDCD4 expression in thyroid neoplasia. *Virchows Arch*. 2013;462:95–100.
199. Yang J, Li T, Gao C, Lv X, Liu K, Song H, Xing Y, Xi T. FOXO1 3'UTR functions as a ceRNA in repressing the metastases of breast cancer cells via regulating miRNA activity. *FEBS Letters*. 2014;588:3218–24.
200. Tan W, Gu J, Huang M, Wu X, Hildebrandt MAT. Epigenetic analysis of microRNA genes in tumors from surgically resected lung cancer patients and association with survival. *Mol. Carcinog*. 2014.
doi: 10.1002/mc.22149.
201. Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sánchez-Céspedes M, Blanco D, Montuenga LM, Rossi S, Nicoloso MS, Faller WJ, Gallagher WM, Eccles SA, Croce CM, Esteller M. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105:13556-61.
202. Sugita F, Maki K, Nakamura Y, Sasaki K, Mitani K. Overexpression of MIR9 indicates poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. 2014;55(1):78–86.
203. Lin F, Wang X, Jie Z, Hong X, Li X, Wang M, Yu Y. Inhibitory effects of miR-146b-5p on cell migration and invasion of pancreatic cancer by targeting MMP16. *J Huazhong Univ Sci Technol*. 2011;31(4):509-14.
204. Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J, Benz CC. Expression of microRNA-146 suppresses NF-κB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene*. 2008;27(42):5643 -5647.
205. Li Y, Wang Y, Yu L, Sun C, Cheng D, Yu S, Wang Q, Yan Y, Kang C, Jin S, An T, Shi C, Xu J, Wei C, Liu J, Sun J, Wen Y, Zhao S, Kong Y. MiR-146b-5p inhibits glioma migration and invasion by targeting MMP16. *Cancer Lett*. 2013;339:260–9.

206. Al-Khalaf HH, Aboussekhra A. MicroRNA-141 and microRNA-146b-5p inhibit the prometastatic mesenchymal characteristics through the RNA-binding protein AUF1 targeting the transcription factor ZEB1 and the protein kinase AKT. *The journal of biological chemistry*. 2014;289(45):31433–47.
207. Zhou L, Zhao X, Han Y, Lu Y, Shang Y, Liu C, Li T, Jin Z, Fan D, Wu K. Regulation of UHRF1 by miR-146a/b modulates gastric cancer invasion and metastasis. *FASEB Journal*. 2013;27:4929-39.
208. Walker SR, Xiang M, Frank DA . STAT3 activity and function in cancer: modulation by STAT5 and miR-146b. *Cancers*. 2014;6:958-68.
209. Wang Z, Zhang H, He L, Dong W, Li J, Shan Z, Teng W. Association between the expression of four up-regulated miRNAs and extrathyroidal invasion in papillary thyroid carcinoma. *Oncotargets and Therapy*. 2013;6:281–7.
210. Yang Z, Yuan Z, Fan Y, Deng X, Zheng Q. Integrated analyses of microRNA and mRNA expression profiles in aggressive papillary thyroid carcinoma. *Molecular medicine reports*. 2013;8:1353-8.
211. Yip L, Kelly L, Shuai Y, Armstrong MJ, Nikiforov YE, Carty SE, Nikiforova MN. MicroRNA signature distinguishes the degree of aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2011;18:2035–41.
212. Chou CK, Yang KD, Chou FF, Huang CC, Lan YW, Lee YF, Kang HY, Liu RT. Prognostic implications of miR-146b expression and its functional role in papillary thyroid carcinoma. *JCEM*. 2013;98(2).
213. Wojtas B, Carolina Ferraz C, Stokowy T, Hauptmann S, Lange D, Dralle H, Musholt T, Jarzab B, Paschke R, Eszlinger M. Differential miRNA expression defines migration and reduced apoptosis in follicular thyroid carcinomas. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014;388:1–9.

214. Hardin H, Guo Z, Shan W, Montemayor-Garcia C, Asioli S, Yu X-M, Harrison AD, Chen H, Lloyd RV. The roles of the epithelial-mesenchymal transition marker PRRX1 and miR-146b-5p in papillary thyroid carcinoma progression. *American Journal of Pathology*. 2014;184(8):2342-54.
215. de Bruin EC, van de Pas S, Lips EH, van Eijk R, van der Zee MMC, Lombaerts M, van Wezel T, Marijnen CAM, van Krieken JHJM, Medema JP, van de Velde CJH, Eilers PHC, Peltenburg LTC. Macrodissection versus microdissection of rectal carcinoma: minor influence of stroma cells to tumor cell gene expression profiles. *BMC Genomics*. 2005;6:142.
216. Kiss T. Small nucleolar RNAs: An abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell*. 2002;109(2):145-8.
217. Carling T, Carty SE, Ciarleglio MM, Cooper DS, Doherty GM, Kim LT, Kloos RT, Mazzaferri EL, Peduzzi PN, Roman SA, Sippel RS, Sosa JA, Stack Jr BC, Steward DL, Tufano RP, Tuttle RM, Udelsman R. American Thyroid Association Design and Feasibility of a Prospective Randomized Controlled Trial of Prophylactic Central Lymph Node Dissection for Papillary Thyroid Carcinoma. *Thyroid*. 2012;22(3).
218. Durante C, Montesano T, Torlontano M, Attard M, Monzani F, Tumino S, Costante G, Meringolo D, Bruno R, Trulli F, Massa M, Maniglia A, D'Apollo R, Giacomelli L, Ronga G, Filetti S. Time Course of Recurrences During Postsurgery Surveillance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(2):636–42.
219. Grogan RH, Kaplan SP, Cao H, Weiss RE, DeGroot LJ, Simon CA, Embia OMA, Angelos P, Kaplan EL, Schechter. A study of recurrence and death from papillary thyroid cancer with 27 years of median follow-up. *Surgery*. 2013;154:1436-47.
220. Londero SC, Kroghdahl A, Bastholt L, Overgaard J, Pedersen HB, Hahn CH, Bentzen J, Schytte S, Christiansen P, Gerke O, Godballe C.

- Papillary thyroid carcinoma in Denmark, 1996-2008: Outcome and evaluation of established prognostic scoring systems in a prospective national cohort. *Thyroid*. 2015;25(1):78-84.
221. Kim WY, Kim HY, Son GS, Bae JW, Lee JB. Clinicopathological, immunohistochemical factors and recurrence associated with extrathyroidal extension in papillary thyroid microcarcinoma. *J Can Res Ther*. 2014;10:50-5.
 222. Choi H, Lim JA, Ahn HY, Cho SW, Lee KE, Kim KW, Yi KH, Sung MW, Youn YK, Chung JK, 7, Park YJ, Park DJ, Cho BY. Secular trends in the prognostic factors for papillary thyroid cancer. *European Journal of Endocrinology*. 2014;171(5):667-75.
 223. Ortiz S, Rodriguez JM, Parrilla P, Perez D, Moreno-Gallego A, Rios A, Soria T. Recurrent papillary thyroid cancer: analysis of prognostic factors including the histological variant. *Eur J Surg*. 2001;167:406–12.
 224. Segal K, Shpitzer T, Hazan A, Bachar G, Marshak G, Popovtzer A. Invasive well-differentiated thyroid carcinoma: effect of treatment modalities on outcome. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*. 2006;134:819-22.
 225. Machens A, Holzhausen HJ, Dralle H. The prognostic value of primary tumor size in papillary and follicular thyroid carcinoma. *Cancer*. 2005;103:2269-73.
 226. Wang Q, Chu B, Zhu J, Zhang S, Liu Y, Zhuang M, Yang Y. Clinical analysis of prophylactic central neck dissection for papillary thyroid carcinoma. *Clin Transl Oncol*. 2014;16:44-8.
 227. Roh JL, Kim JM, Park CI. Central lymph node metastasis of unilateral papillary thyroid carcinoma: patterns and factors predictive of nodal metastasis, morbidity, and recurrence. *Ann Surg Oncol*. 2011;18:2245-50.

228. Koo BS, Choi EC, Yoon YH, Kim DH, Kim EH, Lim YC. Predictive factors for ipsilateral or contralateral central lymph node metastasis in unilateral papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg*. 2009;249:840-4.
229. Sugitani I, Kasai N, Fujimoto Y, Yanagisawa A. A novel classification system for patients with PTC: addition of the new variables of large (3 cm or greater) nodal metastases and reclassification during the follow-up period. *Surgery*. 2004;135:139-48.
230. McConahey WM, Hay ID, Woolner LB, van Heerden JA, Taylor WF. Papillary thyroid cancer treated at the Mayo Clinic, 1946 through 1970: initial manifestations, pathologic findings, therapy, and outcome. *Mayo Clin Proc*. 1986;61:978-96.
231. Shah JP, Loree TR, Dharker D, Strong EW, Begg C, Vlamis V. Prognostic factors in differentiated carcinoma of the thyroid gland. *The American Journal of Surgery*. 1992;164:658-61.
232. Lee YS, Kim SW, Kim SK, Kang HS, Lee ES, Chung KW. Extent of routine central lymph node dissection with small papillary thyroid carcinoma. *World J Surg*. 2007;31:1954-9.
233. Katakowski M, Buller B, Zheng X, Lu Y, Rogers T, Osobamiro O, Shu W, Jiang F, Chopp M. Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. *Cancer Letters*. 2013;335:201-4.
234. Edmonds MD, Hurst DR, Vaidya KS, Stafford LJ, Chen D, Welch DR. Breast cancer metastasis suppressor 1 coordinately regulates metastasis-associated microRNA expression. *Int J Cancer*. 2009;125(8):1778-85.
235. Han Z, Zhong L, Teng M-J, Fan JW, Tang HM, Wu JY, Chen HY, Wang ZW, Qiu GQ, Peng ZH. Identification of recurrence-related microRNAs in hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Molecular Oncology*. 2012;6:445-7.

236. White NMA, Khelle HWZ, Grigull J, Adzovic S, Youssef YM, Honey RJ. miRNA profiling in metastatic renal cell carcinoma reveals a tumour-suppressor effect for miR-215 . *British Journal of Cancer*. 2011;105:1741-9.
237. Sahin A, Velten M, Pietsch T, Knuefermann P, Okuducu AF, Hahne JC, Wernert N. Inactivation of Ets 1 transcription factor by a specific decoy strategy reduces rat C6 glioma cell proliferation and mmp-9 expression. *Int J Mol Med*. 2005;15:771–6.
238. Gabriely G, Teplyuk NM, Krichevsky AM. Context effect: microRNA-10b in cancer cell proliferation, spread and death. *Autophagy*. 2011 November 7;11,1384-6.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – **Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

APÊNDICE 2 – Aprovação do projeto pela Comissão de Trabalhos Científicos do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer

www.ibcc.org.br

INSTITUTO BRASILEIRO DE CONTROLE DO CÂNCER
Sociedade Beneficente São Camilo

Centro de Estudos "Prof. Dr. João Sampaio Góes Júnior."

São Paulo, 27 de agosto de 2010.

Pesquisadora: **Dra. Adriana Sondermann.**

Ref.: Projeto de Pesquisa "Identificação de microRNAs associados com recidiva em carcinoma papilífero de tireóide".

Vimos informar que sua solicitação para execução do projeto de pesquisa supracitado foi analisada e **aprovada** pela Comissão de Trabalhos Científicos – CTC do IBCC em **27/08/2010**.

Fica estabelecido que o pesquisador responsável deve se comprometer pelo bom andamento dessa pesquisa quanto a:

1. Cumprir as determinações impostas pela CTC em Orientações Gerais, formulário recebido na inscrição do Projeto.
2. Veracidade dos dados obtidos e a qualidade técnica.
3. Conclusão do estudo.
4. Fornecimento de relatórios semestrais a CTC (Informar data de início e de término).
5. Utilização do material apenas para o fim especificado no projeto aprovado.
6. Arcar com qualquer **despesa** referente à execução do trabalho.
7. Incluir o nome do IBCC em qualquer publicação ou apresentação de resultados em eventos científicos especificando que o trabalho foi realizado na Instituição.
8. No trabalho deverão constar referências bibliográficas de autores do IBCC caso haja publicações na área.
9. Incluir o nome do Diretor Técnico Científico do IBCC, Prof^o. Dr. João Carlos Guedes Sampaio Góes como co-autor do trabalho, sendo citado no final da relação de autores como representante da instituição.
10. Enviar cópia do trabalho quando apresentado / publicado para o CEJSG – Coordenadoria de Pesquisa.

Atenciosamente,

Dra. Célia Tosello de Oliveira
Coordenadora de Pesquisa do CEJSG

Ciente:

Data:

31/08/10

APÊNDICE 3 – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa
do Hospital Israelita Albert Einstein

São Paulo, 06 de junho de 2008

Ref. CEP/Einstein Nº 08/830

CAAE – 0056.0.028.000-08

Título: IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES EM NEOPLASIAS DE CABEÇA E PESCOÇO E
TIREÓIDE ATRAVÉS DO ESTUDO DE miRNAs ISOLADOS DE AMOSTRAS DE TECIDO
PARAFINADO E FRESCO

Investigador Principal: Patrícia Severino

Ilma. Sra.

Patrícia Severino

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein **analisou e aprovou** o
projeto de pesquisa supracitado, bem como isenção do Termo de Consentimento Livre e
Esclarecido, do projeto de pesquisa supracitado.