

Débora Guimarães Nadale de Souza

**A proteína *RNA-binding*, LIN28B, na expressão de
microRNAs e na biologia do câncer de tireoide**

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

São Paulo
2017

Débora Guimarães Nadale de Souza

**A proteína *RNA-binding*, LIN28B, na expressão de
microRNAs e na biologia do câncer de tireoide**

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Edna Teruko Kimura

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Tese e Dissertações da USP (BDTD)



São Paulo
2017

CLASS.	

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Souza, Débora Guimarães Nadale

A proteína RNA-binding, LIN28B, na expressão de
microRNAs e na biologia do câncer de tireoide /
Débora Guimarães Nadale Souza; orientador Edna
Teruko Kimura. -- São Paulo, 2017.

56 p.

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

1. LIN28. 2. microRNAs. 3. câncer de tireoide. I.
Kimura, Edna Teruko, orientador. II. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Débora Guimarães Nadale de Souza

Titulo da Dissertação: A proteína *RNA-binding*, LIN28B, na expressão de microRNAs e na biologia do câncer de tireoide.

Orientador (a): Edna Teruko Kimura

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a 08/12/17, considerou o (a) candidato(a):

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

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente:

Assinatura:

Nome:

Instituição:



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

Decl. CEUA.042/2015

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 134/10/CEUA, datado de 29/10/2010, renovado até 29/10/2016, e por solicitação da Profa. Dra. **Edna Teruko Kimura**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Débora Guimarães Nadale de Souza** ao Projeto de Pesquisa "*MicroRNAs nos tumores de tireoide: influência na proliferação e ativação oncogênica da célula folicular tireoidiana*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 27 de maio de 2015.

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

Dedico este trabalho aos meus pais, Rosângela e Fáblio, por dedicarem toda uma vida em prol da minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Edna Teruko Kimura pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela difusão dos seus conhecimentos e conselhos.

Aos meus pais Fábio e Rosângela, e irmãos, Flávio e Melina, por estarem sempre presentes, por todo apoio e por vivenciarem todos os meus sonhos junto comigo.

A toda a minha família.

Aos amigos de laboratório: César, Kelly e Paola. Agradeço pelo apoio nos experimentos e técnicas, discussões de dados, prévias de apresentações e pelos momentos de total descontração.

Aos meus amigos do programa de pós-graduação e do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, em especial ao Guilherme, agradeço pela troca de informações, amizade e por serem sempre prestativos no desenvolvimento deste trabalho.

As minhas amigas de toda uma vida, Nathália e Adriana, por estarmos sempre torcendo uma pela outra.

Aos meus amigos da Universidade Federal de Alfenas, Amanda, Ana Laura, Diogo, Flávia, Julia, Luana, Marina, Melina, Nádia, Taciani e Rafael, por ainda serem amigos como na faculdade e me trazem tantas lembranças boas.

Aos meus amigos do intercâmbio, Anderson, Paula e Beatriz por apesar de toda a nossa distância estarmos sempre presentes.

A Flávia por ter me dado a minha linda sobrinha, Manuela, e tornar tudo mais feliz.

Em especial agradeço ao Rafael, por todo o cuidado, amor e dedicação.

Agradeço a Capes, pela bolsa de Demanda Social, CNPq (Processo: 458505 2014-5) e FAPESP (Processo: 2016/17129-4) pelo auxílio financeiro.

“A ciência não é estranha à controvérsia. A busca de conhecimento é frequentemente desconfortável e desconcertante. (...) Mas a ciência não está aqui para fazer a gente se sentir bem. Existe para responder questões a serviço do conhecimento. (...) Mais do que procurar a cura para o resfriado ou o câncer, nós cientistas devemos demonstrar ao público o valor do esforço pela busca do conhecimento sobre a natureza da vida, e incentivá-lo.”

James Dewey Waston

RESUMO

Souza DGN. A proteína *RNA-binding*, LIN28B, na expressão de microRNAs e na biologia do câncer de tireoide [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)] – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

MicroRNAs são pequenos RNAs não codificantes de proteínas envolvidos na regulação de diferentes vias de sinalização, inibindo a tradução de genes alvos. A expressão dos microRNAs pode ser regulada na sua biogênese, via ação de proteínas ligantes de RNA, como a proteína LIN28. LIN28 liga-se em sequências específicas do miRNA, como aos precursores de let-7, impedindo processos da sua maturação e regulando negativamente a sua expressão. Em alguns tipos de câncer, a expressão aumentada de LIN28 se associa a um pior prognóstico. Neste trabalho analisamos a influência da super-expressão de LIN28B na biologia do câncer e na expressão global dos miRNAs em linhagem de carcinoma papilífero de tireoide, TPC-1. Observamos que o aumento da expressão de LIN28B não altera a proliferação e a viabilidade celular, ocorre aumento da expressão de genes da diferenciação tireoidiana como *PAX-8* e *TTF1* e diminuição de genes da transição epitélio mesênquima, *HMGA2*, *Vimentina* e *SNAIL*. A expressão global dos miRNAs foi analisada por *microarray* contendo sondas de oligonucleotídeos para 1733 miRNAs humanos, mostra aumento na expressão de 262 miRNAs ($\geq 2x$) e diminuição na expressão de 44 miRNAs ($\leq 2x$) na linhagem TPCLIN28B. Dentre os miRNAs diminuídos observamos a presença do segmento de ligação no precursor dos miRNAs, *miR-4488* e *miR4674*. Estes resultados sugerem que a alteração na expressão dos miRNAs mediada por LIN28B, aumento na expressão de genes da diferenciação e diminuição na expressão de genes da transição epitélio mesênquima contribuem para transformação maligna no carcinoma papilífero de tireoide.

Palavras chave: LIN28, microRNA e câncer de tireoide

ABSTRACT

Souza DGN. RNA binding protein, LIN28B, microRNAs expression and cancer behavior of thyroid cancer [Master thesis (Cell and Tissue Biology)] – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

MicroRNA are small RNAs, non-coding that control posttranscriptional expression of target genes, regulating signaling pathways. MicroRNAs expression could be regulated in biogenesis by action of RNA binding protein, LIN28. LIN28 binds sequences of miRNA, as precursor form of let-7, inhibiting let-7 biogenesis, negatively regulating by LIN28. High expression of Lin28 is associated with poor prognosis and high tumour aggressiveness in different types of cancer. In this work we analyzed the high expression of LIN28B in papillary thyroid cancer lineage, TPC-1. Our results show that the over expression of LIN28B couldn't change cell proliferation and cell viability. Expression of thyroid genes, *PAX-8* and *TTF-1* are increased and epithelial-mesenchymal transition genes *HMGA2*, *VIM* and *SNAIL* is decreased. Microarray analysis was used to detect the global miRNA expression, with oligonucleotide probes for 1733 human mature miRNAs. The analysis of microarray shows 262 miRNAs up-regulated ($\geq 2x$) and 44 miRNAs down-regulated ($\leq 2x$) in TPCLIN28B. Among down-regulated miRNAs there are miRNAs with LIN28 binding sites in precursor, as miR-4488 and miR-4674. These results suggest that alteration in miRNA expression mediated by LIN28B and modulation in differentiated of thyroid genes and epithelial-mesenchymal transition genes could influence in malignant transformation of papillary thyroid cancer.

Keywords: LIN28, microRNAs and thyroid cancer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Biogênese dos microRNAs

Figura 2 – MicroRNAs e câncer

Figura 3 – Proteínas Lin28A e Lin28b

Figura 4 – Ligação e ação do LIN28 no *let-7*

Figura 5 - Mapa dos plasmídeos transfectados para geração da linhagens TPCØ e TPCLIN28B

Figura 6 - Análise de expressão de LIN28B após a transfecção na linhagem TPC-1

Figura 7 - LIN28B e sua influência no carcinoma papilífero de tireoide

Figura 8 - Influência de LIN28B na expressão dos fatores transcricionais *PAX-8* e *TTF1*

Figura 9 - Análise da expressão de *LIN28B*, *PAX8* e *TTF1* em pacientes do projeto TCGA através da plataforma cBioPortal

Figura 10 - Influência de LIN28B sobre os marcadores clássicos de transição epitélio mesênquima no CPT

Figura 11- Dados de pacientes com carcinoma papilífero (TCGA)

Figura 12 - Sítio de ligação de LIN28B nos miRNAs

Figura 13 - Análise da diminuição da expressão dos miRNAs *miR-4488* e *miR-4674* na linhagem TPCLIN28B

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos usados para avaliar a expressão gênica

Tabela 2 - Expressão dos 15 miRNAs mais diferencialmente expressos sob influência da super-expressão de LIN28B no CPT

Tabela 3 - MiRNAs com sítios de ligação para LIN28B

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BRAF	Do inglês, <i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
BLAST	Do inglês, BLAST-like Alignment Tool
<i>BRAF^{T1799A}</i>	Mutação no gene <i>BRAF</i>
CAT	Carcinoma anaplásico de tireoide
CCHC	Cisteína, Cisteína, Histidina e Cisteína
cDNA	DNA complementar
CFT	Carcinoma folicular de tireoide
CMT	Carcinoma medular de tireoide
CPDT	Carcinoma pouco diferenciado de tireoide
CPT	Carcinoma papilífero de tireoide
CSD	Do inglês, <i>Cold Shock Domain</i>
Ct	Do inglês, <i>cycle threshold</i>
DEPC	Do inglês, <i>diethyl pyrocarbonate</i>
DGCR8	Do inglês, <i>DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8</i>
DMEM	Do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
DP	Desvio Padrão
DROSHA	Do inglês, <i>Drosha, ribonuclease type III</i>
Fw	Do inglês, <i>foward</i>
HMGA2	Do inglês, <i>high mobility group AT-hook 2</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LIN28A	Lin-28 homólogo A
LIN28B	Lin-28 homólogo B
MAPK	Do inglês, <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
NKX2-1	Do inglês, <i>NK2 homeobox 1</i>
nt	Nucleotídeo
PAGE	Do inglês, <i>Poliacrilamide gel electrophoresis</i>
PAX-8	Do inglês, <i>paired box 8</i>
PBS	Do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase
<i>pre-let7</i>	Precursor de let-7
<i>pre-miRNA</i>	Precursor de miRNA
<i>pri-let-7</i>	Primário de let-7
<i>pri-miRNA</i>	miRNA primário
qPCR	PCR quantitativo
RAS	Do inglês, <i>Ras proto oncogene</i>
RBP	Do inglês, <i>RNA binding protein</i>
RET	Do inglês, <i>Ret proto-oncogene</i>

RET/PTC	rearranjo cromossômico do gene RET com gene heterólogo
Rev	Do inglês, <i>reverse</i>
RIPA	Do inglês, <i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
RISC	Do inglês, <i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNase	Ribonuclease
<i>RNU6B</i>	Pequeno RNA nuclear U6B
RPL19	Proteína Ribossomal 19
RT	Transcrição reversa
SDS	Docedil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SNAIL	Do inglês, <i>snail family transcriptional repressor 1</i>
Tg	Do inglês, <i>thyroglobulin</i>
TGFβ	Do inglês, transforming growth factor beta
TPC-1	Linhagem celular humana derivada de PTC com rearranjo RET/PTC
TPO	Do inglês, <i>thyroid peroxidase</i>
TSHR	Do inglês, <i>thyroid stimulating hormone receptor</i>
TTBS	Do inglês, <i>Tween 20 and Tris-Buffered Saline</i>
TUTase	Do inglês, <i>terminal uridylyltransferase</i>
u.a	Unidades arbitrárias
UTR	Região não traduzida
VIM	Do inglês, <i>vimentin</i>
ZEB 1	Do inglês, <i>zinc finger E-box binding homeobox 1</i>
ZEB 2	Do inglês, <i>zinc finger E-box binding homeobox 2</i>

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 MicroRNAs.....	18
1.2 Biogênese dos miRNAs.....	18
1.3 MicroRNAs e câncer	20
1.4 LIN28, estrutura e função.....	22
1.5 LIN28 e let-7.....	24
1.6 LIN28 e câncer de tireoide.....	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Cultura de células.....	29
3.2 Amplificação do plasmídeo	29
3.3 Transfecção do plasmídeo.....	29
3.4 Análise da expressão gênica.....	30
3.4.1 Extração de RNA.....	30
3.4.2 Síntese de DNA complementar.....	30
3.4.3 PCR em Tempo Real.....	30
3.5 Análise da expressão proteica por Western blotting.....	33
3.5.1 Extração de proteínas.....	32
3.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	32
3.5.3 Imunodeteção.....	32
3.6 Ensaio de proliferação celular	35
3.6.1 Proliferação celular.....	33
3.6.2 Viabilidade celular.....	33
3.7 Análise global da expressão dos microRNAs	35
3.7.1 Extração de RNA total e pequeno RNA (<200nt).....	34
3.7.2 Marcação dos pequenos RNAs (<200nt).....	34
3.7.3 Hibridação e detecção.....	34
3.7.4 Leitura GeneChip Scanner 3000 7G.....	35
3.7.5 Análise das imagens.....	35
3.8 Validação da expressão dos miRNAs.....	37
3.8.1 Síntese de cDNA de miRNAs.....	35
3.8.2 PCR quantitativo em tempo real para validação da expressão dos miRNAs.....	36
3.9 Análise <i>in silico</i> dos miRNAs diferencialmente expressos	38

3.10 Análise estatística.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Análise da expressão de LIN28B na linhagem TPC-1.....	39
4.2 Efeito da super-expressão de LIN28B no carcinoma papilífero de tireoide	39
4.3 Influência do Lin28B na expressão dos marcadores da diferenciação tireoidiana no CPT	40
4.4 Influência de LIN28B na expressão dos marcadores de transição epitélio mesênquima no CPT	42
4.5 Análise da expressão global de miRNAs na linhagem TPCLIN28B.....	44
4.6 Análise <i>in silico</i> : miRNAs com a expressão diminuída possuem sítios de ligação do LIN28B (GGAG, GAAG e AGGG)	47
4.7 Validação dos miRNAs com expressão diminuída por LIN28B no CPT.	49
5 CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS*.....	51

1 INTRODUÇÃO

Os microRNAs (miRNAs), possuem cerca de 20 nt, são de fita simples e não codificadores de proteína que exercem um potente efeito sobre diferentes vias de sinalização ao regularem a expressão proteica, inibindo a tradução de genes alvos (Gregory et al., 2005). Assim, podem controlar processos biológicos como, a diferenciação celular, proliferação e apoptose das células, a desregulação então, influencia no processo tumorigênico. A desregulação na expressão dos miRNAs é oncogênica (oncomiRs), quando, o aumento da expressão de um miRNA diminui um supressor tumoral ou a diminuição da expressão de um miRNA induz a tradução de um gene oncogênico (Esquela-Kerschner, Slack, 2006).

A biogênese dos microRNAs pode ser regulada via ação de proteínas ligante de RNA, como a proteína Lin28. O Lin28, é uma proteína altamente conservada, que surgiu como um importante modulador da biogênese do miRNA let-7 (Viswanathan et al., 2008). Essa interação Lin28 e let-7 é o exemplo melhor caracterizado entre a interação de um miRNA e uma proteína ligante de RNAs, onde têm-se como consequência a regulação negativa da expressão do let-7, fazendo com que ocorra a diminuição da sua ação supressora tumoral (Viswanathan et al., 2010).

Neste contexto, o desbalanço da expressão de miRNAs é observada em diferentes tipos de câncer como mama, próstata, ovário e tireoide (Lu et al., 2005; Volinia et al., 2006), sendo que cada tipo de câncer exibe uma assinatura específica de miRNAs desencadeada pela oncogênese particular do tecido.

A expressão aumentada do LIN28 foi recentemente correlacionada com o pior prognóstico em diversos carcinomas humanos (Viswanathan et al., 2009; West et al., 2009). No entanto, o papel do LIN28, um importante regulador da reprogramação celular e do processamento de miRNAs, assim como de seus miRNAs regulatórios (família let-7), não foram ainda esclarecidos no câncer de tireoide.

1.1 MicroRNAs

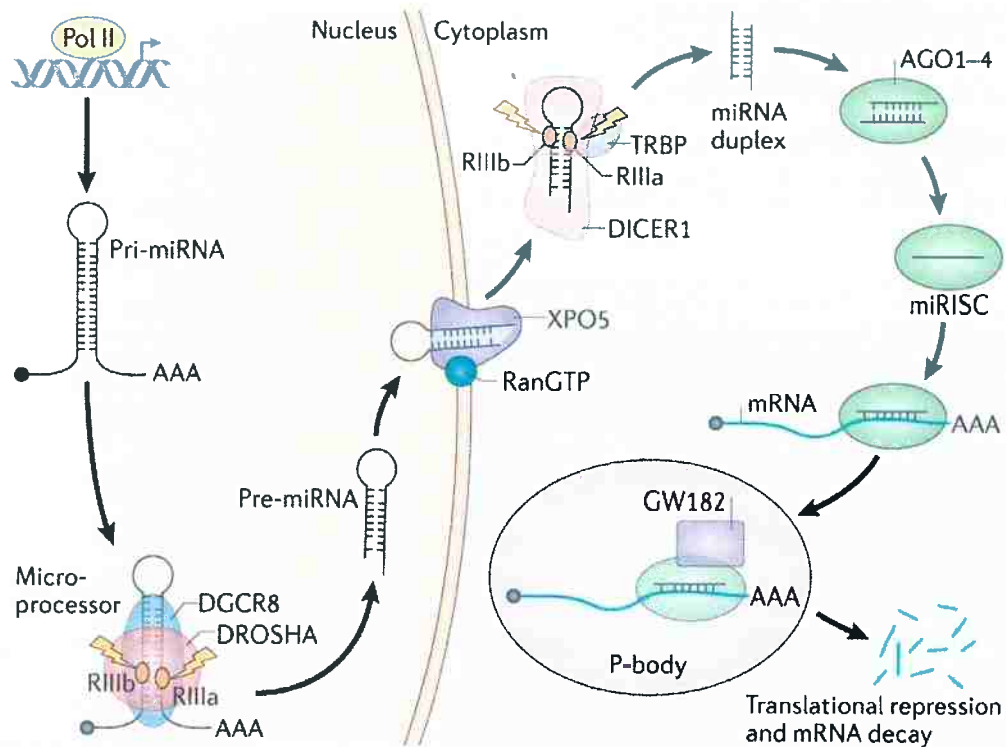
Nos últimos anos análises do transcriptoma geraram uma ampla fonte de informações sobre RNAs, relacionando-os com diferentes mecanismos de regulação gênica, incluindo mecanismos epigenéticos, e alguns desses RNAs não codificam proteínas (*non-protein-coding RNAs*). Essa classe de RNAs são transcritos pelas RNA polimerases I, II e III, podendo então ser RNAs ribossômicos, RNA longos (lncRNAs) e os RNA pequenos (Brosius, Tiedge 2004). Dentre várias classes de RNAs, os miRNAs têm sido os mais amplamente estudados, a primeira referência foi em 1993 quando Victor Ambros descobriu que o *Lin-4*, um importante gene na regulação do desenvolvimento de *C. elegans*, não codificava proteína mas expressava um pequeno RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos. Essa descoberta permitiu a caracterização de um novo mecanismo de regulação gênica, onde o transcrito de *Lin-4* regulava negativamente a tradução de *Lin-14* ao se ligar diretamente a sua região 3'UTR (Lee et al, 1993). A partir de então, muitos miRNAs foram descritos atuando em vários processos biológicos (He, Hannon, 2004). Os miRNAs são pequenos RNAs endógenos (~20nt) não codificantes de proteínas que inibem o processo de tradução de RNAs mensageiros alvo através do pareamento imperfeito ou perfeito com a região 3'- não traduzida (UTR) do mesmo, além de induzir a degradação do mRNA (Braun et al., 2011).

1.2 Biogênese dos miRNAs

A biogênese dos miRNAs inicia-se a partir dos seus *loci* genômicos. Os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II contendo cauda Poly-A e Cap 5' são expressos em longos transcritos, individuais ou em clusters, são chamados de primários (pri-microRNA). Adquirem estruturas secundárias em forma de grampo, apresentam tamanho variado, dificultando a definição do tamanho do pri-miRNA. O processamento de pri-miRNAs ocorre ainda no núcleo e pode ser realizado de forma simultânea com o processo de transcrição (Kim, Kim, 2007). Onde, a enzima nuclear DROSHA (*Drosha, ribonuclease type III*), que possui um domínio de ligação em RNA de dupla fita e dois domínios do tipo RNase, envolvidos na clivagem de um dos braços do pri-miRNA (Lee et al., 2003). A ação da enzima DROSHA depende de outras proteínas acessórias, como DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) que se liga na DROSHA dando suporte à atividade de ligação à dupla fita de RNA, juntas formam um complexo chamado "microprocessador" responsável por converter pri-miRNA em um miRNA

precursor (pre-miRNA) com aproximadamente 70 nucleotídeos em forma do *hairpin e overhang* de dois nucleotídeos na porção 3' (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004; Landthaler et al., 2004).

O pre-miRNA é exportado do núcleo para o citoplasma através da ação da proteína exportina 5 que forma um complexo de transporte com uma proteína nuclear RAN-GTP. O pre-miRNA é translocado pelo poro nuclear, GTP é hidrolisado, resultando na desmontagem do complexo e posterior liberação do pre-miRNA no citosol (He, Hannon, 2004) (Figura 1). No citoplasma, o pre-miRNA se associa a enzima DICER, sendo que a enzima cliva o pre-miRNA em cerca de 22 nt após o reconhecimento do overhang na região 3' (Vermeulen et al., 2005) e também ~22nt a partir da região 5' (Park et al., 2011), gerando um RNA dupla fita (duplex) de ~20 nt que se associa ao complexo multiproteico RISC (RNA Induced Silencing Complex). Somente uma das fitas de miRNA fica retida, o miRNA maduro, que atua no pareamento imperfeito com a região 3'-UTR de genes alvo para inibir a tradução (Gregory et al., 2005; Kim, 2005). Apesar existir certa preferência por uma das fitas do duplex no complexo RISC, ambas as fitas localizadas na região 5' (5p) ou 3' (3p), podem apresentar função biológica e inibir alvos específicos (Lai, 2002; Okamura et al., 2008).



Nature Reviews | Cancer

Figura 1– Biogênese dos microRNAs. Esquema ilustrando as etapas do processo de maturação dos miRNAs e a sua ação bloqueando mRNA alvos. Figura de Lin e Gregory , 2015.

O mecanismo de ação de inibição dos miRNAs é mediado pela região *seed*, região constituída por nucleotídeos na posição de 2 a 8 da extremidade 5' do miRNA que inicia hibridização com a região 3'-UTR do mRNA alvo (Lewis et al., 2003) provocando o bloqueio da tradução e a subsequente diminuição dos níveis da proteína. Devido ao seu tamanho reduzido, um único miRNA pode regular diversos mRNAs diferentes e, da mesma forma, diversos miRNAs podem regular um único mRNA alvo (Brennecke et al., 2003). Os miRNAs formam, assim, uma rede complexa de regulação pós-transcricional, ressaltando a importância de se entender a influência do mecanismo de ação dos miRNAs e suas consequências.

1.3 MicroRNAs e câncer

A literatura apresenta evidências do papel dos miRNAs em várias doenças humanas e processos fisiológicos normais e anormais. Entre eles está o câncer, a primeira

relação entre miRNAs e câncer foi estabelecida quando Calin et al. 2002, demonstraram que uma região genômica contendo *loci* gênicos de miRNAs, está frequentemente deletada em leucemia linfocítica crônica, ocasionando a inversão com os níveis protéicos de seu alvo. Além disso, estudos em larga escala demonstram que perfil de expressão de miRNAs é mais potente e preciso na discriminação de tecidos tumorais do que o perfil de expressão de mRNAs (Lu et al., 2005)

A expressão alterada de miRNAs vem sendo relacionada a diversos tipos tumorais, podendo funcionar como oncogenes ou genes supressores de tumor. Quando ocorre a perda de expressão de um miRNA resulta em aumento da tradução de oncogenes, ou quando há aumento na expressão de um miRNA resulta-se na inibição da tradução de um gene supressor tumoral. (Esquela-Kerscher, Slack, 2006) (Figura 2). Esse desequilíbrio na expressão de oncomiRs atua potencializado a modulação de vias de sinalização envolvidas em diferentes processos como proliferação, migração, apoptose e invasão.

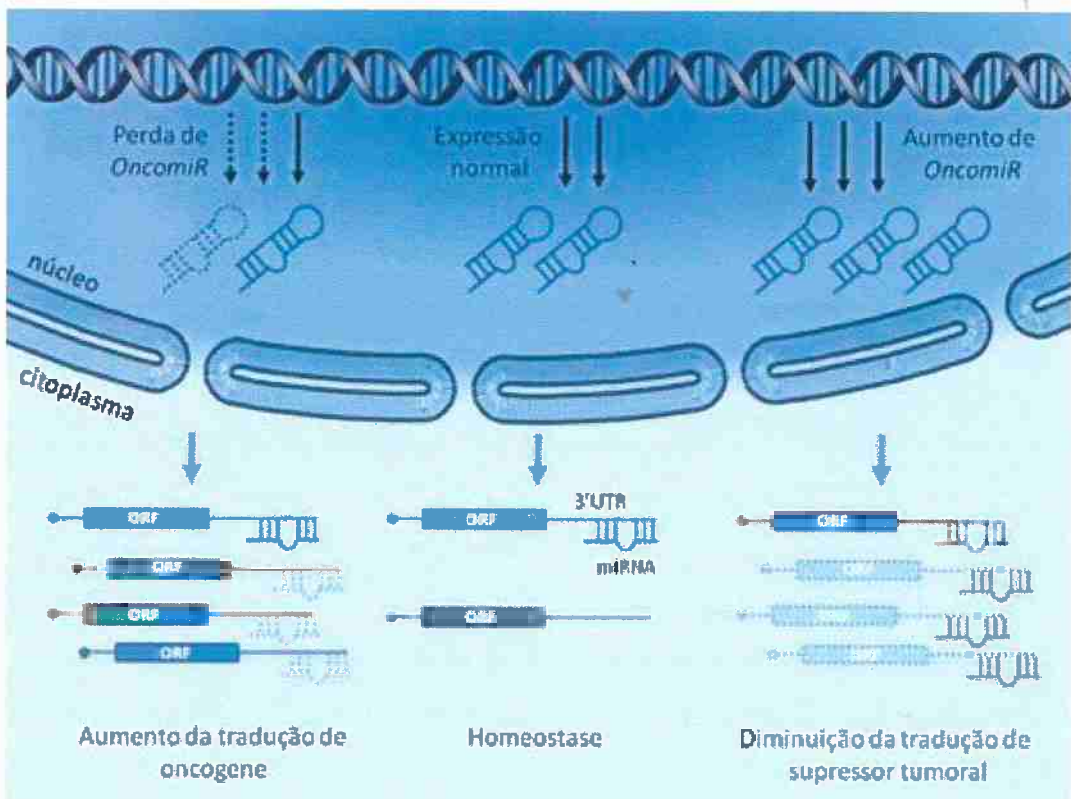


Figura 2- MicroRNAs e câncer. A desregulação da expressão de um miRNA (oncomiR) pode contribuir com a oncogênese a medida que aumenta a tradução de um oncogene ou diminui a tradução de um gene supressor tumoral. Figura adaptada de (Fuziwara et al., 2012).

Diferentes tipos de câncer apresentam desregulação da expressão de miRNAs, onde, cada tipo de câncer apresenta uma assinatura específica de miRNAs, emergindo como potenciais marcadores biológicos desencadeada pela oncogênese de cada tecido. No câncer de tireoide, estudos demonstraram a desregulação dos miRNAs no carcinoma papilífero de tireoide, com modulação da expressão de mais de 30 *miRNAs* diferentes. Os oncomiRs: *miR-221*, *miR-222*, *miR-146b* e o *cluster 17-92*, são oncogênicos com capacidade de modular importantes vias de tumorigenese tireoidiana como, TGF beta (Geraldo et al., 2012; Dettmer et al., 2013; Fuziwara e Kimura, 2014a). Por outro lado, os oncomiRs *let-7f*, *miR-200* e *miR-30* são supressores tumorais, os quais modulam oncogenes que compõe principalmente a via MAPK e fatores de transcrição que auxiliam a transição epitélio mesênquima (Ricarte-Filho et al., 2009; Zhang et al., 2012; Fuziwara, Kimura, 2014b).

No câncer, os miRNAs pertencentes a família *let-7* atuam como supressores tumorais, inibindo oncogenes que modulam ciclo celular, proliferação, diferenciação e adesão celular (Roush, Slack, 2008; Ricarte-Filho et al., 2009; Colamaio et al., 2012; Zhao et al., 2013). Na oncogênese tireoidiana análises de expressão de miRNAs em larga escala, mostraram que há diminuição na expressão de *let-7f* e *let-7a* (Pallante et al., 2006; Visone et al., 2007; Dettmer et al., 2013; Dettmer et al., 2014). Sabe-se que a diminuição na expressão de membros da família *let-7* durante alguns processos neoplásicos malignos como na mama, pulmão, cólon e intestino, deve-se ao aumento da expressão proteica de LIN28 (Piskounova et al., 2008; Viswanathan et al., 2008).

1.4 LIN28, estrutura e função

O LIN28 é uma proteína ligante de RNA, altamente conservada, codificada pelos genes heterocrônicos *LIN28A* (também conhecido como LIN28) e *LIN28B* localizados respectivamente no cromossomo 1(1p36.11) e 6 (6q21) em humanos (Moss, Tang, 2003; Guo et al., 2006). O Lin28 foi primeiramente caracterizado no *Caenorhabditis elegans* como um importante regulador do processo de desenvolvimento embrionário desta larva. Mutações no gene *Lin28b* modificam o desenvolvimento normal da larva, fazendo com que determinados eventos aconteçam mais precocemente ou tardiamente do que o normal (Ambros, Horvitz, 1984; Ben-Porath et al., 2008). Outros fatores de reprogramação celular

descritos até hoje – OCT4, SOX2, c-MYC, NANOG e LIN28 – já foram relacionados à oncogênese (Viswanathan et al., 2010), reforçando a ideia de que a complexa reprogramação genômica, que acompanha os mecanismos de pluripotencialidade induzida, apresenta semelhanças com a complexa reprogramação genômica que acompanha o processo de transformação neoplásica.

Em humanos os genes *LIN28A* e *LIN28B* são compostos por quatro éxons, onde, o segundo e o terceiro são conservados entre as isoformas. Análises bioinformáticas mostraram que o segundo éxon, é responsável em codificar aminoácidos semelhantes aos encontrados em proteínas de choque térmico (CSD, *cold-shock domain*) sintetizadas em bactérias e plantas. Outra constatação foi a presença de aminoácido que compõem os dedos de zinco (*zinc finger*) do tipo Cys-Cys-His-Cys (*CCHC*, *Cysteine, Cysteine, Histamine, Cysteine*), homólogos aos encontrados no nucleocapsídeo viral, sintetizados a partir do terceiro éxon (Summers et al., 1992; Moss, Tang, 2003; Guo et al., 2006) (Figura 3).

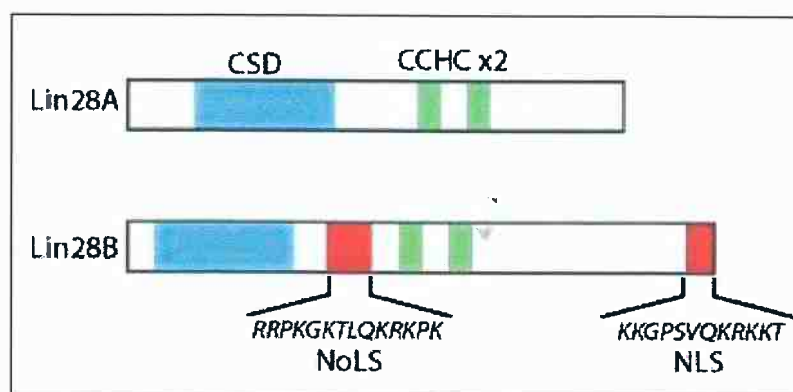


Figura 3 – Proteínas Lin28A e Lin28B. Lin28A e Lin28B possuem grande semelhança em sua sequência, assim como domínios, Cold Shock Domain (CSD em azul) e CCHC zinc finger (CCHC x2 em verde). Lin28B contém sítio de marcação nuclear (NLS) e o nucleolar (NoLS). Fig de Gregory e Thornton, 2012

LIN28A e *LIN28B*, pertencem à mesma família gênica, sintetizam proteínas com composição peptídica diferente (Piskounova et al., 2011). As proteínas LIN28A e LIN28B são compostas, em mamíferos, por 209 e 250 aminoácidos respectivamente, ambas apresentam um domínio CSD na extremidade N-terminal e dois domínios *zinc finger* do tipo CCHC na extremidade C-terminal, permitindo uma identidade de 76% (Moss et al, 1997; Guo et al., 2006; Piskounova et al., 2011). A estrutura *zinc finger* do tipo CCHC apresenta capacidade de interação com o RNA, dando as proteínas LIN28, a função de

proteína ligante de RNA (RBP do inglês, *RNA binding protein*) (Summers et al., 1992).

1.5 LIN28 e let-7

O LIN28 atua na regulação da biogênese de miRNAs por meio de mecanismos pós-transcricionais (Viswanathan et al., 2008). A interação entre o Lin28 e o let-7 é o exemplo melhor caracterizado entre a relação de um miRNA e seu regulador pós-transcricional. Essas proteínas modulam de forma distinta a maturação de *let-7* (Piskounova et al., 2011), mas tanto LIN28A, com LIN28B se ligam ao *let-7* através o domínio CCHC em sequências ricas em guanina, como, GGAG, GAAG ou AGGG, localizadas na região 3' *stem-loop* do *pri* ou *pre-let-7* (Figura 4), o que confere ação de proteína ligante resultando na inibição do processo de ação da DROSHA ou da DICER. LIN28A age predominante no citoplasma ligando-se no *pre-let-7*, recruta a enzima TUTase (do inglês *terminal uridylyltransferase*) que adiciona uridina na porção 3' do *pre-let-7* induzindo a degradação e conseqüentemente inibe o processamento pela DICER (Piskounova et al., 2011). Enquanto LIN28B atua predominantemente no núcleo, onde se liga no primário de *let-7* (*pri-let-7*) e bloqueia a interação do complexo DROSHA/DGCR8 independente da enzima TUTase (Piskounova et al., 2011) (Figura 4). Por outro lado, um importante estudo demonstrou que, além da família *let-7*, os miRNAs *mir-9*, *mir-30* e *mir-125*, também são importantes reguladores pós-transcricionais dos genes *LIN28A* e *LIN28B* (Zhong et al., 2010).

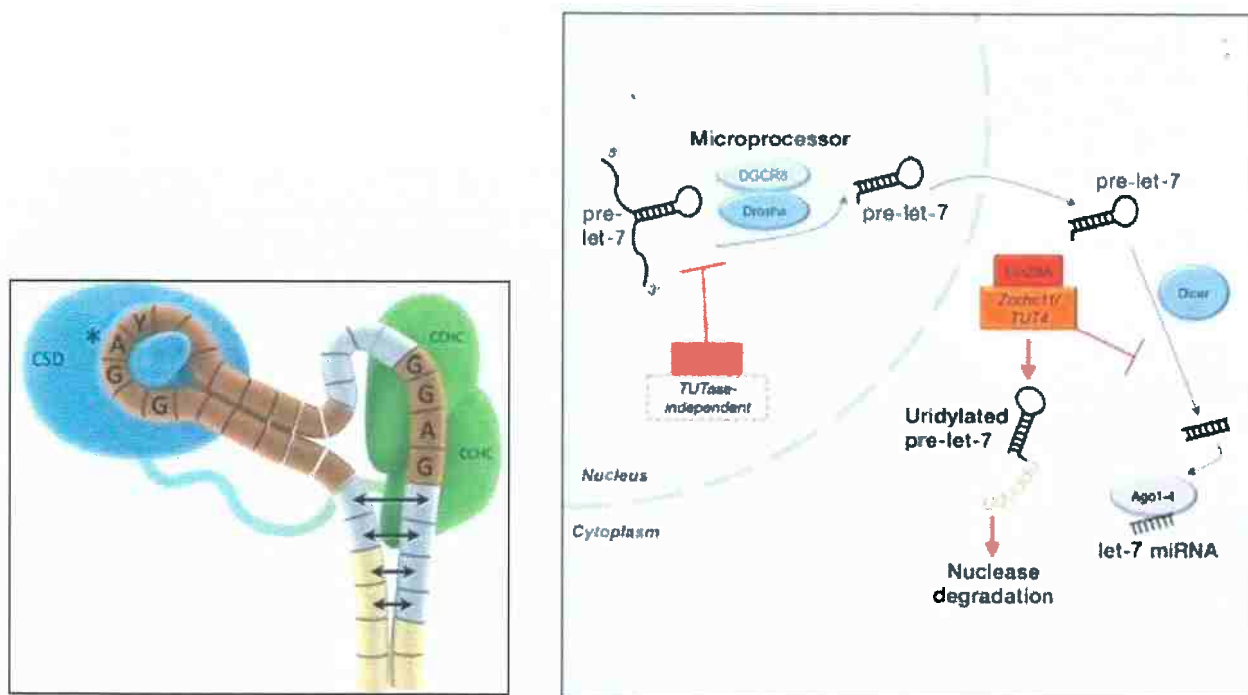


Figura 4 – Ligação e ação do LIN28 no let-7. À esquerda modelo esquemático da ligação do LIN28 via CCHC na sequência GGAG do pre-let-7. À direita esquema da ação do Lin28A/B na biogênese do microRNA let-7, bloqueando a sua maturação. Figuras de Gregory e Thornt, 2012 e Piskounova et al., 2011

LIN28A/LIN28B podem promover transformação maligna e a ativação destes genes ocorrem em diversos tumores humanos, em uma frequência aproximada de 15% (Viswanathan et al., 2009). Ressalta-se também que o LIN28A e o LIN28B estão envolvidos em processos biológicos como, desenvolvimento de células germinativas, na embriogênese, no metabolismo de glicose, no endereçamento celular e na diferenciação celular.

1.6 LIN28 e câncer de tireoide

Já se é sabido que o aumento da expressão de LIN28, por inibir a maturação dos miRNAs pertencentes a família *let-7*, que são supressores tumorais, contribui com a tumorigênese de neoplasias como mama, cólon, bexiga, ovário, cabeça e pescoço e neuroblastoma (King et al., 2011; King et al., 2011; Alajez et al., 2012; Li et al., 2013; Murray et al., 2013). Outros estudos realizados em leucemia mielóide aguda constataram que outro miRNA, como o *miR-150*, pode ser modulado por LIN28. Nesta neoplasia, detectou que cMYC, ativa a transcrição de *LIN28* que por sua vez interage com *pri-miR150*

e *pre-miR150* impedindo seu processamento e favorecendo a proliferação celular (Jiang et al., 2012). Estudos mais recentes em câncer de pulmão mostram que *LIN28B* é um possível alvo de outros miRNAs como, *miR-203*, *miR-30*, *let-7*, *miR-132*, *miR-181*, *miR-212*, *miR-101*, *miR-9*, *miR-125*, *miR-98*, *miR-196*, *miR-23* e *miR-499*. Ainda nesse estudo comprovou-se funcionalmente que o miR-203 bloqueia a tradução do LIN28B, elevando os níveis de *let-7*, acarretando em uma inibição do crescimento tumoral (Mc Gregor et al., 2017; Zhou et al., 2017,).

O câncer de tireoide é a neoplasia endócrina mais frequente, sendo mais comum em mulheres. No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), para 2016 foi estimado o aparecimento de 6960 mil novos casos, tornando-se a oitava neoplasia mais frequente entre as mulheres.

Existem diferentes tipos de carcinoma tireoidiano, caracterizados de acordo com a célula de origem e com características histológicas. Aproximadamente 3% dos tumores tireoidianos originam-se a partir de células parafoliculares (também chamadas de células C), e são denominados carcinomas medulares (CMT). Os outros tumores são oriundos de células foliculares, e podem ser classificados de acordo com características histológicas em: (I) carcinomas diferenciados, por sua vez subdividido em papilífero (CPT), e folicular (CFT); (II) carcinoma pouco diferenciado (CPDT); e (III) carcinoma indiferenciado ou anaplásico (CAT).

Os eventos genéticos mais frequentes na transformação maligna do tecido tireoidiano estão bem caracterizados e envolvem a ativação de vias de sinalização que estimulam a proliferação, principalmente a via MAPK. A mutação pontual no gene mutação pontual no gene *BRAF*, é considerada a alteração genética mais frequente no carcinoma papilífero (Kimura et al., 2003; Sobrinho-Simoes et al., 2005; Xing, 2007), onde ocorre a translocação de uma base timina por adenina na posição 1799 *BRAF*^{T1799A} levando à substituição do aminoácido 599 valina por ácido glutâmico. Os rearranjos cromossômicos do tipo RET/PTC estão presentes em 30-40% dos casos de carcinoma papilífero nos EUA (Santoro et al., 1992). RET, uma proteína do tipo tirosina-quinase, é um receptor transmembrana geralmente ativado após a ligação de um de seus ligantes. A fusão da extremidade 3' do proto-oncogene *RET* com a extremidade 5' de diversos genes expressos na célula folicular, codificam para uma proteína citoplasmática, com habilidade de

dimerização e resulta em sua autofosforilação independente da ativação por seus ligantes, levando à constante ativação dos membros à jusante na cadeia. Tanto os rearranjos RET/PTC quanto a mutação *BRAF*T1799A resultam na sustentação da ativação da via de sinalização de MAPK (Santoro et al., 1996; Mitsutake et al., 2005), promovendo maior capacidade de proliferação tumoral. No entanto, estes dois eventos moleculares raramente estão presentes num mesmo tumor (Namba et al., 2003; Soares et al., 2003).

Além das alterações genéticas clássicas, alterações no perfil de expressão dos miRNAs também apresentam um papel importante na tumorigênese tiroideana. Diversos estudos, envolvendo a análise do perfil de expressão de miRNAs em tecidos derivados de carcinoma papilífero de tireoide, apontam a diminuição de expressão de determinados miRNAs, assim como o aumento no tecido tumoral. Estudo recente do nosso grupo mostrou que o LIN28 contribui com a diminuição do *let-7f*, podendo ser modulado pela MAPK (Olivé, 2014), dados esse que nos sugerem uma potencial ação de LIN28 na modulação da expressão dos miRNAs e na oncogênese tiroideana. Os resultados obtidos nesse trabalho exploram a relação LIN28B, miRNAs e câncer de tireoide ainda pouco explorada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste projeto foi avaliar a influência da proteína Lin28B na biologia do câncer e na expressão global dos miRNAs utilizando o modelo de super-expressão de LIN28B em carcinoma papilífero de tireoide, na linhagem TPC-1.

2.2 Objetivos Específicos

- i. Super-expressar LIN28B na linhagem TPC-1 para obter a influência de LIN28B na proliferação e viabilidade celular, na expressão dos marcadores de diferenciação tireoidiana e na transição epitélio mesênquima.
- ii. Analisar o efeito da super-expressão de LIN28B na expressão global dos miRNAs, validar e análise *in silico* para identificação de potenciais sítios de ligação LIN28B-microRNAs.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

A linhagem celular humana, TPC-1, derivada de carcinoma papilífero de tireoide que expressa espontaneamente o rearranjo cromossômico *RET/PTC-1*, foi cultivada em meio DMEM (GIBCOTM) suplementado com 5% de soro fetal bovino, antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e antifúngico (1 µg/mL de anfotericina) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A linhagem em cultivo foi mantida em incubadora (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) sob as condições 5% de CO₂ a 37 °C.

3.2 Amplificação do plasmídeo

O plasmídeo MSCV-pig-LIN28B foi gentilmente doado pelo Dr. Joshua Medell (*UT Southwestern Medical Center, Dalas, TX, USA*) (Chang et al., 2009). Para remover o plasmídeo do papel filtro foi adicionado 50 µl de H₂O ultrapura que foi mantida em temperatura ambiente (25 °C) por 15 minutos. Após a amplificação do plasmídeo, as bactérias foram semeadas em meio ágar LB contendo ampicilina e incubadas a 37 °C durante 16 horas. Então, com o crescimento das colônias, os clones foram purificados em coluna de purificação, utilizado o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN *Sample & Assay Technologies*), onde, o DNA plasmidial foi quantificado e transformado na bactéria XL1 blue e replicada em meio LB (Luria-Bertani), o antibiótico ampicilina foi utilizado para seleção. O plasmídeo MSCV-PIG® (Addgene) foi utilizado como controle também foi submetido à amplificação e purificação, conforme descrito anteriormente.

3.3 Transfecção do plasmídeo

Para estabelecermos uma linhagem com ganho da expressão de *LIN28B* transfectamos os plasmídeos, MSCV-PIG® (Addgene) ou MSCV-PIG-Lin28b® na linhagem celular TPC-1 que foi cultivada em placas de 6 poços até atingir 80 a 90% de confluência. A transfecção foi realizada em duplicata, utilizando Lipofectamine 2000® (Invitrogen), onde, 1,0 µg do plasmídeo MSCV-PIG® ou 4,0 µg do plasmídeo MSCV-PIG-Lin28b® foram incubados em meio Optimen® (Invitrogen) à temperatura ambiente por 20 minutos na presença de 2,5 µL de Lipofectamine 2000® em meio Optimen®

(Invitrogen). Após 4 horas o meio de cultura foi trocado para DMEM enriquecido com 5% de soro fetal bovino. Após 24 horas da transfecção, iniciamos a seleção de células transfectadas pela adição de Puromicina [1ug/mL]. As linhagens foram nomeadas: TPCØ, para as células transfectadas com o vetor MSCV-PIG®, e TPCLIN28B, para as células transfectadas com MSCV-PIG-Lin28b® (Figura 5). As linhagens resistentes que foram expandidas, tripsinizadas e congeladas em freezer – 80 °C na presença de 10% DMSO.

A



B

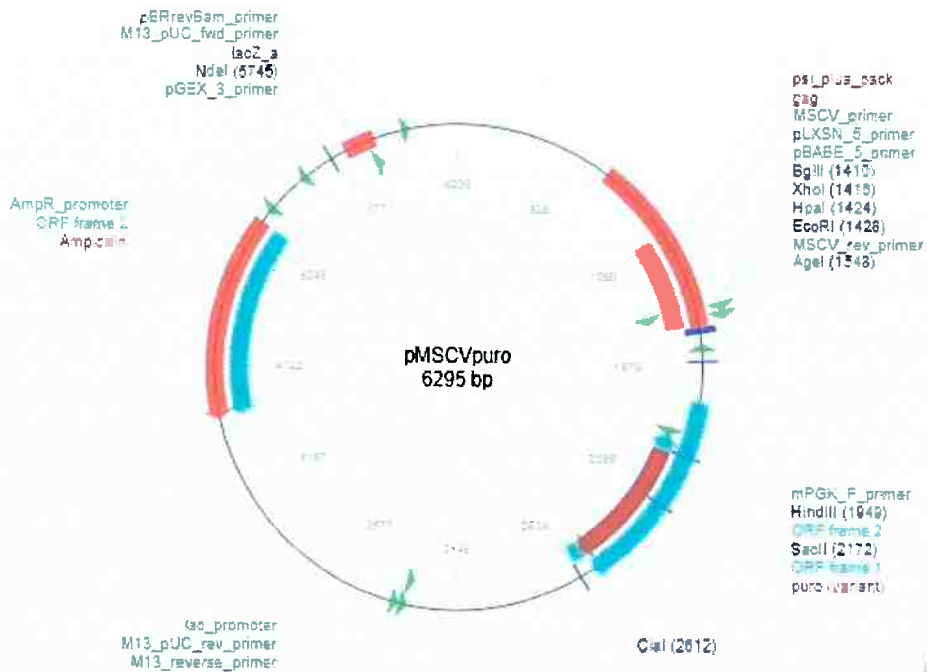


Figura 5 - Mapa dos plasmídeos transfectados para geração da linhagens TPCØ e TPCLIN28B. (A) Mapa do plasmídeo utilizado para gerar a linhagem TPCLIN28B, foi inserido cDNA do LIN28B. **(B)** Mapa do plasmídeo utilizado para gerar a linhagem TPCØ.

3.4 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

3.4.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído das linhagens celulares: TPCØ e TPCLIN28B em triplicata, baseando-se na metodologia desenvolvida por Chomczynski e Sacchi (Chomczynski, Sacchi, 1987) utilizando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen). As células foram plaqueadas em placas de 100 mm até atingirem 80% - 90% de confluência, homogeneizadas com 1 mL TRIzol e 200 µL de clorofórmio. Após homogeneização, foi centrifugado 12.000 g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi coletada e o RNA foi precipitado através da adição de 500 µL de isopropanol, homogeneização e centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido, e o *pellet* foi eluído em 30 µL de H₂O livre de RNase (H₂O tratada com DEPC e autoclavada). O RNA foi

quantificado por espectrofotometria através do valor de absorbância A_{260} , sendo que a pureza foi estimada como ótima quando a razão A_{260}/A_{280} for maior que 1,8.

3.4.2 Síntese de DNA complementar

O DNA complementar foi sintetizado utilizando 10 μL de RNA total (2 μg) que foram incubados na presença de 1 μL de Oligo dT primer (10 μM), 1 μL de RNase Out (40 U/ μL), 1 μL de Deoxynucleotides (dNTP mix) (100 nM), 2 μL de Dithiothreitol (DTT) (0,1 M), 4 μL de 5X Buffer e 1 μL de Enzima Transcriptase Reversa (M-MLV) (200 U/ μL) (Invitrogen). A reação foi realizada a 21 °C por 10 minutos, a 42 °C por 30 minutos e a 99 °C por 10 minutos em termociclador Cyclogene (Thecne, Inglaterra).

3.4.3 PCR em Tempo Real

Para a quantificação do produto formado durante a reação de RT-qPCR para cDNA foi utilizado o reagente SYBR® Green Dye Master Mix (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em volume final de 20 μL , utilizando 5 μL de cDNA diluído 10 vezes a partir do volume final da síntese de cDNA (~5 ng), 5 μL de primers específicos, e 10 μL do reagente 2X Master Mix SYBR® Green no termociclador PCR System ViiA7 (Life Technologies) nas seguintes condições: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minutos.

Foram utilizados *primers* específicos sintetizados através do programa Blast para a detecção da expressão do *LIN28B*, de genes relacionados com a diferenciação tireoidiana e transição epitélio mesênquima (Tabela 1), onde cada sequência sense e antisense foi escolhida em éxons para evitar amplificação genômica. As amostras em triplicata foram normalizadas pelos níveis do gene *RPL19*, que codifica uma proteína ribossomal, sendo utilizado como controle endógeno nas reações de qPCR para a análise de mRNA e calculada através dos valores de Ct pelo programa Q-Gene (Simon, 2003).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos usados para avaliar a expressão gênica

Gene	Nome oficial	Sequência (5' > 3')
<i>LIN28B</i>	<i>lin28 - homologo B</i>	Fw:GGAAGACACTACAGAAAAGAAAACCA Rev:GACTACATTCCCTTAGCATGATGATCAA
<i>RPL19</i>	<i>Proteína ribossomal L19</i>	Fw: TCTCATGGAACACATCCACAA Rev: TGGTCAGCCAGGAGCTTCTT
<i>NKX2-1</i>	<i>NK2 homeobox 1</i>	Fw: CAGCCTGTCCCACCTGAACT Rev: ATAGCAAGGTGGAGCAGGACAT
<i>TPO</i>	<i>Thyroid peroxidase</i>	Fw: ACGCCTCTGCGAGGTGC Rev: TGCAAATCACCGTCGAGGT
<i>TG</i>	<i>Thyroglobulin</i>	Fw: CCTGCTGGCTCCACCTTGTTT Rev: CCTTGTTCTGAGCCTCCCATCGTT
<i>TSHr</i>	<i>Thyroid stimulating hormone receptor</i>	Fw: CCTTCACCTCACACGGGCT Rev: TGCTCTCATTACACATCAAGGACTC
<i>PAX8</i>	<i>Paired box 8</i>	Fw: GGCATGGTGGCAGGAAGT Rev: GCGCCAGGCCTCGCTGTAGGA
<i>VIM</i>	<i>Vimentin</i>	Fw:GGCTCGTCACCTTCGTGAAT Rev: GAGAAATCCTGCTCTCCTCGC
<i>HMGA2</i>	<i>High mobility group AT-hook 2</i>	Fw: AAAGCAGCTCAAAGAAAGCA Rev: TGTTGTGGCCATTTCTAGGT
<i>ZEB1</i>	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 1</i>	Fw: GATGACCTGCCAACAGACCA Rev: GCCCTTCCTTTCCTGTGTCA
<i>ZEB2</i>	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 2</i>	Fw: AGTGTGCCCAACCATGAGTC Rev: TCCTTCATTTCTTCTGGACCATC
<i>SNAIL</i>	<i>Snail family transcriptional repressor 1</i>	Fw: CCAGTGCCTCGACCACTATG Rev: CTGCTGGAAGGTAAACTCTGGA

Todos os oligonucleotídeos foram feitos para *Homo sapiens*

3.5 Análise da expressão proteica por western blotting

3.5.1 Extração de proteínas

As células foram cultivadas em triplicata em placa de 10mm até atingirem confluência 80% - 90%, e então, lavadas com PBS gelado por três vezes e raspadas com 100 µL de Tampão RIPA (20 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1% de Nonidet P-40, 0,5% de desoxicolato de sódio, 1 mM de EDTA e 0,1% de SDS) e 10 µL de cocktail de inibidores de proteases (Sigma, St. Louis, MO, USA). O raspado foi coletado em tubos de 1,5 mL e deixado por 10 min no gelo e posteriormente submetido a centrifugação a 20 000 x g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante contendo o extrato protéico total foi coletado

em novo tubo, quantificado segundo Bradford (1976) e armazenado em freezer -80 °C.

3.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

O equivalente a 30 µg de extrato protéico total, adicionados de 1X *Loading Buffer* (0,5 M de Tris-HCl, pH 6,8; 192 µL/mL de glicerol, 10% de SDS, 1% de azul de bromofenol e 10 µL/mL de β-mercaptoetanol) foram submetidos a incubação a 95 °C por 5 min, e em seguida aplicados em cada canaleta do gel de poliacrilamida. E então, submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 30% em equipamento de eletroforese vertical Mini-Protean® (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) usando tampão de corrida (25 mM de Tris-Base, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS; pH=8,3 Laboratories) à voltagem de 70 V. Em seguida, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose *HybondTMECLTM* (GE Healthcare) 0,45µm, em tampão de transferência de proteína *Towbin* (25 mM de Tris-Base, 192 mM de glicina e 20% de metanol; pH 8,3), por 16-18 h usando o equipamento de transferência úmida Mini-Protean® à voltagem de 30 V.

3.5.3 Imunodeteção

Após a lavagem com solução TBS-T (TBS contendo 0,1% de Tween 20), as membranas foram incubadas com solução de bloqueio (5% leite em TBS-T) por 1 h. A membrana foi incubada com anticorpo primário monoclonal específico para LIN28B (Cell Signaling Technology ®), em diluição 1:1000 em 8 mL de solução TBS-T contendo 5% BSA a 4 °C sob agitação constante por 16 horas. Após 3 lavagens de 10 min com solução TBS-T, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-habbit, conjugado à peroxidase (GE Healthcare, NXA931), em diluição 1:4000 em 4 mL de solução TBS-T contendo 5% de leite por 2 horas à temperatura ambiente. O complexo proteína-anticorpo foi detectado após incubação da membrana com solução reveladora contendo 5,5 µL/mL de 50 mM p-cumárico, 25 µL/mL de 50 mM luminol, 2,5 µL/mL de 3,6% H₂O₂ em 1 mL de Tris-HCl (100 mM; pH 8,8) por 1 minuto e emite quimioluminescência quantificável no equipamento ImageQuant LAS4000 (GE, Little Chalfont, United Kingdom). A densitometria das bandas foi realizada com o programa ImageJ Analysis Software.

3.6 Ensaio de proliferação celular

3.6.1 Proliferação celular

As linhagens TPCØ e TPCLIN28B foram semeadas na densidade de 5×10^4 células/poço em placas de 6 poços. Após 24, 48 e 72 horas, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e coletadas em tubos de 1,5 mL. As células foram fixadas em 3,7% formaldeído e mantidas a 4 °C até o momento da contagem, a qual foi realizada utilizando citômetro Guava EasyCyte Mini Mini (Guava Technologies). Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.6.2 Viabilidade celular

O MTT é um ensaio colorimétrico quantitativo baseado na clivagem do sal amarelo brometo de difenil tetrazólio (MTT) pela enzima mitocondrial desidrogenase e a subsequente formação do cristal azul escuro insolúvel, que se acumula somente no interior das células viáveis. A absorvância detectada em espectrofotômetro é diretamente proporcional ao número de células viáveis. As células das linhagens TPCØ e TPCLIN28B foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 5×10^3 células por poço. Quando as células atingiram a semi- confluência, foram adicionados 10µl / poço de brometo de MTT-3- (4,5-dimetiltiazol-2,5- difeniltetrazólio) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) [2,5 mg/mL]. Após 3 horas, o meio foi removido e as cristais foram solubilizadas em 100 µL de isopropanol/HCl (0,04 M) e o produto da reação foi medido por espectrofotômetro SpectraMax Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA) a 595nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.7 Análise global da expressão dos microRNAs

Análise global da expressão dos microRNAs de humanos foi realizada utilizando o *GeneChip® miRNA 3.0 Array* (Affymetrix), que contém sondas de oligonucleotídeos para 1733 miRNAs maduros e 1658 pre-miRNAs (*miRBase®*, Release 17).

3.7.1 Extração do RNA total e pequenos RNAs (<200nt)

O RNA total foi extraído utilizando RNeasy *Mini KIT* (Qiagen, Hilden, Germany), onde, a fração contendo os pequenos RNA (<200nt) foi isolada utilizando o kit *RNeasy MiniElute Clean-up* (Qiagen, Hilden, Germany). A concentração dos pequenos RNAs foi quantificada no espectrofotômetro *Biomate 3* (Thermo Fisher Scientific).

3.7.2 Marcação dos pequenos RNAs (<200nt)

O *FlashTag HSR RNA Labeling ProcuCE Kit* (Affymetrix) e 200ng de miRNAs foram utilizados para fazer a adição da cauda poly-A biotinizada aos pequenos RNAs, marcando-os. Uma pequena alíquota dos pequenos RNAs marcados foi utilizada para o *ELOSA QC Assay*, para verificar que a adição da cauda-poly-A foi eficiente.

3.7.3 Hibridação e detecção

O cocktail de hibridação foi adicionado aos pequenos RNAs marcados e incubados a 37 °C por 15 minutos, seguido 4 °C para possível armazenamento, antes de serem injetados ao *GeneChip® miRNA 3.0 Array* (Affymetrix), o qual, foi colocado no forno de hibridização, *GeneChip Hybridization Oven 640* (Affymetrix), a 48 °C por 16 horas e na sequência na estação de lavagem *GeneChip® Fluidics Station 450* (Affymetrix, Santa Clara, EUA). Os reagentes do *GeneChip® Hybridization, Wash and Stain* (Affymetrix, Santa Clara, EUA) foram utilizados de acordo com o fabricante. Para detecção o processo consiste na união covalente da biotina com o fluoróforo streptavidina-ficoeritrina (SAPE), seguido de um anticorpo anti-streptavidina-biotina para amplificação do sinal de fluorescência.

3.7.4 Leitura GeneChip® Scanner 3000 7G

Ao término das lavagens inserem-se os *GeneChip® miRNA 3.0 Array* (Affymetrix, Santa Clara, EUA) no carrossel de leitura - *GeneChip® Auto Loader with External Barcode Reader* (Affymetrix, Santa Clara, EUA), que está acoplado ao equipamento de leitura - *GeneChip® Scanner 3000 7G* (Affymetrix, Santa Clara, EUA), comandado pelo

sistema operacional GCOS, que captura intensidade dos sinais de fluorescência de ficoeritrina no comprimento de onda de 570 nm e transforma em valor numérico quantitativo. A leitura de cada microarranjo demora cerca de 5 minutos. Esses sinais são armazenados como imagem de 16-bits, os valores das intensidades captados, de todas as sondas, são armazenados em formato *CEL*.

3.7.5 Análise das imagens

As imagens foram analisadas pelo programa de bioinformática Expression Console™ Software 1.3.1 da Affymetrix. As alterações na expressão dos miRNAs foi calculada comparando o controle (TPCØ) e as células tratadas (TPCLIN28B). A diferença de expressão dos miRNAs entre TPCLIN28B e TPCØ foi calculada por *fold change*.

3.8 Validação da expressão dos miRNAs

3.8.1 Síntese de cDNA de miRNAs

A expressão dos *miRNAs* foi analisada através de ensaios de PCR em Tempo Real utilizando o kit de quantificação de miRNAs *Taqman® MiRNA Assays* específico para este miRNAs (Applied Biosystems). Este sistema utiliza síntese dirigida de cDNA para miRNAs pelo método *Stem-Loop* onde o *primer* específico para o *miRNA* provoca a formação de um grampo sobre si mesmo, gerando maior estabilidade para a transcrição reversa (Chen et al., 2005). Para a síntese de cDNA deste miRNA, foi utilizado o kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Assim, de acordo com instruções do fabricante, 10 ng de RNA total foram utilizados para a síntese, na presença de 1,5 µL de tampão 10X, 0,15 µL de mix de dNTP (100 mM), 0,19 µL de inibidor de RNases (20 U/µL) e 1 µL de transcriptase reversa *Multiscribe®* (50 U/µL), e 3 µL de *primer* específico para miRNAs e 4 µL de H₂O destilada e deionizada. A reação foi realizada no gelo e depois submetida a 16 °C por 30 minutos, 42 °C por 30 minutos, seguida de inativação da transcriptase a 85 °C por 5 minutos, em termociclador Cyclogene (Thecne, Inglaterra).

3.8.2 PCR quantitativo em tempo real para validação da expressão dos miRNAs

O cDNA gerado foi diluído através da adição de 87,5 µL de H₂O Miliq e 9 µL foram

utilizados para a reação de PCR em tempo real em conjunto com 10 μ L de TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, No AmpErase[®]UNG (2X concentrado) (Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA) e 1 μ L do mix (20X concentrado) contendo *primers* e sondas específicas para cada miRNA contidas nos kits: TaqMan[®] MicroRNA Assays para miR-4488 e miR-4674. A reação foi realizada no termociclador PCR System Viia 7[™] (Life Techonologies). A detecção dos endógenos do pequeno RNA nuclear 6B - *RNU6B* (assay 1093) (Applied Biosystems) foi utilizada como gene de referência ara normalização da expressão dos miRNAs em células humanas. Os valores de Cts foram submetidos à análise do programa Q-Gene.

3.9 Análise *in silico* dos miRNAs diferencialmente expressos

Para identificarmos a influência do alto nível de expressão do LIN28 nas células TPC- 1, nós procuramos por sítios de ligação do LIN28 no precursor (pre-mirna) e no primário (pri- mirna), 150nt à jusante e 150nt a montante dos miRNAs mais diminuídos, extraídos do Mirbase database (Release 21) e do BLAT Search Genome. Os sítios de ligação do LIN28 já descritos são GGAG, GAAG e AGGG, os quais foram sublinhados na sequência do pri-mirna e/ou do pre-mirna e então, foi feita uma tabela com a quantidade de sítio que cada miRNA possui.

3.10 Análise estatística

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da expressão de LIN28B na linhagem TPC-1

A análise da expressão de gênica de *LIN28B* na linhagem, TPCLIN28B por RT-qPCR, mostra um aumento maior que 10 vezes em relação a linhagem TPCØ (Figura 6A). A análise da expressão protéica de TPCLIN28 por *western blotting*, indica aumento de 1,8 vezes (Figura 6B). Ambos os experimentos mostram a super-expressão de LIN28B na linhagem gerada TPCLIN28B.

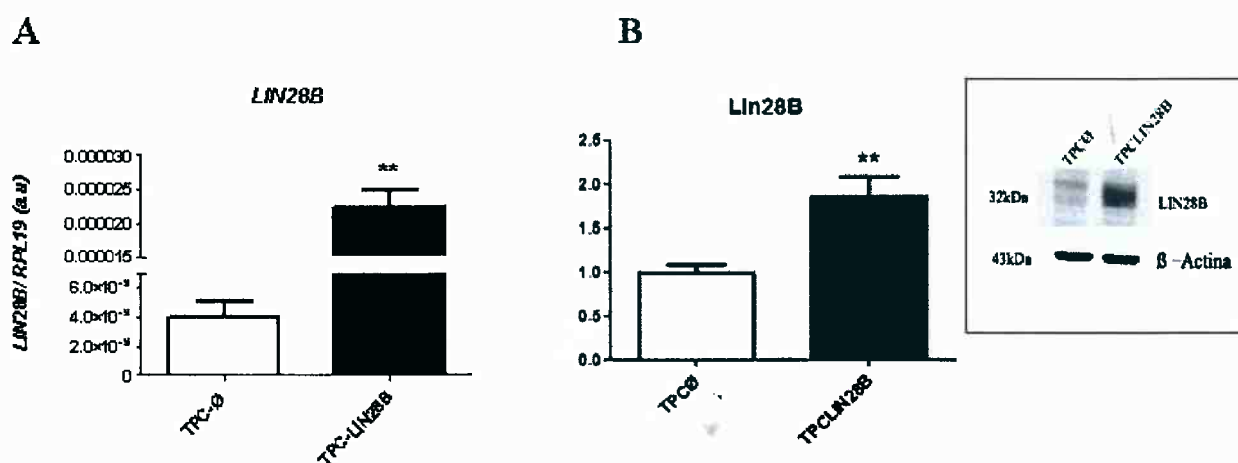


Figura 6 – Análise de expressão de LIN28B após a transfecção na linhagem TPC-1. (A) Análise de expressão gênica de LIN28B na linhagem TPCLIN28B confirmada por RT-qPCR. **(B)** Análise proteica de Lin28b, indicando aumento da expressão. Figura representativa a direita do Western Blotting. A proteína β-Actina foi utilizada como normalizador. (n=3; DP e p < 0,01).

4.2 Efeito da super-expressão de LIN28B no carcinoma papilífero de tireoide

Para avaliar o efeito da super-expressão de LIN28B no carcinoma papilífero de tireoide realizamos o teste de contagem de células por citometria de fluxo. As linhagens TPCØ e TPCLIN28B foram cultivadas por 24, 48 e 72 horas e apresentaram um aumento replicativo progressivo, porém, não se observa a influência entre as linhagens TPCØ e com super-expressão de LIN28B (Figura 7A). O ensaio de viabilidade celular, realizado por MTT, nas linhagens, TPCØ e TPCLIN28B, não mostra diferença na absorbância entre os grupos (Figura 7B).

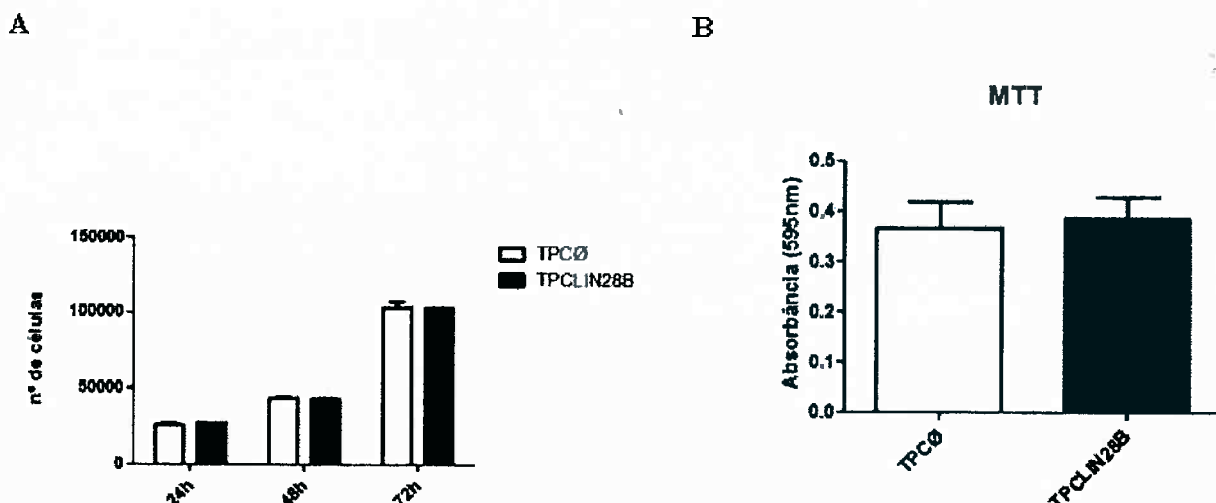


Figura 7 – LIN28B e sua influência no carcinoma papilífero de tireoide. (A) As linhagens (TPCØ e TPCLIN28B) foram cultivadas por 24h, 48h e 72h e contadas por citometria de fluxo. Não observamos um aumento no número de células sob influência de LIN28B. (B) As células foram submetidas ao MTT, onde, a linhagem TPCLIN28B não mostrou alteração na viabilidade celular quando comparada com TPCØ. Ambos os ensaios foram feitos em triplicata e a barra representa o desvio padrão calculado.

Ambos os resultados mostram que no carcinoma papilífero de tireoide o aumento de expressão de LIN28B não modifica o padrão de proliferação e viabilidade celular. Estudos em células de câncer de cabeça e pescoço mostram que o nível de expressão aumentado de LIN28 está correlacionado com o aumento do tumor e a progressão tumoral (Alajez et al, 2012). Por outro lado, no câncer de estômago o aumento da expressão de LIN28 inibe a proliferação e migração celular e a progressão no ciclo celular (Song et al., 2014). Indicando que a atuação do LIN28 é específica para cada carcinoma, onde estudos mostram diferentes consequências no crescimento tumoral.

4.3 Influência do Lin28B na expressão dos marcadores da diferenciação tireoidiana no CPT

A análise da expressão de marcadores da diferenciação tireoidiana como: *TSHr*, *TPO*, *Tg*, *NIS*, *PAX8* e *NKX2-1* foi feita por RT-qPCR. Observamos que os níveis de expressão na linhagem TPCLIN28B de *NKX2-1* e *PAX-8* está aumentado 3,23 vezes e 2 vezes, respectivamente (Figura 8) e *Tg* não mostrou alteração. Por outro lado, níveis transcricionais de outros marcadores *TSHr*, *TPO* e *NIS* não foram detectados.

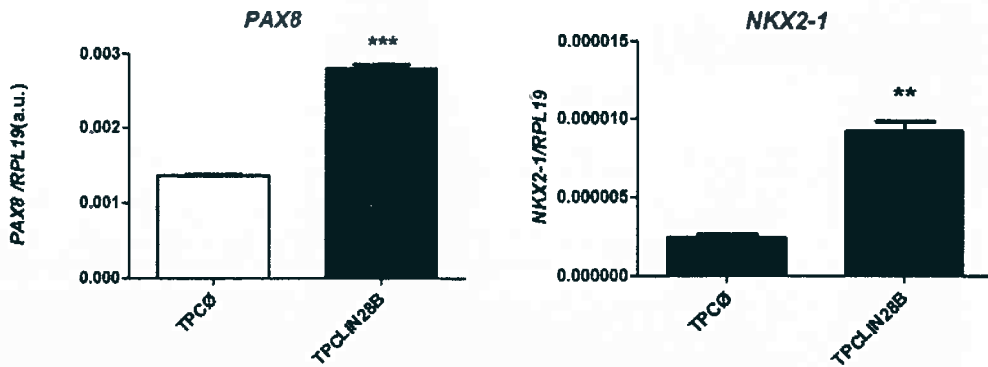


Figura 8 - Influência de LIN28B na expressão dos fatores transcricionais *PAX-8* e *NKX2-1*. Expressão de *PAX-8* e *NKX2-1* na linhagem TPCLIN28B. Os valores no eixo Y estão mostrados em unidades arbitrárias (a.u.). O gene RPL19 foi utilizado como normalizador da reação. (n=3; DP e p < 0,01)

Sabe-se que *NKX2-1* juntamente com *PAX8*, são importantes fatores de transcrição específicos no desenvolvimento e função celular da tiroide (Mansouri et al., 1998; Di Palma et al., 2003). Durante a progressão maligna, o câncer de tiroide perde diferenciação, tornando-se mais agressivo e menos responsivo a tratamentos. Um estudo mostrou que células de carcinomas anaplásicos quando transfectadas com vetores que induzem a reexpressão destes genes voltam a expressar *Tg* e *TPO*, genes importantes no desenvolvimento e função celular da tiroide (Ros et al., 1999), mostrando que além de indicadores do estado de diferenciação da célula folicular no câncer, *NKX2-1* e *PAX8* são potentes genes alvos a serem corrigidos em terapia gênica direcionada para o tratamento de carcinoma indiferenciado de tiroide. No nosso modelo embora haja expressão dos *PAX8* e *NKX2-1* não detectamos a expressão de *TSHr*, *TPO* e *NIS*.

Nova evidência obtida por meio de um estudo genômico em larga escala, TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), que analisa 507 pacientes com CPT e cujos dados encontram-se disponíveis no banco público do cBioPortal (<http://www.cbioportal.org>) sugere que, paciente que apresentam o aumento da expressão de *LIN28B* não mostram aumento de *PAX8* ou de *NKX2-1*, e ainda é possível observar que ocorre diminuição de *NKX2-1* em dois pacientes (Figura 9). Interessantemente, podemos notar que quando não ocorre diferença na expressão de *LIN28B* todos os pacientes mostram diferença de expressão de *PAX8* e/ou de *NKX2-1*, sendo um aumento ou uma diminuição (Figura 9). Nossos resultados sugerem a importância de *LIN28B* na manutenção da expressão de marcadores de expressão *PAX8* e *NKX2-1*, que se observa também nos pacientes analisados no TCGA.



Figura 9 – Análise da expressão de *LIN28B*, *PAX8* e *NKX2-1* em pacientes do projeto TCGA através da plataforma cBioPortal. Cada barra cinza da figura representa um paciente, permitindo ver a diferença de expressão entre *LIN28B*, *PAX8* e *NKX2-1*. (Fonte cBioPortal, acessado em: 2/10/2017)

4.4 Influência de LIN28B na expressão dos marcadores de transição epitélio mesênquima no CPT

Evidências recentes mostram que a transição epitélio mesênquima (TEM) desempenha um papel fundamental na progressão de tumores e metástases. Com isso avaliamos a influência da super-expressão de LIN28B nos níveis de expressão dos marcadores de TEM como, *HMGA2*, *Vimentina*, *Snail*, *ZEB1* e *ZEB2* no carcinoma papilífero de tireoide. A indução de LIN28B na linhagem TPC-1 diminuiu os níveis transcripcionais de marcadores de transição epitélio mesênquima, *HMGA2* 0,62 vezes, *SNAIL* 0,69 vezes, *VIMENTINA* 0,59 vezes mas não mostra alteração de *ZEB1* e *ZEB2* (Figura 10).

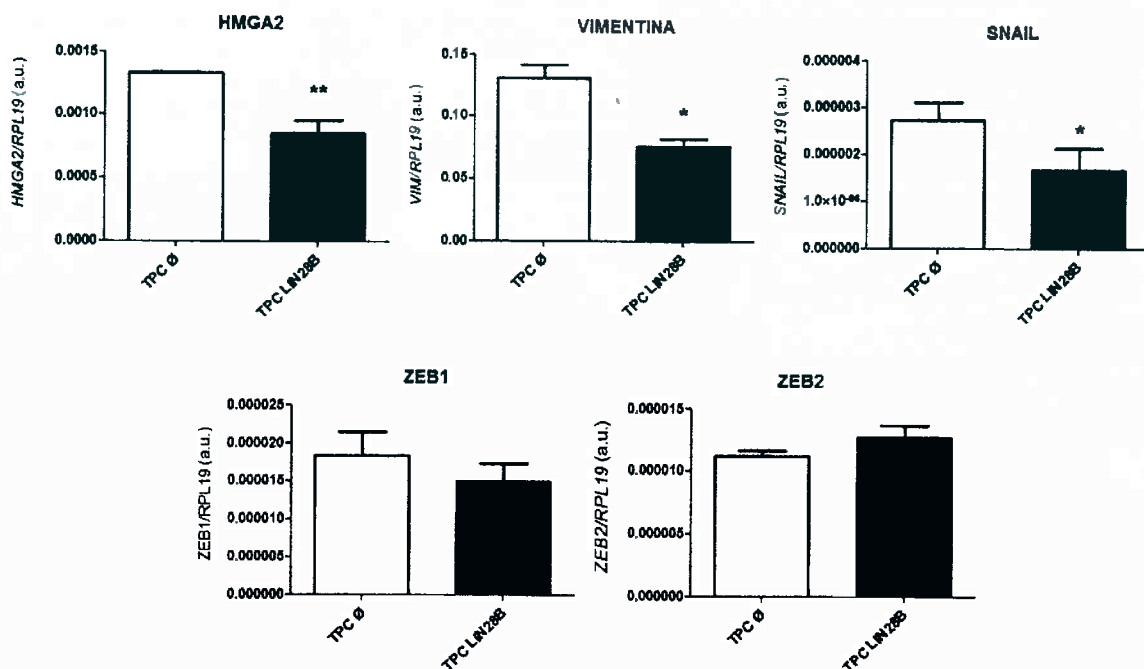


Figura 10 – Influência de LIN28B sobre os marcadores clássicos de transição epitélio mesênquima no CPT. Expressão alterada nos níveis de HMG2, SNAIL e Vimentina na linhagem TPCLIN28B. Os valores no eixo Y estão mostrados em unidades arbitrárias (a.u.). O gene RPL19 foi utilizado como normalizador da reação. (n=3; DP e p< 0,05).

A transição do epitélio-mesênquima no câncer de tireoide é explorado utilizam tecidos ou linhagens celulares de carcinomas anaplásicos, os marcadores de TEM tais como *HMG2*, *SNAIL*, *Vimentina*, *ZEB1/2* apresentam-se alterados (Buehler et al., 2013). Vasko et al, 2007 mostrou que CPT invasivos apresentam um aumento da expressão de Vimentina, e está é responsável pela TEM na tireoide. A Vimentina desempenha um papel importante dando suporte e ancorando as organelas no citosol (Dutsch-Wicherek et al, 2010), apesar desta função já ser bastante conhecida, existem evidências de que este filamento exerça um papel regulatório em outras funções celulares envolvendo a adesão, migração e sinalização celular e desempenhando um papel essencial na TEM (Ivaska et al., 2007). O aumento da expressão de ZEB1 no carcinoma anaplásico está associado com a diminuição da E-caderina e a progressão tumoral (Montemayor-Garcia et al., 2013). Em camundongos a expressão de Snail na glândula tireoide é associada com a progressão do carcinoma papilífero (Hardy et al, 2007).

A comparação com dados do TCGA mostra que pacientes com expressão não alterada de *LIN28B* apresentam aumento da expressão de um ou mais marcadores da TEM e na super- expressão de *LIN28B* não ocorre aumento significativo destes fatores (Figura 11). Nesse contexto, o aumento de expressão de *LIN28B* permite a manutenção da

expressão de marcadores da TEM.



Figura 11 – Dados de pacientes com carcinoma papilífero (TCGA). Cada barra cinza da figura representa um paciente, permitindo ver a diferença de expressão entre LIN28B e os marcadores de transição epitélio mesênquima (Fonte cBioPortal, acessado em: 5/10/2017)

4.5 Análise da expressão global de miRNAs na linhagem TPCLIN28B

Por meio do *GeneChip® miRNA 3.0 Array* (Affymetrix), que contém sondas de oligonucleotídeos para 1733 genes humanos (*miRBase®*, Release 17), foi possível identificarmos a expressão global dos miRNAs diferencialmente expressos na linhagem TPC- 1 com super-expressão de *LIN28B*. Observamos que 262 miRNAs estão com a sua expressão aumentada e 44 miRNAs estão com a sua expressão diminuída, ($> \pm 2$ - fold change). Na tabela 2 listamos os 15 miRNAs que se apresentaram mais ou menos expressos.

Tabela 2 - Expressão dos 30 miRNAs mais diferencialmente expressos sob influência da super-expressão de LIN28B no CPT

<u>miRNAs diminuídos</u>	<u>Fold Change</u>	<u>miRNAs aumentados</u>	<u>Fold Change</u>
hsa-miR-3185	-13,16	hsa-miR-221-5p	+10,34
hsa-miR-4488	-11,82	hsa-miR-1303	+7,45
hsa-miR-4745-5p	-10,98	hsa-miR-514b-5p	+6,21
hsa-miR-4734	-9,88	hsa-miR-30b-3p	+5,08
hsa-miR-4516	-8,82	hsa-miR-548a-3p	+4,79
hsa-miR-3940-5p	-8,79	hsa-miR-4258	+4,48
hsa-miR-3196	-7,63	hsa-miR-4725-5p	+4,48
hsa-miR-2861	-7,55	hsa-miR-509-5p	+4,48
hsa-miR-1915-3p	-6,98	hsa-miR-3609	+4,27
hsa-miR-3656	-6,88	hsa-miR-4716-3p	+4,19
hsa-miR-4466	-6,74	hsa-miR-215-5p	+4,12
hsa-miR-4674	-5,43	hsa-miR-197-3p	+4,1
hsa-miR-4505	-5,41	hsa-miR-4487	+4,09
hsa-miR-3135b	-5,41	hsa-miR-4708-3p	+4,04
hsa-miR-4707-5p	-5,31	hsa-miR-4657	+3,82

Sabemos que o Lin28 regula negativamente a expressão do *let-7*, ao impedir que este miRNA seja processado em diferentes etapas da sua biogênese (Viswanathan et al., 2008; Viswanathan et al., 2010). O desbalanço na expressão de miRNAs é específico nos diferentes histotipos de câncer derivados da célula folicular tiroideana (He et al., 2005; Weber et al., 2006; Visone et al., 2007). Então, além das alterações genéticas clássicas, observa-se que a expressão de determinados miRNAs ocorre conforme a progressão do câncer de tireoide. O aumento na expressão de miRNAs como: *miR-221/222*, *miR-146*, e do cluster *miR-17-92* ou a diminuição de *let-7*, *miR-30* e *miR-200* já descritos previamente que estes miRNAs atuam como oncomiRs ou supressores tumorais e, portanto, potencializar a tumorigênese e progressão do câncer de tireoide (He et al., 2005; Fuziwara e Kimura, 2015).

O aumento na expressão de LIN28B modula fortemente a expressão dos miRNAs (Tabela 2). A expressão de miRNAs com perfil já descritos como aumentados em tumores de tireoide tiveram sua expressão aumentada sustentada mesmo com a modulação do LIN28B, como *miR-221* (*fold change* +10,34), *miR-222* (*fold change*: +2,23) e alguns componentes do cluster *miR-17-92* (*miR-17*, *fold change*: +3,09 e *miR-19a*, *fold change*:

+2,19). Sugerindo que o aumento na expressão de LIN28B potencializa a expressão destes miRNAs.

Dentre os miRNAs modulados por LIN28B, o *miR-1303* (*fold – change* +7,45), possui um importante papel nos carcinomas coloretais, hepatocelular e sua expressão está aumentada em tumores avançados de câncer gástrico e metástases (Murr et al., 2012; Ayaz et al., 2013; El-; Maurel et al., 2013; Zhang et al., 2014) mas não existe relação com o câncer de tireoide. O silenciamento da expressão de *LIN28B* no carcinoma de próstata mostrou que alguns miRNAs tem sua expressão aumentada, entre eles o, *miR-146a* (Borrego-Diaz et al., 2014). Em contraste, o aumento da expressão de LIN28B em CPT apresenta diminuição do m *miR-146*, (*fold change*: -2,06) no nosso modelo, essa relação inversa enfatiza o potencial de modulação de expressão dos miRNAs devido a ação do LIN28 em diferentes tipos de câncer.

A ação de bloqueio no processo de maturação dos miRNAs, da família de *let-7*, é o exemplo melhor caracterizado na desregulação de expressão de miRNAs e de ação do LIN28B. Houve uma diminuição de alguns miRNAs da família *let-7*, como: *let-7a* (*Fold-Change*: -1,03), *let-7b* (*Fold-Change*: -1,11), *let-7c* (*Fold-Change*: -1,11), *let-7d* (*Fold-Change*: -1,25), *let-7e* (*Fold-Change*: -1,27), *let-7f* (*Fold-Change*: -1,37), *let-7g* (*Fold-Change*: -1,16), *let-7g** (*Fold-Change*: -1,03) e *let-7i* (*Fold-Change*: -1,24). Observamos a diminuição na expressão mais de 10 vezes dos miRNAs, *miR-3185* (*Fold change*: -13,16), *miR-4488* (*Fold change*: -11,82) e *miR-4745-5p* (-10,98), sugerindo a potente atuação de LIN28B no processo de maturação desses miRNAs. Na oncogênese, miRNAs com expressão diminuída são considerados potenciais supressores tumorais, a perda de expressão deste miRNAs pode levar a tradução e ativação de genes oncogênicos, tendo como consequência a progressão e maior agressividade tumoral (Esquela-Kerscher, Slack FJ et al., 2006).

Sabemos da ação supressora de *let-7* em diversos genes oncogênicos dentre eles, *HMGA2*. A alta expressão de *let-7* na linhagem TPC-1 corresponde há diminuição os níveis de *HMGA2* (Ricarte-Filho et al., 2009). Curiosamente observamos que mesmo com a indução de LIN28B na linhagem TPC-1 a expressão de alguns miRNAs da família *let-7* encontram-se aumentados, dentre eles: *let-7a** (*Fold-Change*: 1,69), *let-7a-2** (*Fold-Change*: +1,48), *let-7b** (*Fold-Change*: +1,4), *let-7d** (*Fold-Change*: +2,76), *let-*

*7e** (Fold-Change: +1,77), *let-7f-1** (Fold-Change: +1,67), *let-7f-2** (Fold-Change: +1,90) e *let-7i** (Fold-Change: +1,65), podendo estes miRNAs estarem bloqueando a tradução do mRNA do HMGA2, e inibindo o processo de transição de epitélio mesênquima.

Além disso, análise *in silico* no programa *TargetScan*[®] mostram que miRNAs com expressão aumentada em nosso *microarray*, regulam negativamente a expressão de genes como *Vimentina*, regulado negativamente por *miR-124-3p* (Fold-Change: +2,36) e *miR-30-5p* (Fold-Change: +5,08), o mesmo com *ZEB1*, onde, *miR-1271* (Fold-Change: +3,02), *miR-183* (Fold-Change: +2,64), *miR-454* (Fold-Change: +2,35), *miR-150* (Fold-Change: +2,03), *miR-200c* (Fold-Change: +2,01) e *miR-101* (Fold-Change: +2,01), *ZEB2* por *miR-124-3p* (Fold-Change: +2,36) e *SNAIL*, *miR-30-5p* (Fold-Change: +5,08), *miR-25-3p* (Fold-Change: +2,93), *miR-92-3p* (Fold-Change: +2,78) e *miR-153-3p* (Fold-Change: +2,01). Esses dados juntamente com os gerados por RT-qPCR, mostram que a diminuição da expressão desses genes pode estar associada com a modulação na expressão desses miRNAs influenciados pela super-expressão do LIN28B.

O LIN28B modula significativamente a expressão de diversos miRNAs, sugerindo um importante papel dessa proteína na regulação de miRNAs, que potencialmente podem interferir em processos biológicos importantes no carcinoma papilífero de tireoide.

4.6 Análise *in silico*: miRNAs com a expressão diminuída possuem sítios de ligação do LIN28B (GGAG, GAAG e AGGG)

O mecanismo de ação melhor caracterizado do LIN28 é a sua ligação através do seu domínio zinc finger em sequências GGAG, GAAG e AGGG, inibindo o processo de maturação do *le-7*. Neste contexto, realizamos a análises *in silico* da sequência dos miRNAs com expressão diminuída, buscando pelo segmento gênico GGAG, GAAG e AGGG no *pre-miRNA* (150nt *upstream* and 150nt *downstream*). Na tabela 3 listamos a presença dos segmentos gênicos nos 15 miRNAs com expressão diminuída por LIN28 já detectados.

Tabela 3 – MiRNAs com sítios de ligação para LIN28B

miRNAs diminuídos	Sítios de ligação do LIN28B 3' stem loop (pri e pre-miRNAs)			Total
	GGAG	AGGG	GAAG	
hsa-miR-2861	5*	1	3	9
hsa-miR-4674	6	2	0	8
hsa-miR-4488	3	3	0	6
hsa-miR-4707-5p	4	2	0	6
hsa-miR-4734	3	1	1	5
hsa-miR-4516	0	3	2	5
hsa-miR-4505	1	1	3	5
hsa-miR-1915-3p	0	2	2	4
hsa-miR-3196	0	2	1	3
hsa-miR-3656	0	2	1	3
hsa-miR-4466	1	0	2	3
hsa-miR-3940-5p	0	2	0	2
hsa-miR-3135b	0	1	0	1
hsa-miR-3185	0	0	0	0
hsa-miR-4745-5p	0	0	0	0

*Os números indicam a quantidade de cada sítio de ligação presente no pre-miRNA dos microRNAs.

Avaliamos a localização dos sítios de ligação, os miRNAs, *miR-4488* e *miR-4674* possuem sítios GGAG e AGGG em posição semelhante aos do *let-7*, no braço 3' após a estrutura *hairpin*, semelhantes aos descritos no *let-7* (Figura 12).

```

5'...TATGATACCACCCGGTACAGGAGATAACTGTACAGGCCACTGCCTTGCCA 3'- let-7g
5'...GCTCCGGCGCTGGGACCCACTAGGGTGGCGCCTTGGCCCCGCCCCGCC 3'- miR-4488
5'...GTCCCTCCTCCCCGGAGAGGCTGGGCTCGGGACGCGCGGCTCAGCTCGGG 3'- miR-4674

```

Figura 12 – Sítio de ligação de LIN28B nos miRNAs. Representação esquemática do miRNA maduro do *let-7g*, *miR-4488* e *miR-4674*, mostrando a similaridade da posição do sítio de interação. Letras sublinhadas indicam a estrutura *hairpin* e as letras em negrito o sítio de interação.

4.7 Validação dos miRNAs com expressão diminuída por LIN28B no CPT.

O método de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) e kits para *miR-4488* e *miR-4674* foram utilizados para confirmar a expressão diminuída destes miRNAs. A validação da diminuição da expressão dos miRNAs foi confirmada (Figura 13), fato este que permite seguir com a hipótese da potencial interação entre novos miRNAs e LIN28, o que amplia o potencial de ação desta proteína.

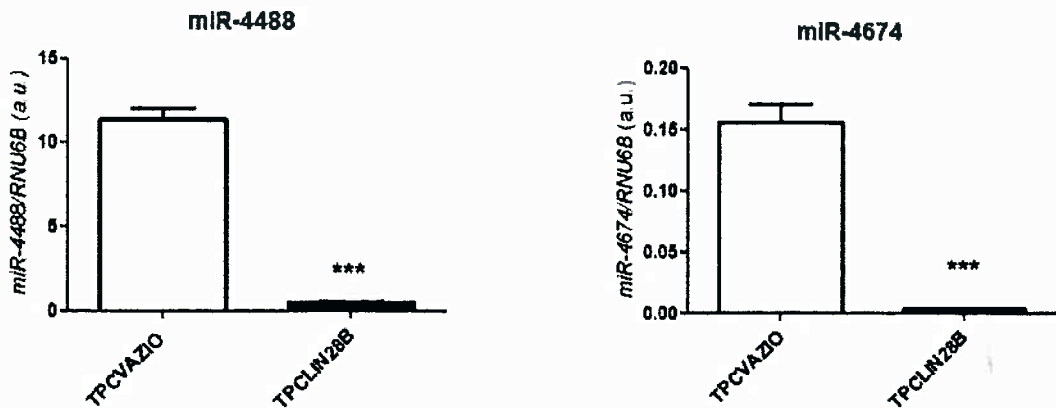


Figura 13 – Análise da diminuição da expressão dos miRNAs *miR-4488* e *miR-4674* na linhagem TPCLIN28B. *MiR-4488* e *miR-4674* tiveram suas diferenças de expressão confirmadas por qPCR na linhagem TPCLIN28B quando comparada com o seu controle onde, $p \leq 0,0003$. Três réplicas foram usadas para calcular o erro padrão.

Através de ferramentas de predição de alvos de miRNAs, foram utilizados algoritmos disponíveis em bancos de dados públicos, no TargetScan encontramos que o *miR-4674* é um possível regulador negativo da expressão de LIN28B, assim como ocorre com o duplo *feedback* entre LIN28-let-7. O aumento da expressão do *miR-4674* foi recentemente relacionado a diminuição da expressão de *γ -synuclein*, cuja expressão é sempre correlacionada com a progressão da doença, estimula proliferação, induz invasão e metástase de células cancerígenas (Surgucheva et al., 2013). O *miR-4488* ainda não possui nada descrito na literatura correlacionando-o com câncer e mais detalhes da sua ação precisa ser investigada. Ambos os miRNAs validados precisam ter a ação esclarecida no carcinoma papilífero de tireoide para melhor o entendimento da sua função nessa patologia.

5 CONCLUSÕES

O modelo de super-expressão de LIN28B em linhagem TPC-1:

- ✓ Não altera a proliferação e viabilidade celular
- ✓ Promove a diminuição da expressão de genes da diferenciação tiroideana, *PAX-8* e *TTF1*
e de genes da transição epitélio mesênquima, *HMGA2*, *Vimentina* e *SNAIL*.
- ✓ A super-expressão de LIN28B altera a expressão global de miRNAs, 262 com expressão aumentada ($\geq 2x$) e 44 com expressão diminuída ($\leq 2x$).
- ✓ Identificamos miRNAs com potenciais sítios de ligação no seu precursor, *miR-4488* e *miR-4674*

O LIN28B super expresso colabora para a alteração da expressão dos miRNAs, assim como a modulação de genes da diferenciação e da transição epitélio mesênquima sugerindo uma potencial ação na transformação maligna do carcinoma papilífero de tireoide.

REFERENCIAS*

Ambros V, Horvitz HR. Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 1984; 226(4673):409-16.

Alajez NM, Shi W, Wong D, et al. Lin28b Promotes Head and Neck Cancer Progression via Modulation of the Insulin-Like Growth Factor Survival Pathway. *Oncotarget*. 2012;3(12):1641-52.

Ayaz L, Görür A, Yaroğlu HY, Özcan C, Tamer L. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with laryngeal squamous cell carcinoma: potential early-detection markers for laryngeal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Sep;139(9):1499-506.

Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*. 2008; 40(5):499-507.

Braun JE, Huntzinger E, Fauser M, Izaurralde E. GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol Cell*. 2011; 44(1):120-33.

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

Brosius J., Tiedge H. RNomenclature. *RNA Biol*. 2004; 1(2):81-3

Buehler D, Hardin H, Shan W, Montemayor-Garcia C, Rush PS, Asioli S, Chen H, Lloyd RV. Expression of epithelial-mesenchymal transition regulators SNAI2 and TWIST1 in thyroid carcinomas. *Mod Pathol*. 2013 26(1):54-61

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 U S A*. 2002; 99(24):15524-29.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162(1):156-59.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [2011 July 2015]. Available from: <http://www.icmje.org>

Colamaio M, Gaetano C, Sarnataro D, Borbone E, Pallante P, Decaussin-Petrucci M, Nitsch L, Croce CM, Battista S, Fusco A. *Let-7a* down-regulation plays a role in thyroid neoplasias of follicular histotype affecting cell adhesion and migration through its ability to target the *FXYD5* (Dysadherin) gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97: E2168-78.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004; 432(7014):231-35.

Dettmer M, Perren A, Moch H, Komminoth P, Nikiforov YE, Nikiforova MN. Comprehensive MicroRNA Expression Profiling Identifies Novel Markers in Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma. *Thyroid.* 2013;23(11):1383-89.

Dettmer MS, Perren A, Moch H, Komminoth P, Nikiforov YE, Nikiforova MN. MicroRNA profile of poorly differentiated thyroid carcinomas – new diagnostic and prognostic insights. *Journal of molecular endocrinology.* 2014;52(2):181-9.

Di Palma T, Nitsch R, Mascia A, Nitsch L, Di Lauro R, Zannini M. The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. *J Biol Chem.* 2003 Jan 31;278(5):3395-402.

Dutsch-Wicherek M, Lazar A, Tomaszewska R. The Potential Role of MT and Vimentin Immunoreactivity in the Remodeling of the Microenvironment of Parotid Adenocarcinoma. *Cancer Microenviron.* 2010 Dec 15;4(1):105-13.

El-Murr N, Abidi Z, Wanherdrick K, Svrcek M, Gaub MP, Fléjou JF, Hamelin R, Duval A, Lesuffleur T. MiRNA genes constitute new targets for microsatellite instability in colorectal cancer. *PLoS One.* 2012;7(2):e31862.

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

Fuziwara CS, Kimura ET. Insights into Regulation of the miR-17-92 Cluster of miRNAs in Cancer. *Front Med (Lausanne).* 2015;8(2):64.

Fuziwara CS, Kimura ET. MicroRNA Deregulation in Anaplastic Thyroid Cancer Biology. *International Journal of Endocrinology.* 2014b;2014:743450.

Fuziwara, C. S.; Kimura E. T. High iodine blocks a Notch/miR-19 loop activated by the BRAF(V600E) oncoprotein and restores the response to TGF β in thyroid follicular cells. *Thyroid.* 2014a; 24(3): 453-62.

Geraldo MV, Yamashita AS, Kimura ET. MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF-beta by repressing SMAD4 in thyroid cancer. *Oncogene.* 2012; 31(15):1910-22.

Gregory R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004;432: 235-40.

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 2005; 123(4):631-40.

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

Han J, Lee Y, Yeom, KH, Kim, YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Dev*. 2004; 18 (24): 3016-27.

Hardy RG, Vicente-Dueñas C, González-Herrero I, Anderson C, Flores T, Hughes S, Tselepis C, Ross JA, Sánchez-García I. Snail family transcription factors are implicated in thyroid carcinogenesis. *Am J Pathol*. 2007 Sep;171(3):1037-46.

He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy 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 Dec 27;102(52):19075-80.

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

Heo I, Joo C, Kim YK, Ha M, Yoon MJ, Cho J, Yeom KH, Han J, Kim VN. TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell*. 2009;138 (4):696-708.

INCA. [internet]. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA). 2014. [acesso em 10 jun. 2017]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>.

Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res*. 2007 Jun 10;313(10):2050-62.

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

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

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

King C, Cuatrecasas M, Castells A, Sepulveda A, Lee J-S, Rustgi AK. Lin28b promotes colon cancer progression and metastasis. *Cancer research.* 2011;71(12):4260-68.

King C, Wang L, Winograd R, et al. LIN28B fosters colon cancer migration, invasion, and transformation through let-7 dependent and independent mechanisms. *Oncogene.* 2011;30(40):4185-93.

Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post- transcriptional regulation. *Nat Genet.* 2002; 30(4):363-64.

Landthaler M., Yalcin, A., and Tuschl, T. The human DiGeorge syndrome critical region Gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr. Biol.* 2004; 14(23): 2162-67.

Lee RC, Feinbaum RL e Ambros V. The *C elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993; 75 (5): 834-54

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(6956):415-19.

Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell.* 2003; 115(7):787-98.

Li, Y. et al. The Lin28/let-7a/c-Myc pathway plays a role in non-muscle invasive bladder cancer. *Cell Tissue Res.* 2013; 354 (2): 533-41.

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

Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P. *Nat Genet.* Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. 1998 May;19(1):87-90.

Maurel M, Jalvy S, Ladeiro Y, Combe C, Vachet L, Saggiocco F, Bioulac-Sage P, Pitard V, Jacquemin-Sablon H, Zucman-Rossi J, Laloo B, Grosset CF. A functional screening identifies five microRNAs controlling glypican-3: role of miR-1271 down-regulation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2013 Jan;57(1):195-204.

McGregor D, Diaz FJ, Wang X, Veldhuizen PV. A potential regulatory loop between Lin28B:miR-212 in androgen-independent prostate cancer. *Int J Oncol.* 2017;45(6):2421-9.

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

Montemayor-Garcia C, Hardin H, Guo Z, Larrain C, Buehler D, Asioli S, Chen H, Lloyd RV. The role of epithelial mesenchymal transition markers in thyroid carcinoma progression. *Endocr Pathol.* 2013 Dec;24(4):206-12.

Moss EG, Lee RC, Ambros V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell.* 1997; 88 (5):637-46.

Moss, E. G.; Tang, L. Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its developmental expression and microRNA complementary sites. *Dev Biol.* 2003; 258 (2): 432-42.

Murray MJ, Saini HK, Siegler CA, Hanning JE, Barker EM, van Dongen S, Ward DM, Raby KL, Groves IJ, Scarpini CG, Pett MR, Thornton CM, Enright AJ, Nicholson JC, Coleman N. LIN28 Expression in malignant germ cell tumors downregulates *let-7* and increases oncogene levels. *Cancer Res.* 2013; 73(15):4872-84.

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

Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duan H, Chou YT, Lai EC. The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol.* 2008; 15(4):354-63.

Olivé AN. Influência de LIN28 na expressão de *let-7f* no câncer papilífero de tireoide [dissertação (Mestrado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Pallante P, Visone R, Ferracin M, Ferraro A, Berlingieri MT, Troncione G, Chiappetta G, Liu CG, Santoro M, Negrini M, Croce CM, Fusco A. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer.* 2006; 13(2): 497-508.

Park JE, Heo I, Tian Y, Simanshu DK, Chang H, Jee D, Patel DJ, Kim VN. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature.* 2011;

475(7355):201-05.

Piskounova E, Polytarchou C, Thornton JE, LaPierre RJ, Pothoulakis C, Hagan JP, Iliopoulos D, Gregory RI. Oncogenic Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms. *Cell*. 2011; 147(5):1066-79.

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

Ros P, Rossi DL, Acebrón A, Santisteban P, Borrego-Diaz E, Powers BC, Azizov V, Lovell S, Reyes R, Chapman B, Tawfik O. Thyroid-specific gene expression in the multi-step process of thyroid carcinogenesis. *Biochimie*. 1999 Apr; 81(4):389-96.

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

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

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

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

Summers, M. F. et al. Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1. *Protein Sci*. 1992; 1(5):563-74.

Surgucheva I, Gunewardena S, Rao HS, Surguchov A. Cell-Specific Post-Transcriptional Regulation of γ -Synuclein Gene by Micro-RNAs. *Bhattacharya S, ed. PLoS ONE*. 2013; 8(9):e73786.

Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, He H, Auer H, Liyanarachchi S, Larin A, Savchenko V, Francis GL, de la Chapelle A, Saji M, Ringel MD. Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 20; 104(8):2803-8.

Vermeulen A, Behlen L, Reynolds A, Wolfson A, Marshall WS, Karpilow J, Khvorova A.

The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. *RNA*. 2005; 11(5):674- 82.

Visone R, Pallante P, Vecchione A, Cirombella R, Ferracin M, Ferraro A, Volinia S, Coluzzi S, Leone V, Borbone E, Liu CG, Petrocca F, Troncione G, Calin GA, Scarpa A, Colato C, Tallini G, Santoro M, Croce CM, Fusco A. Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. *Oncogene*. 2007;26 (54):7590-5. Viswanathan SR e Daley GQ. Lin28: A microRNA regulator with a macro role. *Cell*. 2010; 140(4):445-9.

Viswanathan SR, Powers JT, Einhorn W, Hoshida Y, Ng TL, Toffanin S, O'Sullivan M, Lu J, Phillips LA, Lockhart VL, Shah SP, Tanwar PS, Mermel CH, Beroukhir R, Azam M, Teixeira J, Meyerson M, Hughes TP, Llovet JM, Radich J, Mullighan CG, Golub TR, Sorensen PH, Daley GQ. Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet*. 2009; 41(7):843-8.

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 microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(7):2257-61.

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

WestJA, ViswanathanSR, YabuuchiA, CunniffK, TakeuchiA, ParkIH, Sero JE, Zhu H, Perez- Atayde A, Frazier AL, Surani MA, Daley GQ. A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. *Nature*. 2009; 460(7257):909-13.

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

Zhang X, Zheng Y, Jagadeeswaran G, Ren R, Sunkar R, Jiang H. Identification of conserved and novel microRNAs in *Manduca sexta* and their possible roles in the expression regulation of immunity-related genes. *Insect Biochem Mol Biol*. 2014;47:12-22

Zhao, B. et al. MicroRNA let-7c inhibits migration and invasion of human non-small cell lung cancer by targeting ITGB3 and MAP4K3. *Cancer Lett*. 2013; 24(13):00605-8.

Zhong X, Li N, Liang S, Huang Q, Coukos G, Zhang L. Identification of microRNAs regulating reprogramming factor LIN28 in embryonic stem cells and cancer cells. *J Biol Chem*. 2010; 285(53):41961-71.

Zhou Y, Liang H, Liao Z, et al. miR-203 enhances let-7 biogenesis by targeting LIN28B to suppress tumor growth in lung cancer. *Scientific Reports*. 2017;7:4268