

DANIEL CASARTELLI DE SANTA INEZ

**Efeito da edição gênica e modulação da expressão de
MIR146B no câncer de tireoide**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2021

DANIEL CASARTELLI DE SANTA INEZ

**Efeito da edição gênica e modulação da expressão de
MIR146B no câncer de tireoide**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento

Orientadora: Profa. Dra. Edna Teruko Kimura

Coorientador: Prof. Dr. Cesar Seigi Fuziwara

Versão original

São Paulo
2021

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)

Casartelli de Santa Inez, Daniel
Efeito da edição gênica e modulação da expressão
de MIR146B no câncer de tireoide / Daniel Casartelli
de Santa Inez; orientadora Edna Teruko Kimura;
coorientadora Cesar Seigi Fuziwara. -- São Paulo,
2021.
48 p.

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

1. Câncer anaplásico de tireoide. 2. MicroRNA. 3.
miR-146b. 4. Edição gênica. 5. CRISPR/Cas. I. Teruko
Kimura, Edna , orientador. II. Seigi Fuziwara,
Cesar, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Daniel Casartelli de Santa Inez

Título da Dissertação/Tese: Efeito da edição gênica e modulação da expressão de *MIR146B* no câncer de tireoide

Orientador: Edna Teruko Kimura

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., 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 no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.99.2019

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **108/2016/CEUA**, válido até **13/09/2020**, e por solicitação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Edna Teruko Kimura**, do Departamento de **Biologia Celular e do Desenvolvimento**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Daniel Casartelli de Santa Inez** na equipe do Projeto de Pesquisa: "**Controle da proliferação da célula folicular da tireoide e câncer**", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 31 de maio de 2019.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Controle da proliferação da célula folicular da tireoide e câncer*", registrado sob o protocolo nº **108/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **13/09/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Edna Teruko Kimura**

- Departamento: *Biologia Celular e do Desenvolvimento*

- Membros da Equipe: *Débora Guimaraes Nadale de Souza (Pós-graduando), Caroline Cruz de Oliveira (Pós-graduando), Thiago Maciel dos Santos Oliveira (Iniciação científica), Fabiana Arisa Shingai (Iniciação científica), Cesar Seigi Fuziwara (Pós-doutorando), Kelly Cristina Saito (Especialista de laboratório)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Control of follicular thyroid cell proliferation and cancer*", protocol nº **108/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **9/13/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

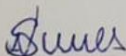
- Principal Investigator: **Dr.(a.) Edna Teruko Kimura**

- Team members: *Débora Guimaraes Nadale de Souza (Graduate Student), Caroline Cruz de Oliveira (Graduate Student), Thiago Maciel dos Santos Oliveira (Undergraduate Student), Fabiana Arisa Shingai (Undergraduate Student), Cesar Seigi Fuziwara (Postdoctoral Researcher), Kelly Cristina Saito (Laboratory Technician)*.

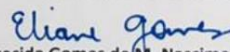
At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Rattus norvegicus</i>	Wistar	Fêmea/female	2 semanas/weeks	120
<i>Mus musculus</i>	Balb/C Nude	Fêmea/female	2 semanas/weeks	<90 ²
	FVB Tg-BRAF3	Macho/Male	2 semanas/weeks	204
	FVB Tg-BRAF3	Fêmea/female	2 semanas/weeks	204
	FVB	Fêmea/female	2 semanas/weeks	204
	FVB	Macho/Male	2 semanas/weeks	204

São Paulo, 13 de setembro de 2016.



Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP



Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Genes codificantes e RNAs regulatórios na oncogênese do câncer humano", protocolada sob o CEUA nº 2023150720, sob a responsabilidade de **Edna Teruko Kimura e equipe; Cesar Seigi Fuziwara; Kelly Cristina Saito; Daniel Casartelli de Santa Inez; Diego Claro de Mello; Viviane Cassia de Jesus dos Santos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 28/09/2020.

We certify that the proposal "Protein-coding genes and regulatory RNAs in human cancer oncogenesis", utilizing 552 Genetically modified mice (GMO) (552 males), 8 Spontaneous mutant mice (8 females), 540 Isogenics mice (540 males), protocol number CEUA 2023150720, under the responsibility of **Edna Teruko Kimura and team; Cesar Seigi Fuziwara; Kelly Cristina Saito; Daniel Casartelli de Santa Inez; Diego Claro de Mello; Viviane Cassia de Jesus dos Santos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 09/28/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **48 meses**

Depto/Setor: **Biologia Celular E do Desenvolvimento**

Origem: **Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento**

Espécie: **Camundongo geneticamente modificado (OGM)** sexo: **Machos** Idade ou peso: **5 a 60 semanas**

Linhagem: **FVB-TgBRAAFV600E** **N amostral:** **552**

Origem: **Biotério Central FMUSP**

Espécie: **Camundongo mutante espontâneo** sexo: **Fêmeas** Idade ou peso: **25 a 40 dias**

Linhagem: **BALB/ c Nude** **N amostral:** **8**

Origem: **Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento**

Espécie: **Camundongos isogênicos** sexo: **Machos** Idade ou peso: **5 a 60 semanas**

Linhagem: **FVB/N** **N amostral:** **540**

São Paulo, 04 de fevereiro de 2021



Prof. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2019/19865-8. Obrigado às agências de fomento, por financiarem a pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À Professora Edna, agradeço por contribuir, de forma diligente, a este trabalho e, principalmente, à minha formação científica. Obrigado pelas oportunidades e pelo conhecimento e enriquecimento, tanto profissional quanto pessoal.

Ao meu Coorientador, Cesar Seigi Fuziwara, que me ensinou tudo que eu precisava para realizar este trabalho e um pouco mais. Obrigado pela confiança e experiência laboratorial.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas, obrigado por mostrarem que sou mais capaz do que acreditava, elevando e mostrando meu potencial.

À Kelly Cristina Saito, por estar sempre presente e disposta a ajudar e ensinar, obrigado pela sabedoria e momentos de descontração.

Aos outros membros e ex-membros do Laboratório, Diego e Viviane, que tive maior convivência, obrigado pelo companheirismo e por aprendermos e errarmos juntos, sempre ajudando uns aos outros.

À minha família e namorada, que sempre estiveram e estão ao meu lado. Um agradecimento especial ao meu pai, que sempre me ajudou com meu trabalho e me motivou, mesmo nos momentos em que não queria conversar sobre o assunto; e minha namorada, Lívia, que me faz sempre querer ser uma pessoa melhor.

Aos meus amigos, tanto do colégio quanto da graduação, obrigado por acompanharem minha jornada e me distraírem das frustrações que às vezes acontecem na vida e na Ciência. Um agradecimento em especial aos amigos do colégio, Jão, Bon Jovi e Piza, por estarem sempre presentes na minha vida, ao Rômulo, sempre disposto a discutir dos temas mais variados (um cientista nato), e aos amigos Nandinho, Jobs, Vini, Caio, Garms, Max e Johnny, que não falham em alegrar. Também aos colegas da Bio, obrigado por tudo que passamos juntos e por dividir nossa paixão por Ciência e RPG. Obrigado especial à Bia Fumelli, por ser pesquisadora, no mesmo programa, e entender e compartilhar os conhecimentos e sofrimento.

“O que fazemos em vida ecoa na eternidade”

Marcus Aurelius

RESUMO

SANTA-INEZ, DC. **Efeito da edição gênica e modulação da expressão de *MIR146B* no câncer de tireoide.** 2021. 48 p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes que regulam a expressão de mRNAs alvo e são comumente desregulados no câncer. No câncer de tireoide, *miR-146b* é o miRNA mais superexpresso, estando associado à oncogênese e agressividade tumoral, levando à características clínicas e patológicas de pior prognóstico. Desta forma, visamos compreender o papel de *miR-146b* em um modelo agressivo de câncer de tireoide usando a metodologia de edição genica CRISPR/Cas9n. A linhagem KTC2 (carcinoma anaplásico humano) que expressa um alto nível de *miR-146b* foi cotransfectada com plasmídeos pSp-Cas9n-miR-146b-guiaA-puromicina e pSp-Cas9n-miR-146b-guiaB-GFP, contendo RNAs guia projetados para flanquear a região do precursor de *miR-146b*, impedindo a formação do pré-miR. Após a transfecção, foram selecionados dois clones, KTC2-C11 e KTC2-C13, e uma linha celular controle, KTC2-CTR, cotransfectada com ambos os plasmídeos sem RNA guia. Após a seleção dos clones e confirmação da edição de *MIR146B* pelo sequenciamento da região alvo, a expressão de *miR-146b* foi analisada por qPCR a partir do RNA total extraído, e seguida de ensaios de contagem celular, viabilidade, migração, formação de colônias e xenotransplante em camundongos imunossuprimidos. As linhagens KTC2 C11 e C13 apresentaram diminuição na expressão de *miR-146b* em relação ao controle, apresentando também redução na proliferação, viabilidade celular, migração e formação de colônias. E ainda, no experimento de xenotransplante, não houve crescimento tumoral das células KTC2-C11, injetadas no flanco de camundongos nude. Dessa forma, a modulação da expressão de *miR-146b* por edição genica utilizando CRISPR/Cas9n mostrou-se eficiente e constitui uma ferramenta molecular para o entendimento do papel dos miRNAs no câncer de tireoide.

Palavras-chave: Câncer anaplásico de tireoide. MicroRNA. miR-146b. Edição gênica. CRISPR/Cas

ABSTRACT

SANTA-INEZ, DC. **Effect of gene editing and expression modulation of *MIR146B* in thyroid cancer**. 2021. 48 p. Dissertation (Master thesis in System Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate the expression of target mRNAs and are commonly deregulated in cancer. In thyroid cancer, *miR-146b* is the most overexpressed miRNA, associated with oncogenesis and tumor aggressiveness, leading to clinical and pathological characteristics of worse prognosis. Therefore, we aim to understand the role of *miR-146b* in an aggressive model of thyroid cancer using the CRISPR/Cas9n gene editing methodology. The KTC2 strain (human anaplastic carcinoma) expressing a high level of *miR-146b* was cotransfected with plasmids pSp-Cas9n-miR-146b-guideA-puromycin and pSp-Cas9n-miR-146b-guideB-GFP, containing guide RNAs designed to flank the precursor region of *miR-146b*, preventing pre-miR formation. Following the transfection, two clones were selected, KTC2-C11 and KTC2-C13, and also a control cell line, KTC2-CTR, cotransfected with both plasmids with no guide RNA. After selection of clones and *MIR146B* editing confirmed by sequencing, *miR-146b* expression was analyzed by real-time PCR from the total RNA extracted, and cell counting, viability, migration, colony and xenotransplantation assays were performed. The KTC2 C11 and C13 strains showed a decrease in the expression of *miR-146b* in relation to the control, also showing reduced proliferation, cell viability, migration, and colony formation. Furthermore, in the xenograph experiment, no tumor growth was observed of the KTC2-C11 cells, injected into the flank of nude mice. Thus, a modulation of miR-146b expression by gene editing using CRISPR / Cas9n proved to be efficient as a molecular tool for understanding the role of miRNAs in thyroid cancer.

Keywords: Anaplastic thyroid cancer. MicroRNA. miR-146b. Gene editing. CRISPR/Cas

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Desregulação de miRNAs no câncer	18
Figura 2 Edição gênica por CRISPR/Cas9 e reparo da dupla fita de DNA	21
Figura 3 Edição gênica por CRISPR/Cas9n	22
Tabela 1 Nomenclatura e classificação de linhagens celulares de tireoide humana com suas respectivas mutação e meios de cultura utilizados para seus cultivos	24
Figura 4 Região alvo do gene <i>MIR146B</i> e precursores de <i>miR-146</i>	26
Tabela 2 Sequências dos oligonucleotídeos clonados nos plasmídeos PX461 e PX462	27
Tabela 3 Sequências dos primers utilizados no sequenciamento da região alvo da edição gênica	28
Tabela 4 Sequências dos primers utilizados para amplificação e quantificação da expressão dos genes codificantes alvo de <i>miR-146b-5p</i>	30
Figura 5 Níveis de expressão de <i>miR-146b-5p</i> e <i>miR-146b-3p</i> em linhagens celulares de câncer de tireoide	32
Figura 6 Níveis de expressão de <i>miR-146b-5p</i> e <i>miR-146b-3p</i> em células KTC2 com edição gênica	33
Figura 7 Sequenciamento da região genômica de <i>MIR146B</i> após edição gênica	35
Figura 8 Ensaio de proliferação e viabilidade celular	35
Figura 9 Ensaio de migração celular	36
Figura 10 Ensaio de formação de colônia	36
Figura 11 Expressão gênica de NIS e TG nas linhagens KTC2 editadas	37
Figura 12 Expressão gênica de ZEB1 e HMGA2 nas linhagens KTC2 editadas	37
Figura 13 Ensaio de xenotransplante em camundongo nude acompanhado por 12 semanas	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Câncer de tireoide	14
1.2	MicroRNAs: função e biogênese	17
1.3	MicroRNAs no câncer	18
1.4	Edição gênica	20
2	OBJETIVO	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	Cultura de células	24
3.2	Avaliação do perfil de expressão de <i>miR-146b</i>	24
3.3	Edição gênica de <i>MIR146B</i> utilizando CRISPR/Cas9n	25
3.4	Validação da edição gênica	27
3.4.1	Análise da expressão de <i>miR-146b</i>	27
3.4.2	Sequenciamento da região alvo do gene <i>MIR146B</i>	28
3.5	Ensaio funcional do efeito da redução de <i>miR-146b-5p</i>	28
3.5.1	Proliferação celular	28
3.5.2	Viabilidade celular	29
3.5.3	Migração celular	29
3.5.4	Formação de colônia	30
3.5.5	Análise expressão de genes codificantes	30
3.5.6	Xenotransplante em camundongos nude	31
3.6	Análise estatística	31
4	RESULTADOS	32
4.1	Avaliação do perfil de expressão de <i>miR-146b</i> em linhagens celulares de câncer de tireoide	32
4.2	Análise da expressão de <i>miR-146b</i> na linhagem KTC2 com edição gênica	33
4.3	Sequenciamento da região alvo do gene <i>MIR146B</i>	34
4.4	Ensaio funcional do efeito da redução de <i>miR-146b-5p</i>	35
4.4.1	Ensaio <i>in vitro</i>	35
4.4.2	Ensaio <i>in vivo</i> de xenotransplante para avaliação do crescimento das células KTC2 editadas	37
5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide vem apresentando aumento em sua incidência ao longo das últimas décadas (SIEGEL; MILLER; FUCHS; JEMAL, 2021). A maioria dos casos de câncer de tireoide origina-se da célula folicular que compõe o folículo tireoidiano, sendo o carcinoma papilífero o mais comum. As alterações genéticas causadoras do câncer de tireoide se alinham predominantemente na via de sinalização MAPK/ERK (*Mitogen-activated protein kinase*), como BRAF e RAS, e o rearranjo RET/PTC (FAGIN; WELLS, 2016; KIMURA; NIKIFOROVA; ZHU; KNAUF *et al.*, 2003). Nos últimos anos, observou-se que a alteração da expressão de microRNAs (miRNAs), uma classe de reguladores pós-transcricionais da expressão gênica, contribui ativamente na oncogênese tireoidiana (FUZIWARA; KIMURA, 2017; HE; JAZDZEWSKI; LI; LIYANARACHCHI *et al.*, 2005). De fato, a desregulação de miRNAs é um importante mecanismo do câncer de tireoide e tem se observado a sua participação na progressão e agressividade tumoral (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, 2014; FUZIWARA; KIMURA, 2014).

1.1 Câncer de tireoide

O câncer é a segunda maior causa de morte no mundo, ficando atrás apenas de doenças cardíacas (COLLABORATORS, 2018). Dentre os tipos de câncer, o câncer de tireoide é a malignidade do sistema endócrino mais comum, ficando entre as 10 neoplasias malignas mais comuns em mulheres. No cenário global, no ano de 2020, a estimativa de casos de câncer de tireoide chega a 586.202, com um total de 43.646 fatalidades, sendo um a cada 20 diagnósticos de câncer ocorrente em mulheres (SUNG; FERLAY; SIEGEL; LAVERSANNE *et al.*, 2021). Já no Brasil, segundo o INCA, a estimativa de casos de câncer de tireoide para o ano de 2021 é de 13.780 novos casos, representando 5,4% dos cânceres em mulheres, ocupando a 5^a posição de carcinoma mais frequente no sexo feminino (INCA, 2019). Nos Estados Unidos, a estimativa de incidência para o ano de 2021 é de 44.280 casos, com 2.200 fatalidades esperadas; comparado aos anos anteriores, houve uma redução no número de casos, porém acompanhada de uma estabilidade e até aumento na quantidade de óbitos (SIEGEL; MILLER; FUCHS; JEMAL, 2021; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019; 2020).

A glândula tiroide apresenta estrutura histológica epitelial endócrina folicular, sendo a sua unidade funcional os folículos. Estes são compostos por células foliculares diferenciadas, responsáveis pela produção dos hormônios tiroidianos triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) (AIRES, 2018; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A maior parte dos casos de câncer de tiroide origina-se da célula folicular, sendo o carcinoma folicular classificado de acordo com seu grau de diferenciação, ou seja, quanto o tecido apresenta de características estruturais e funcionais semelhantes à uma tiroide normal. O câncer de tiroide diferenciado, derivado da célula folicular, compreende majoritariamente dois histotipos, o carcinoma papilífero e o carcinoma folicular; já o indiferenciado é classificado como anaplásico. Os carcinomas diferenciados compõem a maior parte dos casos de diagnóstico de tumores malignos tiroidianos e têm um prognóstico favorável. Por outro lado, o carcinoma indiferenciado representa menos de 5% dos casos, e é o câncer tiroidiano mais agressivo sendo extremamente letal (FAGIN; WELLS, 2016; XING, 2013).

O tratamento primário do câncer de tiroide é a excisão cirúrgica do tumor, por tireoidectomia total ou subtotal, associada à radioiodoterapia (I_{131}). Utilizando-se este método, o carcinoma diferenciado possui uma alta taxa de remissão, com um prognóstico favorável em mais de 90% dos casos (HAUGEN; ALEXANDER; BIBLE; DOHERTY *et al.*, 2016). Por outro lado, o carcinoma anaplásico é caracterizado por tumores de comportamento agressivo, de rápido crescimento local e com metástases à distância. Apesar de ser pouco incidente (1-2 casos para 1.000.000 de habitantes), o carcinoma anaplásico é responsável por mais da metade das mortes anuais atribuídas ao câncer de tiroide nos EUA. Diferentemente dos carcinomas diferenciados, o tratamento cirúrgico do carcinoma anaplásico ainda é controverso, sendo a radioterapia ineficaz, devido à ausência de captação de iodo por estes tumores (BIBLE; KEBEBEW; BRIERLEY; BRITO *et al.*, 2021). Apesar da combinação dos tratamentos quimioterápicos mostrar resultados mais promissores, o curso letal da doença não é interrompido. A ausência de uma terapia eficaz no tratamento do carcinoma anaplásico, associada ao pouco conhecimento dos mecanismos de transformação da célula folicular tiroidiana normal em anaplásica, contribuem para a baixa sobrevida do paciente após o diagnóstico (média de 6 meses) tornando assim, necessário, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas

(CABANILLAS; MCFADDEN; DURANTE, 2016; VALERIO; PIERUZZI; GIANI; AGATE *et al.*, 2017).

A oncogênese do câncer de tireoide está associada a alterações genéticas predominantemente na via de sinalização MAPK/ERK (“*Mitogen-activated protein kinase*”), como BRAF e RAS, e o rearranjo RET/PTC. Mais de 70% dos casos de carcinoma papilífero apresentam alteração na via MAPK, sendo a mais frequente, no gene BRAF, a mutação BRAF^{T1799A} (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, 2014; KIMURA; NIKIFOROVA; ZHU; KNAUF *et al.*, 2003; XING, 2013). Esta mutação codifica a proteína BRAF^{V600E}, detectada em cerca de 50% dos casos de carcinoma papilífero de tireoide e em aproximadamente 20% dos casos de carcinoma anaplásico, estando associada a um pior prognóstico e a características clinicopatológicas de recorrência e maior mortalidade. Além disso, ativação de BRAF^{V600E} induz à perda da diferenciação celular, conseqüentemente também levando à perda da expressão de NIS, proteína responsável pela captação de iodo na célula, dificultando o tratamento (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, 2014; CARTER; TOURTELOT; SAVELL; LILIENFELD, 2011; HANNALLAH; ROSE; GUERRERO, 2013; MITSUTAKE; KNAUF; MITSUTAKE; MESA *et al.*, 2005; XING; ALZHRANI; CARSON; SHONG *et al.*, 2015; XING; ALZHRANI; CARSON; VIOLA *et al.*, 2013; ZHANG; LIU; MURUGAN; LIU *et al.*, 2014).

Além destas alterações genéticas, a modulação da expressão de RNAs não codificantes, em especial os microRNAs (miRNAs), é muito relevante para a progressão tumoral e aumento da agressividade, possuindo a capacidade de ativar oncogenes e inativar genes supressores de tumor (CALIN; CROCE, 2006; LU; GETZ; MISKA; ALVAREZ-SAAVEDRA *et al.*, 2005). Assim, a desregulação de miRNAs contribui ativamente para a oncogênese tireoidiana, sendo muito importante o entendimento do mecanismo biológico destes reguladores da expressão gênica (HE; JAZDZEWSKI; LI; LIYANARACHCHI *et al.*, 2005; PALLANTE; BATTISTA; PIERANTONI; FUSCO, 2014).

1.2 MicroRNAs: função e biogênese

Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes que possuem função de regulação da expressão gênica, realizando este controle por mecanismos pós-transcricionais. Esta regulação é exercida pelo pareamento imperfeito do miRNA, contido em um complexo multiprotéico nomeado RISC (*RNA-induced silencing complex*), com a região 3'UTR (não traduzível) do mRNA alvo, bloqueando a tradução ou induzindo seu decaimento e degradação (BUSHATI; COHEN, 2007; MOHR; MOTT, 2015).

Os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II, como longos transcritos de miRNA primários (pri-miRNA). Este pri-miRNA é processado, ainda no núcleo, pelo complexo multiprotéico microprocessador, sendo seu componente principal uma RNase III nomeada Droscha. Este processo gera o miRNA precursor (pre-miRNA), que apresenta estrutura semelhante a um grampo (*hairpin*), sendo composto por cerca de 80 nucleotídeos. O pre-miRNA é transportado para fora do núcleo pela proteína exportina-5, chegando ao citoplasma, onde é outra vez clivado pela RNase III, conhecida como Dicer, gerando o miRNA maduro. Este miRNA maduro é então associado ao complexo multiprotéico RISC, exercendo sua função de regulação pós-transcricional da expressão gênica (HA; KIM, 2014; WINTER; JUNG; KELLER; GREGORY *et al.*, 2009).

Associado a esta regulação está o mecanismo molecular de interação do miRNA com o mRNA alvo, no qual ocorre o pareamento da região ou sequência “*seed*” (nucleotídeos 2 a 7 da porção 5') do miRNA com a região 3'-UTR do mRNA alvo, seguido por uma complementaridade imperfeita das outras bases (GRIMSON; FARH; JOHNSTON; GARRETT-ENGELE *et al.*, 2007). Por conta deste pareamento imperfeito e do reduzido tamanho da região *seed* específica de pareamento, cada miRNA pode interagir e regular centenas de mRNAs diferentes, assim como um mRNA pode ser regulado por distintos miRNAs (AGARWAL; BELL; NAM; BARTEL, 2015). Assim, forma-se uma complexa rede regulatória, à medida que um único miRNA pode ter como alvo inúmeros mRNAs, e um único mRNA pode ser alvo de diversos miRNAs diferentes, tornando o estudo e entendimento dos miRNAs desafiador, e sendo comumente necessário o auxílio de ferramentas de bioinformática (BARTEL, 2009).

1.3 MicroRNAs no câncer

Os miRNAs exercem função essencial na regulação da expressão de genes envolvidos em diferentes processos celulares, como proliferação, diferenciação, metabolismo, sendo seu controle na célula fundamental para a homeostase. A desregulação de miRNAs é comum em diversos tipos de câncer, e constitui uma assinatura tumoral maligna, estando associada à potencialização dos efeitos de oncogenes, de progressão tumoral e de pior prognóstico (PENG; CROCE, 2016; RUPAIMOOLE; SLACK, 2017).

Há uma clara contribuição tanto do aumento quanto da perda da expressão de miRNAs para o processo oncogênico, já que o aumento de sua expressão pode resultar no silenciamento de genes supressores de tumor, assim como a perda de expressão pode resultar no aumento de oncogenes, como demonstrado na Figura 1 (LEE; DUTTA, 2009; RUPAIMOOLE; CALIN; LOPEZ-BERESTEIN; SOOD, 2016).

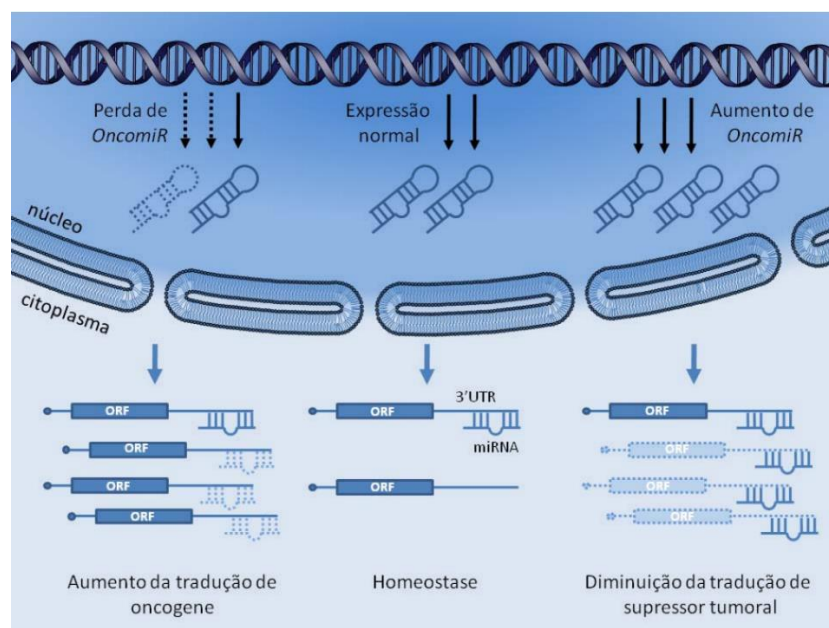


Figura 1 – Desregulação de miRNAs no câncer. Efeito da desregulação de miRNAs no câncer, ilustrando como o aumento e perda de expressão de miRNAs podem levar a uma maior progressão tumoral. Fonte: (FUZIWARA; KIMURA, 2014).

Após a descoberta da existência e importância da desregulação de diferentes miRNAs no câncer, diversos estudos demonstraram que esta desregulação também se encontra presente no câncer de tireoide, inclusive no câncer de tireoide anaplásico

(FUZIWARA; KIMURA, 2014; PALLANTE; BATTISTA; PIERANTONI; FUSCO, 2014; PALLANTE; VISIONE; FERRACIN; FERRARO *et al.*, 2006; SWIERNIAK; WOJCICKA; CZETWERTYNSKA; STACHLEWSKA *et al.*, 2013; VISIONE; PALLANTE; VECCHIONE; CIROMBELLA *et al.*, 2007). Dentre os miRNAs desregulados destaca-se *miR-146b-5p*, um dos mais expressos no câncer de tireoide (HE; JAZDZEWSKI; LI; LIYANARACHCHI *et al.*, 2005; NIKIFOROVA; TSENG; STEWARD; DIORIO *et al.*, 2008). O gene de *miR-146b*, *MIR146B*, está localizado no braço longo do cromossomo 10 humano (10q24.32) e transcreve dois miRNAs maduros, *miR-146b-5p* e *miR-146b-3p*, sendo a fita 5p mais abundante. Este miRNA, no câncer de tireoide papilífero, está diretamente ligado a um pior prognóstico, existindo uma correlação positiva entre altos níveis de *miR-146b-5p* e aumentada agressividade, recorrência, progressão, resistência, assim como uma maior taxa de migração, invasão, metástase e menor sobrevida do paciente, com reduzida resposta ao tratamento (CHOU; CHI; HUANG; CHOU *et al.*, 2016; CHOU; YANG; CHOU; HUANG *et al.*, 2013; CONG; HE; CHEN; LIU *et al.*, 2015; DENG; WU; XIAO; KANG *et al.*, 2015; GOMEZ-PEREZ; CORNEJO PAREJA; GARCIA ALEMAN; COIN ARAGUEZ *et al.*, 2019; LIMA; GERALDO; FUZIWARA; KIMURA *et al.*, 2016; PENG; LI; LUO; DING *et al.*, 2014; SUN; FANG; LI; LI *et al.*, 2015; WANG; ZHANG; HE; DONG *et al.*, 2013; YANG; YUAN; FAN; DENG *et al.*, 2013; YIP; KELLY; SHUAI; ARMSTRONG *et al.*, 2011; ZHANG; LIU; LIU; WANG *et al.*, 2013).

Uma das causas da desregulação de *miR-146b-5p* é desencadeada pela ativação do oncogene BRAF^{V600E}, assim como por outras mutações, induzindo um aumento na expressão deste miRNA (CAHILL; SMYTH; DENNING; FLAVIN *et al.*, 2007; CHOU; CHEN; CHOU; CHANG *et al.*, 2010; GERALDO; YAMASHITA; KIMURA, 2012; PANEBIANCO; MAZZANTI; TOMEI; ARETINI *et al.*, 2015).

Utilizando a ferramenta TargetScan versão 7.2 (acesso em: 24/10/2021), é possível identificar 299 alvos potenciais de *miR-146b-5p*, mostrando a alta complexidade de interação entre miRNA e mRNA alvo (AGARWAL; BELL; NAM; BARTEL, 2015). Um dos alvos de *miR-146b-5p* é o mRNA de SMAD4, componente da via de sinalização antiproliferativa de TGF- β , sendo evidenciado que altos níveis de *miR-146b* no carcinoma papilífero reduzem a proteína SMAD4, bloqueando a transdução do sinal antimitogênico. Assim, o tratamento com inibidor de *miR-146b*,

antimiR, resulta no aumento de SMAD4, restaurando o efeito antimitogênico de TGF- β (GERALDO; YAMASHITA; KIMURA, 2012). Outro alvo importante de *miR-146b* é a proteína NIS, responsável pela incorporação de iodo na célula folicular (RIESCO-EIZAGUIRRE; WERT-LAMAS; PERALES-PATON; SASTRE-PERONA *et al.*, 2015). A ativação da mutação BRAF^{V600E} inibe a expressão proteica de NIS (MITSUTAKE; KNAUF; MITSUTAKE; MESA *et al.*, 2005) e, como já descrito, induz *miR-146b*. Esta diminuição da proteína transportadora NIS, causada pela mutação de BRAF, e potencializada pelo aumento da expressão de *miR-146b*, resulta em um pior prognóstico e maior refratariedade à radioiodoterapia, uma vez que NIS é essencial para a captação do iodo radioativo (I_{131}), tornando o tratamento ineficaz quando ausente (RIESCO-EIZAGUIRRE; GUTIERREZ-MARTINEZ; GARCIA-CABEZAS; NISTAL *et al.*, 2006). Também foi demonstrado que, a inibição da expressão de *miR-146b* aumenta a sensibilidade ao radioiodo, por meio da restauração da expressão de NIS (LI; LV; CHEN; GUAN *et al.*, 2015).

A complexa regulação exercida pelos miRNAs e sua associação com o processo tumorigênico demonstram a importância de se estudar a função destes RNAs não-codificantes no câncer. Dentre estes miRNAs, estudar o papel de *miR-146b*, modulando sua expressão, contribuirá no melhorar o entendimento da biologia do câncer de tireoide. Um dos possíveis métodos para se atingir esta modulação é por meio da edição gênica do gene *MIR146B*.

1.4 Edição gênica

A ferramenta molecular CRISPR/Cas9 realiza a edição gênica por meio de um sgRNA (single guide RNA) ou RNA guia, constituído por 20 nucleotídeos e uma sequência PAM, sendo esta sequência sempre composta por três nucleotídeos (NGG) para a Cas9. O RNA guia funciona como um localizador, levando a enzima Cas9 até o local desejado, que é o alvo da edição gênica, no DNA. Após o reconhecimento da região alvo pelo RNA guia, a enzima Cas9 realiza um corte na fita dupla (*Double-stranded break*), partindo a dupla fita de DNA (JIANG; DOUDNA, 2017). Esta ruptura, representada na Figura 2, cria a necessidade de reparo do DNA, que normalmente é efetuado pelo método de união de extremidade não-homóloga (do inglês: “*Non-Homologous End Joining*” [NHEJ]), o que acaba deixando “*indels*”,

que são inserções e/ou deleções no DNA, que, por sua vez, acaba perdendo sua sequência original. Estas modificações e mutações causadas pela edição levam à perda de função de genes codificantes alvo, fazendo com que esta ferramenta venha sendo utilizada de maneira expressiva para (porém não exclusivamente) o silenciamento de genes (JIANG; DOUDNA, 2017; JINEK; CHYLINSKI; FONFARA; HAUER *et al.*, 2012; YEH; RICHARDSON; CORN, 2019).

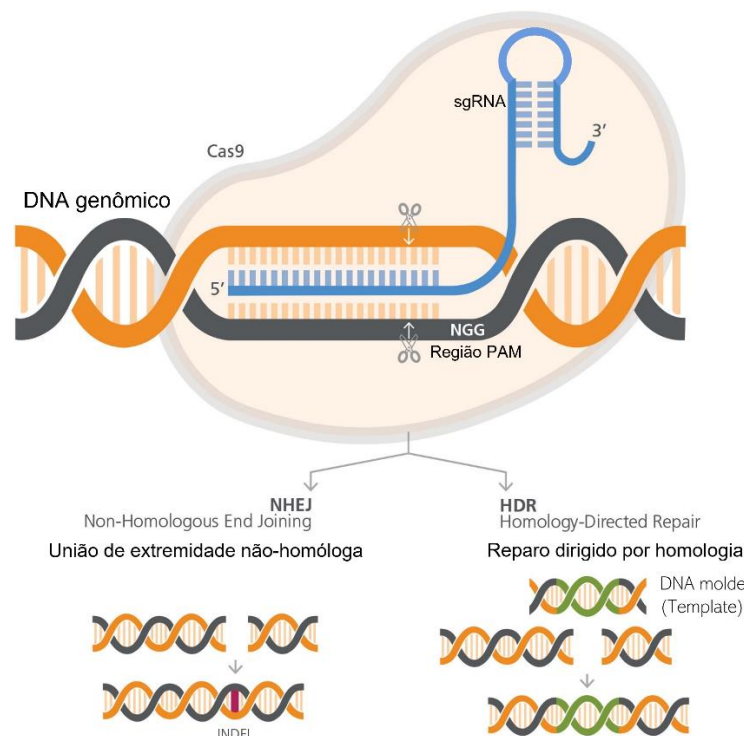


Figura 2 – Edição gênica por CRISPR/Cas9 e reparo da dupla fita de DNA. Mecanismo de edição realizado pela enzima Cas9, guiada pelo sgRNA, com sequência complementar a região alvo, realizando um corte na fita dupla, levando a necessidade de reparo. Existem dois mecanismos de reparo, NHEJ, que leva a presença de indels (inserções e deleções) na região clivada; e HDR, no qual é necessário a presença de uma sequência de DNA molde, que irá ser inserida na região clivada. Fonte: (STEMCELL, 2018).

Porém, esta técnica ainda apresenta uma desvantagem, constituída pela ocorrência de edição gênica em locais não-alvo, ou indesejados para edição, chamados “*off-targets*”. Os *off-targets* podem gerar alterações não desejadas, em decorrência da interação do RNA guia com regiões semelhantes à região alvo. Para superar esta desvantagem, foram desenvolvidas outras enzimas Cas. Em específico, uma das derivações da Cas9, conhecida como Cas9n, consegue solucionar este problema. Diferente de sua versão selvagem, a enzima Cas9n possui a mutação D10A

na endonuclease RuvC, que realiza a quebra do DNA, inativando-a, tornando a enzima Cas9 em uma nickase (Cas9n). Desta forma, garante-se que apenas uma das fitas do DNA será rompida, promovendo, portanto, uma quebra na fita simples. É importante mencionar que quebras na fita simples são passíveis de reparação que não causam alterações na sequência de DNA. Conseqüentemente, para realizar edição gênica, são necessários dois RNAs guia, um para cada fita, flanqueando a região alvo. Estes dois RNAs guia promoverão, cada um, um corte em cada uma das fitas simples opostas (Figura 3). Esta modificação da enzima Cas9 em Cas9n torna a ferramenta e o processo de edição mais seguros, já que são necessários dois *off-targets* situados a uma distância pequena para que ocorra uma quebra que gere uma alteração indesejada na sequência original (CHIANG; LE SAGE; LARRIEU; DEMIR *et al.*, 2016; RAN; HSU; LIN; GOOTENBERG *et al.*, 2013).

A estratégia para produção dos RNAs guia com resultados mais efetivos é denominada “PAM-out”, na qual a sequência PAM se localiza orientada para a região 3’ da sequência alvo (Figura 3), por ser mais eficiente para a geração de *indels* (CHIANG; LE SAGE; LARRIEU; DEMIR *et al.*, 2016; RAN; HSU; LIN; GOOTENBERG *et al.*, 2013).

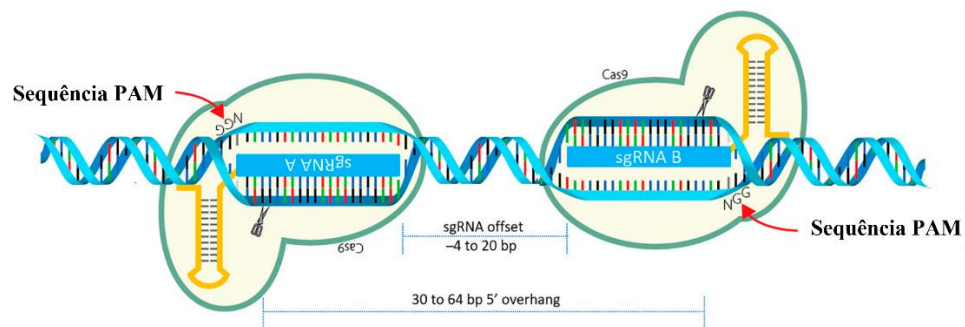


Figura 3 – Edição gênica por CRISPR/Cas9n. Mecanismo de edição realizado pela enzima Cas9n, guiada por 2 sgRNAs, com sequência complementar a região alvo, realizando dois cortes na fita simples flanqueando a região alvo, sendo utilizada a estratégia denominada “PAM-out”, para realizar a edição do segmento alvo. Fonte: (SANTA-INEZ; FUZIWARA; SAITO; KIMURA, 2021).

Considerando todos os conceitos explorados acima, a modulação de *miR-146b-5p* na célula tumoral, utilizando a ferramenta CRISPR/Cas9n para realizar edição gênica de *MIR146B*, reduzindo sua expressão, apresenta-se como uma nova perspectiva de avanço no entendimento molecular do câncer agressivo de tireoide.

2 OBJETIVO

Observar o efeito da edição gênica de *MIR146B*, utilizando o sistema CRISPR/Cas9n, na biologia do câncer de tireoide anaplásico.

Objetivos específicos:

- Análise da expressão de *miR-146b* em linhagens de câncer de tireoide anaplásico
- Construção de RNAs guia e plasmídeos com CRISPR/Cas9n
- Validação de clones com edição e modulação de *MIR146B*
- Avaliar o efeito biológico da redução de *miR-146b-5p* na biologia do carcinoma anaplásico

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

Para medir a expressão de *miR-146b-5p*, foram selecionadas células de diferentes linhagens de carcinoma tiroídiano humano, com diferentes mutações. As linhagens e suas respectivas mutações e meios de cultura utilizados estão apresentadas na Tabela 1. As células foram cultivadas em seus respectivos meios e incubadas a 37°C e 5% CO₂.

Tabela 1 – Nomenclatura e classificação de linhagens celulares de tireoide humana com suas respectivas mutação e meios de cultura utilizados para seus cultivos

Linhagem	Histologia	Mutação	Meio de Cultura
Nthy-ori 3-1	Não maligno	Não possui	RPMI1640 + 10% SFB + 2 mM Glutamina
BCPAP	PTC	BRAF ^{V600E}	DMEM + 10% SFB
KTC2	ATC	BRAF ^{V600E}	RPMI1640 + 5% SFB
SW1736	ATC	BRAF ^{V600E}	RPMI1640 + 10% SFB + 2 mM Glutamina
8305C	ATC	BRAF ^{V600E}	RPMI1640 + 10% SFB
C643	ATC	HRAS ^{G13R}	RPMI1640 + 10% SFB
Hth7	ATC	NRAS ^{Q61R}	DMEM + 10% SFB + 2 mM Glutamina
Hth83	ATC	HRAS ^{Q61R}	RPMI1640 + 10% SFB
Hth74	ATC	NF1 ^{L732F}	RPMI1640 + 10% SFB + 2 mM Glutamina

3.2 Avaliação do perfil de expressão de *miR-146b*

Para avaliar a quantidade de *miR-146b* nas linhagens e medir seu nível de expressão, foi realizada a extração do RNA total das células, utilizando-se o método fenol-clorofórmio com o reagente TRIzol (Invitrogen-Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA). Neste método, as células foram cultivadas em placas de 6cm até a semi confluência, sendo então lavadas com PBS e 1mL de TRIzol foi adicionado. A placa foi então esfregada com um scraper e o meio coletado em um microtubo e congelado a -80°C, para futuramente ser realizada a extração do RNA. Para se extrair o RNA, o microtubo foi descongelado à temperatura ambiente, em uma capela de exaustão, e seu conteúdo homogeneizado. Após 5 minutos, o RNA foi levado à bancada, e adicionou-se 200µL de clorofórmio para cada 1mL de TRIzol utilizado (como utilizamos 1mL, apenas 200µL foi utilizado), sendo o conteúdo homogeneizado por inversão por 15 segundos e incubado por 3 minutos à temperatura ambiente. A solução foi então centrifugada a

12.000xg por 15 minutos a 4°C. Com a centrifugação, o líquido separa-se em 3 fases: RNA, fase superior; DNA, fase intermediária; proteína e lipídio, fase inferior. A fase superior (RNA) foi coletada e transferida para um novo microtubo, onde foi adicionado 500µL de isopropanol e homogeneizado por inversão por 15 segundos. A solução foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e foi então centrifugada a 12.000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 1mL de etanol 75% foi adicionado sobre o pellet formado, sendo centrifugado a 7.500xg por 5 minutos a 4°C. O excesso de líquido foi removido e o pellet foi deixado para secar, sendo então ressuspenso em 50µL de água DEPCi e deixado para eluir no gelo por 10 minutos. O RNA total teve seu grau de pureza estimado por espectrofotometria, usando a razão entre as absorvâncias medidas a 260nm e 280nm, no equipamento Biomate (Thermo-Fisher).

Para se medir a expressão de miRNAs, apenas 10ng de RNA total foram utilizados para se realizar uma RT-PCR, utilizando um kit de transcrição reversa TaqMan® (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), contendo primers stem-loop. Após a transcrição reversa uma qPCR foi realizada usando sondas TaqMan de miRNA para *miR-146b-5p* (sonda 1097) e *RNU6B* (sonda 1093) como normalizador (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Para a reação foi utilizado o Master Mix TaqMan, realizada em um aparelho ViiA7® (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A expressão do miRNA foi normalizada com *RNU6B* e calculada usando o programa QGene (SIMON, 2003).

3.3 Edição gênica de *MIR146B* utilizando CRISPR/Cas9n

Para realização da edição gênica, foi utilizada a ferramenta CRISPR/Cas9n, que como já mencionado necessita de dois RNAs guia. Os dois guias utilizados foram desenvolvidos em ferramentas online denominadas ChopChop e CRISPR.mit.edu (HSU; SCOTT; WEINSTEIN; RAN *et al.*, 2013; LABUN; MONTAGUE; KRAUSE; TORRES CLEUREN *et al.*, 2019), tendo sido nomeados Guia A e Guia B (Figura 4). Os guias foram clonados respectivamente nos plasmídeos: pSpCAS9n-puro (PX462), com resistência a puromicina; e pSpCAS9n-GFP (PX461), que expressa GFP. O local de interação e clivagem do Guia A localiza-se na região 3' da sequência do *miR-146b-5p*, e o corte realizado pelo Guia B logo após a sequência do *miR-146b-3p*, desta forma

editando a sequência do precursor do miRNA, resultando na possível alteração de sua estrutura, afetando seu processo de maturação.

A estratégia “PAM-out” foi utilizada para a produção dos RNAs guia, na qual, como explicado anteriormente, a sequência PAM se localiza orientada para a região 3’ da sequência alvo, por produzir resultados mais eficientes (CHIANG; LE SAGE; LARRIEU; DEMIR *et al.*, 2016; RAN; HSU; LIN; GOOTENBERG *et al.*, 2013).

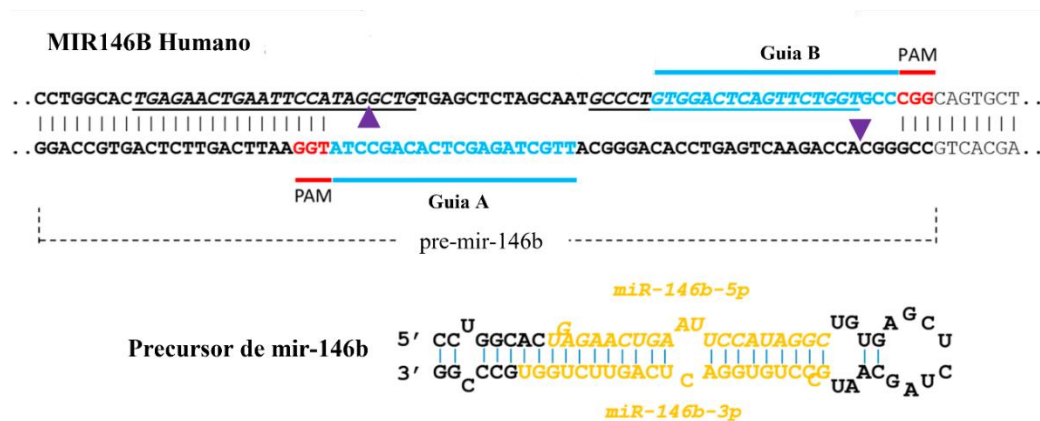


Figura 4 – Região alvo do gene MIR146B e precursores de miR-146. Segmento do gene *MIR146B* humano, destacando em sublinhado as fitas maduras de *miR-146b-5p* e *miR-146b-3p*. As sequências de RNA guia (A e B) destacadas em azul e a porção PAM em vermelho. Os pontos de quebra da fita simples de DNA, realizada pela Cas9n, estão evidenciados pelos triângulos roxos. Fonte: (SANTA-INEZ; FUZIWARA; SAITO; KIMURA, 2021).

Ambos os guias desenvolvidos (Guias A e B) possuem *off-targets* previstos segundo a ferramenta ChopChop, porém, como já discutido anteriormente, uma quebra na fita dupla só ocorre quando o alvo dos guias está próximo o suficiente um do outro, o que não foi observado. Desta forma, utilizando-se os guias A e B com a Cas9n, não é possível a ocorrência de edições indesejadas.

Para produção dos plasmídeos utilizados, foram ligados oligonucleotídeos (Tabela 2) com as sequências guias (A e B) no sítio BbsI dos plasmídeos linearizados após digestão enzimática. Após confirmação da inserção correta dos RNAs guia nos plasmídeos pelo sequenciamento, usando o método de Sanger, ambos os plasmídeos foram cotransfectados em células KTC2, usando-se o reagente Lipofectamina 2000 (Invitrogen). As células foram então selecionadas em um citômetro, 72h após a transfecção, para a presença de GFP, e tratadas por 7 dias com 1µg/ml de puomicina. As células foram então plaqueadas a uma densidade de 50 células em uma placa de 10cm e colônias formadas de células únicas foram isoladas, criando os clones KTC2-

CRISPR-miR146b. Os clones sobreviventes e selecionados foram denominados KTC2-C11 e KTC2-C13, tendo sido estes clones expandidos para os testes e ensaios subsequentes. O grupo controle foi criado pela cotransfecção dos plasmídeos pSpCas9n-GFP e pSpCas9n-puro, sem os guias. Desta forma, pelo fato de não possuírem a sequência de RNA guia clonada, não há edição gênica. Este grupo foi denominado KTC2-CTR.

Todos os plasmídeos utilizados foram adquiridos da Addgene: pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) foi desenvolvido por Feng Zhang (Addgene plasmid # 48141; <http://n2t.net/addgene:48141> (acesso em 20 de maio de 2021); RRID:Addgene_48141); pSpCas9n(BB)-2A-GFP (PX461) foi desenvolvido por Feng Zhang (Addgene plasmid # 48140; <http://n2t.net/addgene:48140> (acesso em 20 de maio de 2021); RRID:Addgene_48140) (RAN; HSU; WRIGHT; AGARWALA *et al.*, 2013).

Tabela 2 – Sequências dos oligonucleotídeos clonados nos plasmídeos PX461 e PX462

	Sequência 5'-3'
Guia A Fw	CACCGTTGCTAGAGCTCACAGCCTATGG
Guia A Rv	AAACCCATAGGCTGTGAGCTCTAGCAAC
Guia B Fw	CACCGGTGGACTCAGTTCTGGTGCCCGG
Guia B Rv	AAACCCGGGCACCAAGAACTGAGTCCACC

3.4 Validação da edição gênica

3.4.1 Análise da expressão de *miR-146b*

Para avaliar a quantidade de *miR-146b* nas células e medir seu nível de expressão, bem como para aferir se a edição gênica ocorreu e, ainda, se as células estavam de fato expressando menos o miRNA, foi realizada a extração e quantificação do RNA pelo mesmo processo já descrito anteriormente, no qual o RNA total foi extraído utilizando-se o método fenol-clorofórmio. Para se medir a expressão de *miR-146b*, foi realizada uma RT-PCR e, após a transcrição reversa, uma qPCR foi realizada usando sondas *miR-146b-5p* (sonda 1097) e, como

normalizador, *U6* (sonda 1973) (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.4.2 Sequenciamento da região alvo do gene *MIR146B*

Para validar a edição gênica e avaliar a modificação causada na sequência do gene de miR-146b foi realizado o sequenciamento pelo método de Sanger. Para tal, o DNA genômico foi extraído das células KTC2-CTR, KTC2-Cl1 e KTC2-Cl3, utilizando o kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Após a extração, o fragmento do gene *MIR146B*, contendo a região alvo da edição, foi amplificado por PCR, usando os primers denotados na Tabela 3. O fragmento amplificado, de 361 pares de base, foi purificado usando o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) e sequenciado pelo método de Sanger, utilizando apenas o primer “*forward*” (Seq Fw) apresentado na Tabela 3. A eficiência da edição gênica foi avaliada com a ferramenta online “SeqScreener Gene Edit Confirmation App” (SGC- <https://apps.thermofisher.com/apps/gea-web/#/setup>) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, CA, USA).

Tabela 3 – Sequências dos primers utilizados no sequenciamento da região alvo da edição gênica

	Sequência 5'-3'
Seq Fw	CTGGGAACGGGAGACGATTC
Seq Rv	GAAAGCTAAGTGGAGGCCGT

3.5 Ensaios funcionais do efeito da redução de *miR-146b-5p*

3.5.1 Proliferação celular

Células KTC2 foram semeadas em placas de 12 poços em uma quantidade de 2×10^4 células por poço. As células foram cultivadas e coletadas, sendo lavadas com PBS e removidas por tripsinização, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. As células foram então contadas em um citômetro, determinando-se a média das sextuplicatas.

3.5.2 Viabilidade celular

1×10^4 células foram semeadas nos poços de placas de 96 poços e foram mantidas em cultura por 24h. O sal tetrazólio MTT (brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) foi adicionado ao meio de cultura em uma concentração de 250g/mL, e as células foram incubadas por 4h. O MTT é um sal de coloração amarela, que sofre redução pela desidrogenase mitocondrial, tornando-se de coloração roxa. Após a incubação o meio foi removido e os cristais de formazan, formados pela redução, foram solubilizados em 0,01M HCl em isopropanol. A absorbância foi então medida, em um comprimento de onda de 595nm em um espectrofotômetro SpectraMax M (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

3.5.3 Migração celular

Células KTC2 foram semeadas em uma densidade de 1×10^5 em placas de 6cm e mantidas em cultura até se atingir a confluência. Ao se atingir a confluência, 2g/mL de mitomicina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram adicionados ao meio, para impedir a mitose, evitando que as células realizassem divisão celular. Após 2 horas da adição de mitomicina ao meio, uma raspagem realizada com uma ponteira de micropipeta de 100 μ L gerou uma ruptura na monocamada de células, criando uma “ferida”. Foram realizadas 4 lavagens com PBS, para evitar que células restantes, flutuando no meio, pudessem se alojar no centro da ferida, e então meio contendo 2g/mL de mitomicina foi adicionado novamente. O fechamento da ferida foi monitorado usando um microscópio EVOS XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Imagens representativas foram tiradas, com auxílio do microscópio, e a quantificação do preenchimento da ferida pelas células foi medido, usando o software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>, acessado em 20 de julho de 2021)

3.5.4 Formação de colônia

500 células KTC2 foram semeadas em placas de 6cm, em triplicata, e foram mantidas em cultura por 8 dias. Após os 8 dias em expansão, as células foram fixadas com formaldeído 3,7% por 10 minutos. Após este período o formaldeído foi removido e cristal violeta 0,5% foi adicionado, corando as células.

3.5.5 Análise da expressão de genes codificantes

A quantificação e análise da expressão de genes codificantes de proteína foi realizada utilizando DNA complementar (cDNA) gerado da transcrição reversa de 1µg de RNA, do qual a extração foi explicada anteriormente. A transcrição reversa foi realizada usando primers oligo(dT) e transcriptase reversa MMLV (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Foi realizada uma PCR quantitativa usando-se SYBR Green Master Mix, o cDNA obtido anteriormente, e primers específicos, apresentados na Tabela 4. A reação foi realizada no aparelho ViiA7® (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A expressão genica foi normalizada pelos níveis de Rpl19 e calculada usando o programa QGene (SIMON, 2003).

Tabela 4 – Sequências dos primers utilizados para amplificação e quantificação da expressão dos genes codificantes alvo de *miR-146b-5p*

	Sequência 5'-3'
<i>NIS</i> Fw	AGTACATTGTAAGCCACGATGCTGTA
<i>NIS</i> Rv	CGGTCACTTGGTTCAGGATGA
<i>TG</i> Fw	CCTGCTGGCTCCACCTTGTTT
<i>TG</i> Rv	CCTTGTTCTGAGCCTCCCATCGTT
<i>ZEB1</i> Fw	GATGACCTGCCAACAGACCA
<i>ZEB1</i> Rv	GCCCTTCCTTTCCTGTGTCA
<i>HMGA2</i> Fw	AAAGCAGCTCAAAAGAAAGCA
<i>HMGA2</i> Rv	TGTTGTGGCCATTTCTAGGT
<i>RPL19</i> Fw	TCTCATGGAACACATCCACAA
<i>RPL19</i> Rv	TGGTCAGCCAGGAGCTTCTT

3.5.6 Xenotransplante em camundongos nude

Camundongos imunodeficientes do tipo nude (atímicos) foram utilizados neste experimento, sendo mantidos em gaiolas especiais com filtro de ar e alimentados com ração e água autoclavadas *ad libitum*. Um total de 3 camundongos ($n=3$) foi utilizado para este experimento. A injeção de 1×10^6 células KTC2, ressuspendidas em PBS e Matrigel® Matrix (Corning, NY, USA), em uma proporção 1:1, em um volume total de $100 \mu\text{L}$, foi realizada subcutaneamente na porção dorsal do camundongo. As células KTC2-CTR e KTC2-C11 foram injetadas em flancos opostos (KTC2-CTR: flanco esquerdo; KTC2-C11: flanco direito), e o desenvolvimento tumoral foi acompanhado por 12 semanas. Durante este período, a área do tumor foi aferida com paquímetro, obtendo o comprimento (C) e largura (L). Ao fim, o volume (V) foi calculado usando as medidas do comprimento e largura, usando a fórmula $V = (C \times L^2)/2$. Após eutanásia, foi realizada excisão do tumor, sendo então pesado, fixado em formaldeído e conservado em parafina.

3.6 Análise estatística

Os resultados dos grupos foram comparados utilizando-se o teste t no programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), apresentando-se os valores das médias com desvio padrão, sendo que diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do perfil de expressão de *miR-146b* em linhagens celulares de câncer de tireoide

Para selecionarmos qual linhagem de carcinoma anaplásico seria utilizada neste trabalho, inicialmente quantificamos os níveis de expressão de *miR-146b-5p* e de *miR-146b-3p*, e os analisamos em várias linhagens de câncer de tireoide (Tabela 1). Observamos uma alta expressão de *miR-146b-5p* em células de câncer de tireoide papilífero e anaplásico. Por outro lado, identificamos uma baixa expressão de *miR-146b-3p* nas células, considerando os altos níveis de C_t (“*threshold cycle*”), superiores a 36.

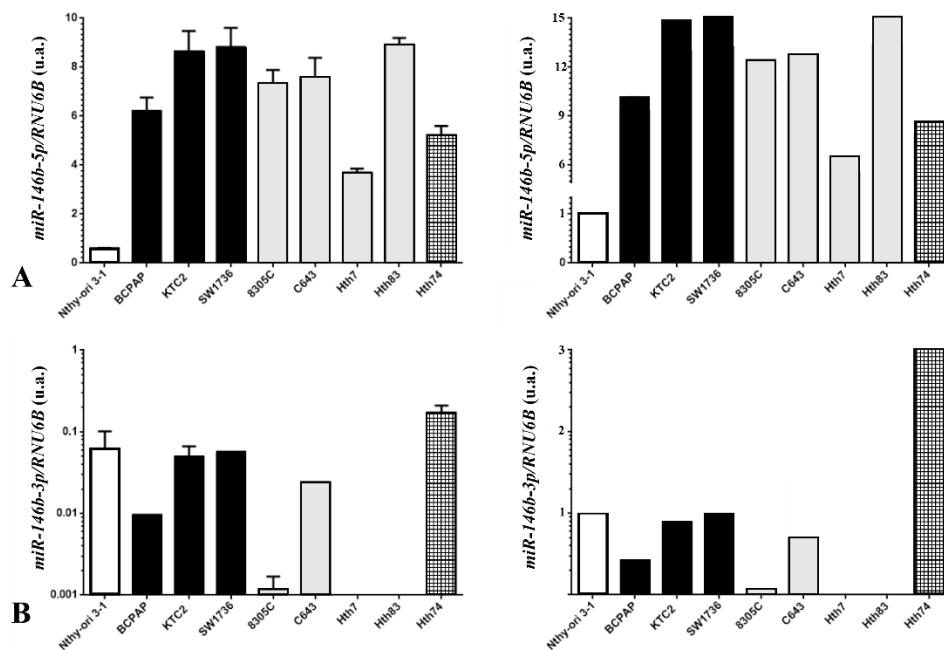


Figura 5 – Níveis de expressão de *miR-146b-5p* e *miR-146b-3p* em linhagens celulares de câncer de tireoide.

Expressão de *miR-146b-5p* (A) e *miR-146b-3p* (B) maduros, normalizada por *RNU6B*, em linhagens de câncer de tireoide derivadas de câncer de tireoide papilífero (BCPAP) e anaplásico (KTC2, 8305c, C643, Hth74 e Hth83), com o controle Nthy-ori 3-1. À esquerda, estão apresentados os valores brutos, e à direita, os valores normalizados por um. As barras pretas indicam a presença de mutação $BRAF^{V600E}$, as barras cinzas mutação RAS e a barra quadriculada mutação NF1.

4.2 Análise da expressão de *miR-146b* na linhagem KTC2 com edição gênica

Selecionamos a linhagem KTC2 por exibir uma alta expressão de *miR-146b-5p* e apresentar a mutação BRAF^{V600E}. Após a cotransfecção dos plasmídeos e a seleção das células, obtivemos os dois clones editados, denominadas KTC2-C11 e KTC2-C13, assim como o controle, nomeado KTC2-CTR, que foram utilizados subsequentemente.

Após a seleção, analisamos a expressão de *miR-146b* maduro em ambos os clones, havendo uma redução nos níveis de expressão de *miR-146b-5p*. Observamos uma redução de 60% nas células KTC2-C11 e de 50% nas células KTC2-C13, quando comparadas ao controle KTC2-CTR. Também foi quantificada a expressão de *miR-146b-3p*, porém os níveis detectados foram muito baixos em ambos os clones e no controle, tendo um C_t alto (C_t >37) (Figura 6).

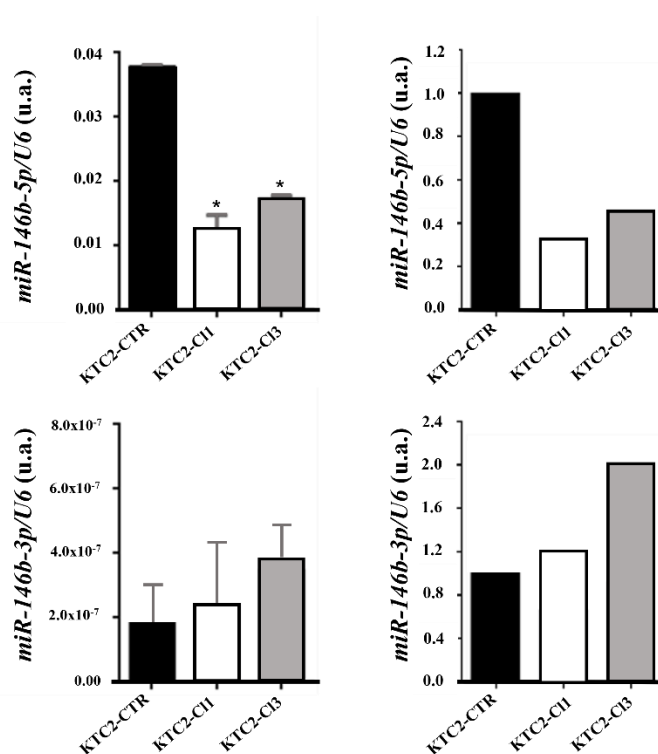


Figura 6 – Níveis de expressão de *miR-146b-5p* e *miR-146b-3p* em células KTC2 com edição gênica.

Expressão de *miR-146b-5p* e *miR-146b-3p*, normalizada por *U6*, após edição gênica com CRISPR/Cas9n, nas células KTC2-C11 e KTC2-C13 comparados a KTC2-CTR. À esquerda, estão apresentados os valores brutos, e à direita, os valores normalizados por um. A expressão foi calculada usando o programa QGene. * $p < 0.05$ vs. KTC2-CTR.

4.3 Sequenciamento da região alvo do gene *MIR146B*

Como mencionado anteriormente, duas linhagens clonais foram criadas com a edição e seleção das células KTC2. Ambas as linhagens, KTC2-C11 e KTC2-C13, tiveram sua região genômica do gene *MIR146B* sequenciada pelo método de Sanger, para confirmação e validação da edição gênica realizada pela ferramenta CRISPR/Cas9n (Figura 7). A análise do sequenciamento realizada no programa SeqScreener Gene App revelou que: mais de 80% das sequências da linhagem KTC2-C11 possuem uma deleção de 5 nucleotídeos no *miR-146b-5p*, próxima à região alvo de clivagem do Guia A; enquanto *miR-146b-3p* obteve uma deleção de 1 nucleotídeo em mais de 93% das sequências, próxima à região alvo de clivagem do Guia B. Em relação à KTC2-C13, foi observada uma deleção de 2 nucleotídeos em *miR-146b-5p* em mais de 97% das sequências analisadas, próxima à região da sequência PAM do Guia A; já *miR-146b-3p* obteve uma deleção de 2 nucleotídeos em mais de 98% das sequências, próxima à região de clivagem do Guia B.

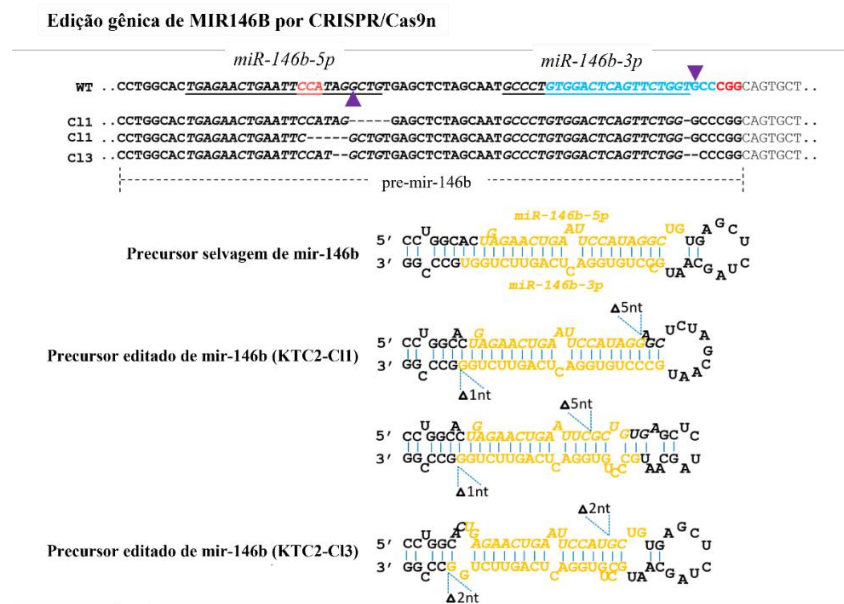


Figura 7 – Sequenciamento da região genômica de *MIR146B* após edição gênica. Comparação da região genômica de *MIR146B* nos clones KTC2-C11, KTC2-C13 e KTC2-CTR. Segmentos sublinhados indicam *miR-146b-5p* e *miR-146b-3p* maduros. Triângulos roxos apontam os pontos de quebra da fita única, determinados pelo Guia A e Guia B, adjacentes à sequência PAM (NGG), em vermelho. Abaixo, ilustração do precursor, demonstrado em formato de grampo (“hairpin”), comparando a estrutura e modificações do precursor selvagem com as alterações ocorridas em KTC2-C11 e KTC2-C13. Fonte: (SANTA-INEZ; FUZIWARA; SAITO; KIMURA, 2021).

4.4 Ensaios funcionais do efeito da redução de *miR-146b-5p*

4.4.1 Ensaio *in vitro*

Após confirmarmos a edição de *miR-146b-5p*, realizamos os estudos funcionais, investigando o efeito da redução deste miRNA. No ensaio de proliferação celular, a contagem mostrou uma redução (>50%) na quantidade de células KTC2-C11, comparado à KTC2-CTR após o período de 72h, tendo havido uma redução similar nas células KTC2-C13 (Figura 8A).

No ensaio de viabilidade celular, esta redução foi acompanhada por uma diminuição (~25%) da absorvância gerada pelas células KTC2-C11 no teste de MTT (Figura 8B).

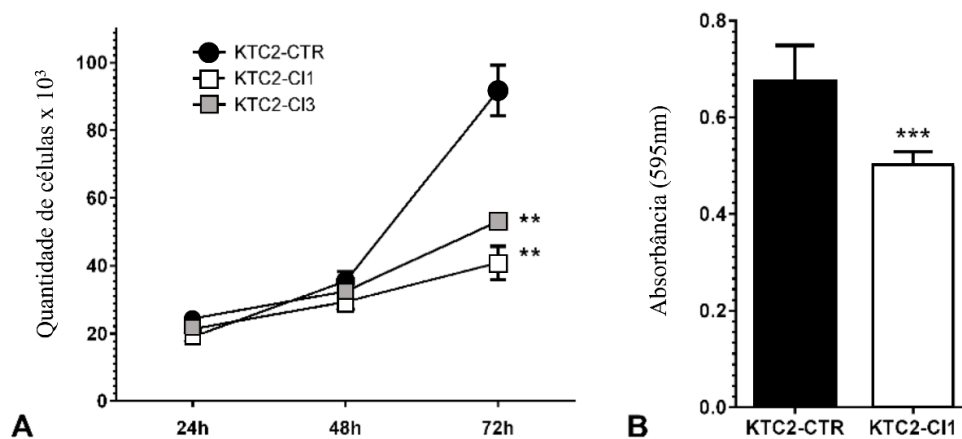


Figura 8 – Ensaio de proliferação e viabilidade celular. (A) Contagem de células das linhagens KTC2-C11 e KTC2-C13, em sextuplicata, comparadas ao controle KTC2-CTR. A contagem foi realizada 3 vezes, em ensaios distintos, em um citômetro nos tempos 24h, 48h e 72h após o plaqueamento. ** $p < 0.05$ vs. KTC2-CTR. (B) Ensaio de viabilidade celular, em octuplicata, quantificando a absorvância gerada pelas células KTC2-C11 e KTC2-CTR após o processamento do sal MTT. *** $p < 0.01$ vs. KTC2-CTR.

Avaliamos a migração celular realizando o ensaio de ferida, utilizando mitomicina para impedir a proliferação celular. Observamos que as células KTC2-CTR preenchem completamente a área da ferida em 22h, porém as células KTC2-C11 e KTC2-C13 preenchem aproximadamente apenas 22% e 32%, respectivamente (Figura 9). Após 72h, a ferida nas células KTC2-C11 e KTC2-C13 ainda se mantinha aberta, e o experimento foi encerrado sem o fechamento da ferida, mostrando diferença na capacidade migratória destas células.

Realizando o ensaio de formação de colônia observamos que, tanto nas células KTC2-C11 quanto nas KTC2-C13, houve uma menor formação de colônias, tanto em quantidade quanto em tamanho, quando comparadas a KTC2-CTR (Figura 10).

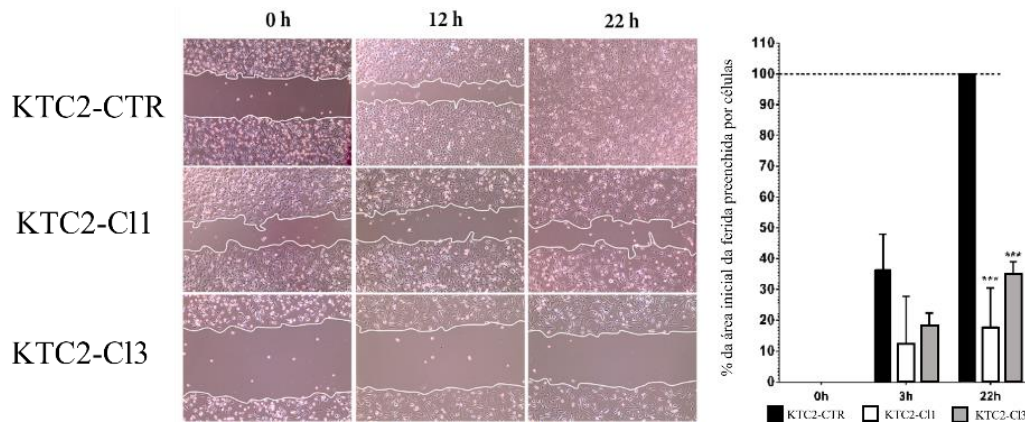


Figura 9 - Ensaio de migração celular. Imagens representativas do fechamento da área da ferida, de 3 ensaios realizados em triplicata, tiradas logo após o início do ensaio e realização da ferida (0h) e nos tempos de 12h e 22h. No gráfico ao lado, a quantificação em porcentagem de área fechada e preenchida, sendo o tempo 0h considerado 0%. A quantificação foi realizada usando o programa ImageJ. *** $p < 0.01$ vs. KTC-CTR.

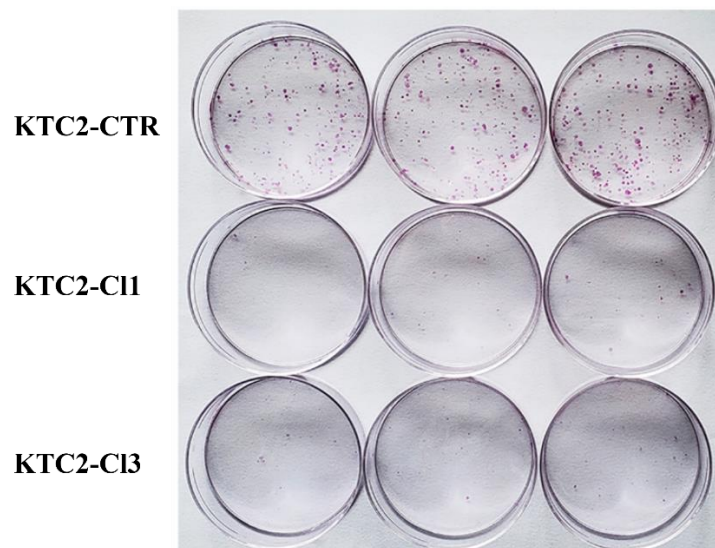


Figura 10 - Ensaio de formação de colônia. Comparação da capacidade de formar colônias das células KTC2-C11 e KTC2-C13, em relação ao controle KTC2-CTR, após serem semeadas em baixa densidade e mantidas em cultura por 8 dias. Imagens representativas de 3 ensaios realizados em triplicata.

Analizamos também a expressão de genes ligados à metabolização de iodo, como NIS e TG, não sendo detectadas alterações significativas (Figura 11). Assim como o *miR-146b-3p*, os valores de C_t do gene NIS se mostraram altos (>35), indicando uma baixa expressão nas células. Do mesmo modo, foi analisada a expressão de genes ligados à transição epitélio-mesenquimal, sendo eles o fator de transcrição ZEB1 e HMGA2. Ambos os genes demonstraram redução nas células KTC2-C11 e KTC2-C13, quando comparados ao controle (Figura 12).

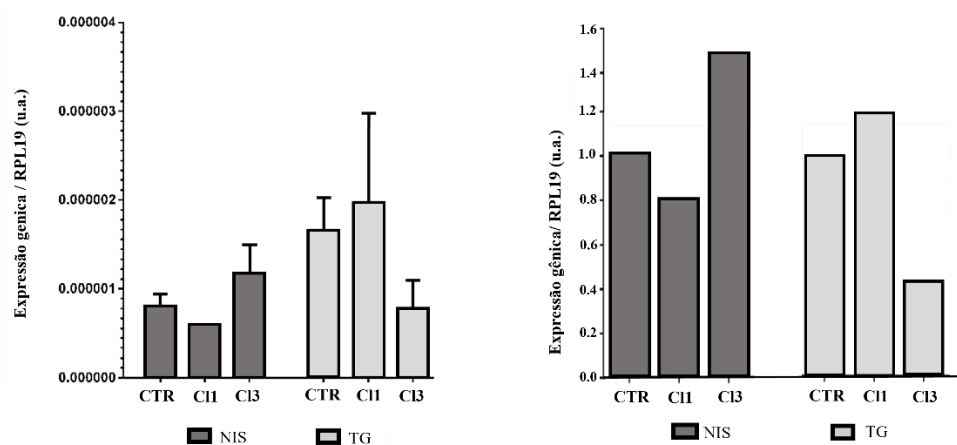


Figura 11 – Expressão gênica de NIS e TG nas linhagens KTC2 editadas. Níveis de expressão de genes envolvidos na diferenciação da tireoide, NIS e TG. À esquerda os valores brutos, e à direita os valores normalizados considerando o controle como um. A expressão foi calculada usando o programa QGene. * $p < 0.05$ vs. KTC2-CTR.

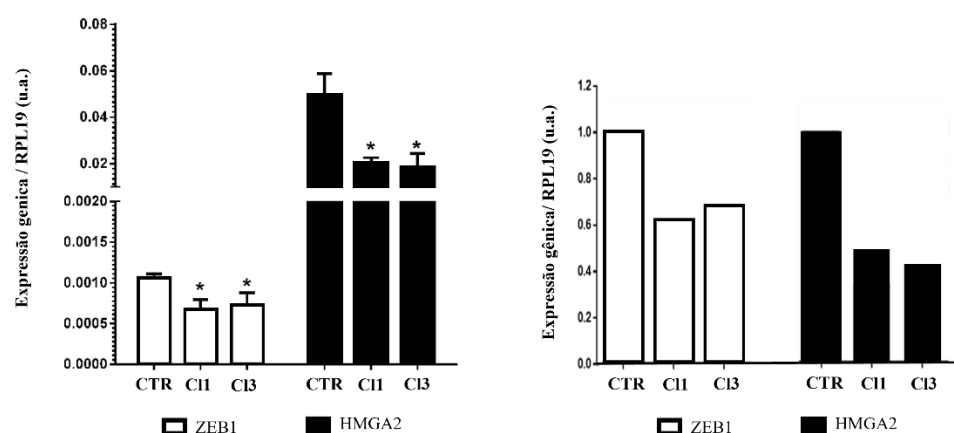


Figura 12 – Expressão gênica de ZEB1 e HMGA2 nas linhagens KTC2 editadas. Expressão de marcadores de transição epitélio-mesenquimal, ZEB1 e HMGA2. À esquerda os valores brutos, e à direita os valores normalizados considerando o controle como um. A expressão foi calculada usando o programa QGene. * $p < 0.05$ vs. KTC2-CTR.

4.4.2 Ensaio *in vivo* de xenotransplante para avaliação do crescimento das células KTC2 editadas

Realizamos o xenotransplante em camundongos nude, nos quais apenas as células KTC2-CTR formaram tumores, não sendo detectado crescimento das células KTC2-C11 (Figura 13). Acompanhamos o crescimento do tumor pelo período de 12 semanas, porém seu crescimento só foi mensurável com um paquímetro a partir da sexta semana, sendo que nas semanas anteriores não havia ocorrido formação de tumor suficiente para sua área ser medida (Figura 13B). O tumor gerado pelas células KTC2-CTR foi um tumor sólido vascularizado com células e núcleo pleomórficos, apresentando áreas de necrose (Figura 13C).

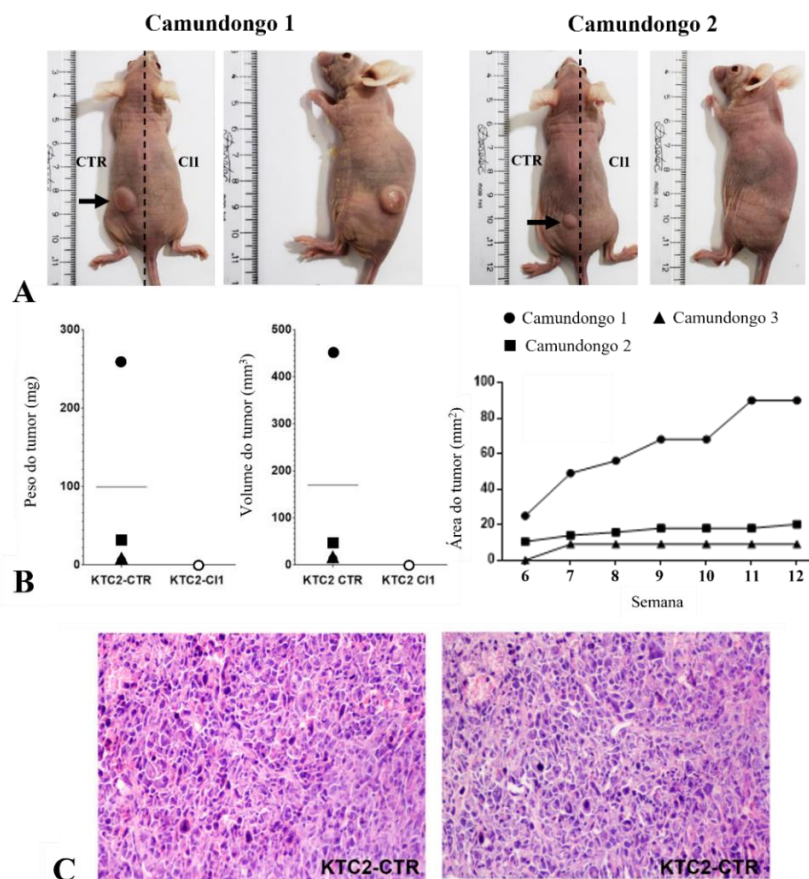


Figura 13—Ensaio de xenotransplante em camundongo nude acompanhado por 12 semanas. (A) Imagem representativa dos animais injetados com as células KTC2-CTR (flanco esquerdo) e KTC2-C11 (flanco direito) ao fim do ensaio, após eutanásia. (B) À esquerda, peso e volume do tumor derivado das células KTC2-CTR, comparado a células KTC2-C11 (sem tumor), após a eutanásia do animal. À direita, área do tumor (mm²) de KTC2-CTR ao longo das semanas ($n = 3$). (C) Corte histológico do tumor de KTC2-CTR corado com H&E. Aumento: 200x.

5 DISCUSSÃO

O aumento da expressão de *miR-146b* no câncer de tireoide tem sido extensamente descrito na literatura, e resulta em maior agressividade, menor sobrevida do paciente, entre outros fatores que levam à um pior prognóstico (CHOU; YANG; CHOU; HUANG *et al.*, 2013; CONG; HE; CHEN; LIU *et al.*, 2015; PENG; LI; LUO; DING *et al.*, 2014; YANG; YUAN; FAN; DENG *et al.*, 2013; YIP; KELLY; SHUAI; ARMSTRONG *et al.*, 2011). Embora se tenha conhecimento da expressão e dos efeitos de *miR-146b* no câncer de tireoide, grande parte da literatura explora apenas o câncer de tireoide papilífero, mas o estudo e compreensão de sua expressão no câncer de tireoide anaplásico foram pouco explorados até o momento. Neste trabalho, analisamos e avaliamos a expressão deste miRNA em linhagens de carcinoma tireoidiano anaplásico. Foi observado que há de fato uma alta expressão de *miR-146b-5p* em diversas linhagens de carcinoma anaplásico, de maneira mais notável nas linhagens com a mutação BRAF^{V600E}. Como já mencionando, há uma relação direta entre a alta expressão de *miR-146b-5p* e maior agressividade, e, em conjunto a isso, a mutação BRAF^{V600E} também aumenta a agressividade e diminui a sobrevida do paciente (CHOU; CHEN; CHOU; CHANG *et al.*, 2010; GERALDO; YAMASHITA; KIMURA, 2012). Pela mutação BRAF^{V600E} aumentar a expressão de *miR-146b-5p*, e contribuir de forma coadjuvante para o quadro da doença, a linhagem KTC2 foi escolhida.

A ferramenta CRISPR/Cas9n demonstra-se promissora como metodologia para investigar a biologia da célula tumoral, modificando sequências, corrigindo mutações, e de forma geral aumentando ou diminuindo a expressão gênica (ADLI, 2018). Em relação ao câncer de tireoide, pouco foi estudado e explorado no campo de genes não codificantes usando-se CRISPR/Cas9n (FUZIWARA; SAITO; KIMURA, 2020). À vista disto, neste trabalho, utilizando a metodologia CRISPR/Cas9n, editamos o gene *MIR146B*, resultando em uma redução de até 60% na expressão de *miR-146b-5p*, confirmando que a utilização de CRISPR/Cas9n para a edição de genes de miRNAs é eficiente, realizando e demonstrando as modificações na sequência do gene *MIR146B* após a criação de RNAs guia e sua transfecção junto à enzima Cas9n.

Embora tenha se observado a edição de *miR-146b* na linhagem KTC2, levando à uma queda de sua expressão, não houve inibição total de sua expressão. A falta de um clone com *knock-down* total (*knock-out*), pode indicar algumas possibilidades. A

primeira é que este fato pode ter ocorrido pela edição monoalélica do gene de *miR-146b*, fazendo com que a célula ainda tenha uma cópia deste gene intacta, permitindo que a célula ainda expresse o miRNA, porém em quantidade reduzida. Outra possibilidade é que o *knock-out* possa ser letal para estas células, tornando inviável a sobrevivência de células que não expressem *miR-146b*. É interessante mencionar um estudo no qual a ferramenta CRISPR/Cas9n foi utilizada para editar *miR-10b* em glioblastoma, onde a perda de função deste miRNA foi letal para as células, sendo estas mutações apenas detectáveis nas células mortas que flutuavam no meio de cultura (EL FATIMY; SUBRAMANIAN; UHLMANN; KRICHEVSKY, 2017). Além disso, os níveis de expressão de *miR-10b* obtidos com este estudo, próximos de 60%, foram similares aos obtidos com a edição de *miR-146b* em nosso estudo. Apesar disso, o eletroferograma do sequenciamento de KTC2-C11 e KTC2-C13 revelou a presença residual de sequências selvagens de *miR-146b* junto das sequências editadas (Figura 8), o que fortalece a hipótese da edição monoalélica de *MIR146B*, em ambos os clones.

Durante o processo de isolamento e criação dos clones observamos uma diferença no tempo necessário para as células KTC2-C11 e KTC2-C13 preencherem a placa de cultura, em comparação às células KTC2-CTR, que atingiam a confluência em um período de tempo menor. Este foi o primeiro indício de que a redução de *miR-146b-5p* havia afetado a biologia das células, que se confirmou pelo ensaio de proliferação celular. De fato, foi observado que após 72h a quantidade de células KTC2-CTR era mais que o dobro de KTC2-C11, gerando um efeito antiproliferativo nas células editadas. Observamos ainda, no ensaio de viabilidade celular, uma redução na absorbância do MTT, o que indica uma menor atividade metabólica das células KTC2-C11 em comparação ao controle.

A migração celular também foi afetada pela redução de *miR-146b-5p*, visto que a ferida realizada nas células KTC2-CTR fechou mais precocemente que a ferida em KTC2-C11 e KTC2-C13. Ao final do experimento (72h) menos de 30% da área havia sido preenchida pelas células KTC2-C11, revelando um possível efeito antimigratório causado pela redução de *miR-146b-5p*. Foi igualmente observado uma redução na quantidade e no tamanho das colônias formadas pelas células KTC2-C11 e KTC2-C13. Esta redução na capacidade de formação de colônias a partir de células únicas isoladas pode indicar uma diminuição na capacidade de metástase, já que este processo ocorre com o deslocamento de células do tumor primário para outras regiões

do corpo, havendo a necessidade desta célula oncogênica sobreviver e se multiplicar, formando novas colônias.

Dentre os poucos estudos que exploram o papel de *miR-146b* no câncer de tireoide anaplásico, mostrou-se que a indução de expressão deste miRNA, isto é, o aumento da expressão *in vitro* de *miR-146b-5p*, em células de carcinoma anaplásico, leva a um aumento tanto na proliferação quanto na migração celular, assim como inversamente sua redução leva a uma diminuição na proliferação e migração celular (WANG; CHEN; BAI, 2016). Esta conclusão solidifica os resultados obtidos e ressalta a importância do papel de *miR-146b* nestes processos biológicos.

Embora não tenha sido possível observar aumento na expressão de NIS e TG, genes de diferenciação celular da glândula tireoide, que poderia contribuir na utilização do tratamento com radioiodo em câncer anaplásico, houve uma redução de expressão de ZEB1 e HMGA2, genes envolvidos na metástase e recorrência. Esta queda na expressão de ZEB1 e HMGA2 indica uma possível redução na capacidade de realizar a transição epitélio-mesenquimal, propriedade característica da linhagem KTC2, já que estes genes são envolvidos neste processo (FUZIWARA; KIMURA, 2014).

É curioso notar que com redução de *miR-146b-5p* não houve modificação na expressão de NIS, porém ocorreu redução de ZEB1 e HMGA2, que não são alvos de *miR-146b*. A inalteração de NIS pode ter se dado ao fato de o mRNA de NIS ser alvo da isoforma *miR-146b-3p*, cuja expressão não se modulou nesta edição gênica (LI; LV; CHEN; GUAN *et al.*, 2015; RIESCO-EIZAGUIRRE; WERT-LAMAS; PERALES-PATON; SASTRE-PERONA *et al.*, 2015)

Corroborando com nossos dados *in vitro*, o estudo *in vivo* xenotransplante realizado em camundongos nude, confirmou a importância da expressão de *miR-146b-5p* no desenvolvimento tumoral. A ausência de formação de tumor pelas células KTC2-C11 demonstra uma forte redução da capacidade oncogênica.

Este trabalho é o primeiro a ter sucesso em editar o gene de *MIR146B* com CRISPR/Cas9n em câncer de tireoide. Observamos que a redução da expressão de *miR-146b-5p* promoveu um efeito antitumoral na linhagem de carcinoma anaplásico KTC2. Estudos futuros aprimorando o uso desta ferramenta e aplicando outros RNAs guias, que tenham como alvo diferentes segmentos do gene, poderá expandir o entendimento da função de miRNAs no câncer, com perspectiva de aplicação clínica no futuro.

6 CONCLUSÃO

- Obtivemos clones editados da linhagem KTC2 de carcinoma anaplásico com redução da expressão de *miR-146b-5p*;
- O sequenciamento da região alvo dos guias mostrou a edição do gene *MIR146B*, confirmando a eficácia dos RNAs guia desenvolvidos;
- Nos clones editados foi observado:
 - Diminuição da proliferação celular
 - Reduzida viabilidade celular
 - Redução da capacidade migratória
 - Menor formação de colônias
- No ensaio *in vivo* foi observado crescimento tumoral apenas das células do grupo controle, não havendo crescimento das células editadas;
- A ferramenta CRISPR/Cas9n mostrou-se como uma metodologia eficaz em modular o gene *MIR146B* e promover alterações na biologia da célula tumoral da linhagem de carcinoma anaplásico KTC2 de tireoide. O aprimoramento desta técnica poderá contribuir no melhor no entendimento da função de miRNAs no câncer, com perspectiva de aplicação clínica no futuro.

REFERÊNCIAS*

- ADLI, M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. **Nat Commun**, 9, n. 1, p. 1911, May 15 2018.
- AGARWAL, V.; BELL, G. W.; NAM, J. W.; BARTEL, D. P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. **Elife**, 4, Aug 12 2015.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 5ª edição ed. Guanabara, 2018.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, 136, n. 2, p. 215-233, Jan 23 2009.
- BIBLE, K. C.; KEBEBEW, E.; BRIERLEY, J.; BRITO, J. P. *et al.* 2021 American Thyroid Association Guidelines for Management of Patients with Anaplastic Thyroid Cancer. **Thyroid**, 31, n. 3, p. 337-386, Mar 2021.
- BUSHATI, N.; COHEN, S. M. microRNA functions. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 23, p. 175-205, 2007.
- CABANILLAS, M. E.; MCFADDEN, D. G.; DURANTE, C. Thyroid cancer. **Lancet**, 388, n. 10061, p. 2783-2795, Dec 3 2016.
- CAHILL, S.; SMYTH, P.; DENNING, K.; FLAVIN, R. *et al.* Effect of BRAFV600E mutation on transcription and post-transcriptional regulation in a papillary thyroid carcinoma model. **Mol Cancer**, 6, p. 21, Mar 13 2007.
- CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. **Nat Rev Cancer**, 6, n. 11, p. 857-866, Nov 2006.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. **Cell**, 159, n. 3, p. 676-690, Oct 23 2014.
- CARTER, W. B.; TOURTELOT, J. B.; SAVELL, J. G.; LILIENFELD, H. New treatments and shifting paradigms in differentiated thyroid cancer management. **Cancer Control**, 18, n. 2, p. 96-103, Apr 2011.
- CHIANG, T. W.; LE SAGE, C.; LARRIEU, D.; DEMIR, M. *et al.* CRISPR-Cas9(D10A) nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing. **Sci Rep**, 6, p. 24356, Apr 15 2016.
- CHOU, C. K.; CHEN, R. F.; CHOU, F. F.; CHANG, H. W. *et al.* miR-146b is highly expressed in adult papillary thyroid carcinomas with high risk features including extrathyroidal invasion and the BRAF(V600E) mutation. **Thyroid**, 20, n. 5, p. 489-494, May 2010.
- CHOU, C. K.; CHI, S. Y.; HUANG, C. H.; CHOU, F. F. *et al.* IRAK1, a Target of miR-146b, Reduces Cell Aggressiveness of Human Papillary Thyroid Carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, 101, n. 11, p. 4357-4366, Nov 2016.
- CHOU, C. K.; YANG, K. D.; CHOU, F. F.; HUANG, C. C. *et al.* Prognostic implications of miR-146b expression and its functional role in papillary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, 98, n. 2, p. E196-205, Feb 2013.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

COLLABORATORS, G. B. D. C. o. D. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet**, 392, n. 10159, p. 1736-1788, Nov 10 2018.

CONG, D.; HE, M.; CHEN, S.; LIU, X. *et al.* Expression profiles of pivotal microRNAs and targets in thyroid papillary carcinoma: an analysis of The Cancer Genome Atlas. **Onco Targets Ther**, 8, p. 2271-2277, 2015.

DENG, X.; WU, B.; XIAO, K.; KANG, J. *et al.* MiR-146b-5p promotes metastasis and induces epithelial-mesenchymal transition in thyroid cancer by targeting ZNRF3. **Cell Physiol Biochem**, 35, n. 1, p. 71-82, 2015.

EL FATIMY, R.; SUBRAMANIAN, S.; UHLMANN, E. J.; KRICHEVSKY, A. M. Genome Editing Reveals Glioblastoma Addiction to MicroRNA-10b. **Mol Ther**, 25, n. 2, p. 368-378, Feb 1 2017.

FAGIN, J. A.; WELLS, S. A., Jr. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. **N Engl J Med**, 375, n. 11, p. 1054-1067, Sep 15 2016.

FUZIWARA, C. S.; KIMURA, E. T. MicroRNA Deregulation in Anaplastic Thyroid Cancer Biology. **Int J Endocrinol**, 2014, p. 743450, 2014.

FUZIWARA, C. S.; KIMURA, E. T. MicroRNAs in thyroid development, function and tumorigenesis. **Mol Cell Endocrinol**, 456, p. 44-50, Nov 15 2017.

FUZIWARA, C. S.; SAITO, K. C.; KIMURA, E. T. Thyroid Follicular Cell Loss of Differentiation Induced by MicroRNA miR-17-92 Cluster Is Attenuated by CRISPR/Cas9n Gene Silencing in Anaplastic Thyroid Cancer. **Thyroid**, 30, n. 1, p. 81-94, Jan 2020.

GERALDO, M. V.; YAMASHITA, A. S.; KIMURA, E. T. MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF-beta by repressing SMAD4 in thyroid cancer. **Oncogene**, 31, n. 15, p. 1910-1922, Apr 12 2012.

GOMEZ-PEREZ, A. M.; CORNEJO PAREJA, I. M.; GARCIA ALEMAN, J.; COIN ARAGUEZ, L. *et al.* New molecular biomarkers in differentiated thyroid carcinoma: Impact of miR-146, miR-221 and miR-222 levels in the evolution of the disease. **Clin Endocrinol (Oxf)**, 91, n. 1, p. 187-194, Jul 2019.

GRIMSON, A.; FARH, K. K.; JOHNSTON, W. K.; GARRETT-ENGELE, P. *et al.* MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. **Mol Cell**, 27, n. 1, p. 91-105, Jul 6 2007.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 15, n. 8, p. 509-524, Aug 2014.

HANNALLAH, J.; ROSE, J.; GUERRERO, M. A. Comprehensive literature review: recent advances in diagnosing and managing patients with poorly differentiated thyroid carcinoma. **Int J Endocrinol**, 2013, p. 317487, 2013.

HAUGEN, B. R.; ALEXANDER, E. K.; BIBLE, K. C.; DOHERTY, G. M. *et al.* 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. **Thyroid**, 26, n. 1, p. 1-133, Jan 2016.

- HE, H.; JAZDZEWSKI, K.; LI, W.; LIYANARACHCHI, S. *et al.* The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 102, n. 52, p. 19075-19080, Dec 27 2005.
- HSU, P. D.; SCOTT, D. A.; WEINSTEIN, J. A.; RAN, F. A. *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. **Nat Biotechnol**, 31, n. 9, p. 827-832, Sep 2013.
- INCA. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019.
- JIANG, F.; DOUDNA, J. A. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. **Annu Rev Biophys**, 46, p. 505-529, May 22 2017.
- JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, 337, n. 6096, p. 816-821, Aug 17 2012.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12ª edição ed. Guanabara, 2013.
- KIMURA, E. T.; NIKIFOROVA, M. N.; ZHU, Z.; KNAUF, J. A. *et al.* High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. **Cancer Res**, 63, n. 7, p. 1454-1457, Apr 1 2003.
- LABUN, K.; MONTAGUE, T. G.; KRAUSE, M.; TORRES CLEUREN, Y. N. *et al.* CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. **Nucleic Acids Res**, 47, n. W1, p. W171-W174, Jul 2 2019.
- LEE, Y. S.; DUTTA, A. MicroRNAs in cancer. **Annu Rev Pathol**, 4, p. 199-227, 2009.
- LI, L.; LV, B.; CHEN, B.; GUAN, M. *et al.* Inhibition of miR-146b expression increases radioiodine-sensitivity in poorly differential thyroid carcinoma via positively regulating NIS expression. **Biochem Biophys Res Commun**, 462, n. 4, p. 314-321, Jul 10 2015.
- LIMA, C. R.; GERALDO, M. V.; FUZIWARA, C. S.; KIMURA, E. T. *et al.* MiRNA-146b-5p upregulates migration and invasion of different Papillary Thyroid Carcinoma cells. **BMC Cancer**, 16, p. 108, Feb 16 2016.
- LU, J.; GETZ, G.; MISKA, E. A.; ALVAREZ-SAAVEDRA, E. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**, 435, n. 7043, p. 834-838, Jun 9 2005.
- MITSUTAKE, N.; KNAUF, J. A.; MITSUTAKE, S.; MESA, C., Jr. *et al.* Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. **Cancer Res**, 65, n. 6, p. 2465-2473, Mar 15 2005.
- MOHR, A. M.; MOTT, J. L. Overview of microRNA biology. **Semin Liver Dis**, 35, n. 1, p. 3-11, Feb 2015.
- NIKIFOROVA, M. N.; TSENG, G. C.; STEWARD, D.; DIORIO, D. *et al.* MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. **J Clin Endocrinol Metab**, 93, n. 5, p. 1600-1608, May 2008.
- PALLANTE, P.; BATTISTA, S.; PIERANTONI, G. M.; FUSCO, A. Deregulation of microRNA expression in thyroid neoplasias. **Nat Rev Endocrinol**, 10, n. 2, p. 88-101, Feb 2014.

PALLANTE, P.; VISIONE, R.; FERRACIN, M.; FERRARO, A. *et al.* MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. **Endocr Relat Cancer**, 13, n. 2, p. 497-508, Jun 2006.

PANEBIANCO, F.; MAZZANTI, C.; TOMEI, S.; ARETINI, P. *et al.* The combination of four molecular markers improves thyroid cancer cytologic diagnosis and patient management. **BMC Cancer**, 15, p. 918, Nov 19 2015.

PENG, Y.; CROCE, C. M. The role of MicroRNAs in human cancer. **Signal Transduct Target Ther**, 1, p. 15004, 2016.

PENG, Y.; LI, C.; LUO, D. C.; DING, J. W. *et al.* Expression profile and clinical significance of microRNAs in papillary thyroid carcinoma. **Molecules**, 19, n. 8, p. 11586-11599, Aug 5 2014.

RAN, F. A.; HSU, P. D.; LIN, C. Y.; GOOTENBERG, J. S. *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. **Cell**, 154, n. 6, p. 1380-1389, Sep 12 2013.

RAN, F. A.; HSU, P. D.; WRIGHT, J.; AGARWALA, V. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nat Protoc**, 8, n. 11, p. 2281-2308, Nov 2013.

RIESCO-EIZAGUIRRE, G.; GUTIERREZ-MARTINEZ, P.; GARCIA-CABEZAS, M. A.; NISTAL, M. *et al.* The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. **Endocr Relat Cancer**, 13, n. 1, p. 257-269, Mar 2006.

RIESCO-EIZAGUIRRE, G.; WERT-LAMAS, L.; PERALES-PATON, J.; SASTRE-PERONA, A. *et al.* The miR-146b-3p/PAX8/NIS Regulatory Circuit Modulates the Differentiation Phenotype and Function of Thyroid Cells during Carcinogenesis. **Cancer Res**, 75, n. 19, p. 4119-4130, Oct 1 2015.

RUPAIMOOLE, R.; CALIN, G. A.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; SOOD, A. K. miRNA Deregulation in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment. **Cancer Discov**, 6, n. 3, p. 235-246, Mar 2016.

RUPAIMOOLE, R.; SLACK, F. J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nat Rev Drug Discov**, 16, n. 3, p. 203-222, Mar 2017.

SANTA-INEZ, D. C.; FUZIWARA, C. S.; SAITO, K. C.; KIMURA, E. T. Targeting the Highly Expressed microRNA miR-146b with CRISPR/Cas9n Gene Editing System in Thyroid Cancer. **Int J Mol Sci**, 22, n. 15, Jul 27 2021.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; FUCHS, H. E.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2021. **CA Cancer J Clin**, 71, n. 1, p. 7-33, Jan 2021.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA Cancer J Clin**, 69, n. 1, p. 7-34, Jan 2019.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA Cancer J Clin**, 70, n. 1, p. 7-30, Jan 2020.

SIMON, P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. **Bioinformatics**, 19, n. 11, p. 1439-1440, Jul 22 2003.

STEMCELL. **Genome Editing with Direct Cas9 RNP Delivery Design Considerations**. Disponível em: <https://www.stemcell.com/design-considerations-for-the-arcitect-crispr-cas9-genome-editing-system.html>, 2018. Acesso em: 24/10/2021.

SUN, M.; FANG, S.; LI, W.; LI, C. *et al.* Associations of miR-146a and miR-146b expression and clinical characteristics in papillary thyroid carcinoma. **Cancer Biomark**, 15, n. 1, p. 33-40, 2015.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin**, 71, n. 3, p. 209-249, May 2021.

SWIERNIAK, M.; WOJCICKA, A.; CZETWERTYNSKA, M.; STACHLEWSKA, E. *et al.* In-depth characterization of the microRNA transcriptome in normal thyroid and papillary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, 98, n. 8, p. E1401-1409, Aug 2013.

VALERIO, L.; PIERUZZI, L.; GIANI, C.; AGATE, L. *et al.* Targeted Therapy in Thyroid Cancer: State of the Art. **Clin Oncol (R Coll Radiol)**, 29, n. 5, p. 316-324, May 2017.

VISONE, R.; PALLANTE, P.; VECCHIONE, A.; CIROMBELLA, R. *et al.* Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. **Oncogene**, 26, n. 54, p. 7590-7595, Nov 29 2007.

WANG, S.; CHEN, Y.; BAI, Y. p21 participates in the regulation of anaplastic thyroid cancer cell proliferation by miR-146b. **Oncol Lett**, 12, n. 3, p. 2018-2022, Sep 2016.

WANG, Z.; ZHANG, H.; HE, L.; DONG, W. *et al.* Association between the expression of four upregulated miRNAs and extrathyroidal invasion in papillary thyroid carcinoma. **Oncotargets Ther**, 6, p. 281-287, 2013.

WINTER, J.; JUNG, S.; KELLER, S.; GREGORY, R. I. *et al.* Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nat Cell Biol**, 11, n. 3, p. 228-234, Mar 2009.

XING, M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. **Nat Rev Cancer**, 13, n. 3, p. 184-199, Mar 2013.

XING, M.; ALZHRANI, A. S.; CARSON, K. A.; SHONG, Y. K. *et al.* Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. **J Clin Oncol**, 33, n. 1, p. 42-50, Jan 1 2015.

XING, M.; ALZHRANI, A. S.; CARSON, K. A.; VIOLA, D. *et al.* Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. **JAMA**, 309, n. 14, p. 1493-1501, Apr 10 2013.

YANG, Z.; YUAN, Z.; FAN, Y.; DENG, X. *et al.* Integrated analyses of microRNA and mRNA expression profiles in aggressive papillary thyroid carcinoma. **Mol Med Rep**, 8, n. 5, p. 1353-1358, Nov 2013.

YEH, C. D.; RICHARDSON, C. D.; CORN, J. E. Advances in genome editing through control of DNA repair pathways. **Nat Cell Biol**, 21, n. 12, p. 1468-1478, Dec 2019.

YIP, L.; KELLY, L.; SHUAI, Y.; ARMSTRONG, M. J. *et al.* MicroRNA signature distinguishes the degree of aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. **Ann Surg Oncol**, 18, n. 7, p. 2035-2041, Jul 2011.

ZHANG, J.; LIU, Y.; LIU, Z.; WANG, X. M. *et al.* Differential expression profiling and functional analysis of microRNAs through stage I-III papillary thyroid carcinoma. **Int J Med Sci**, 10, n. 5, p. 585-592, 2013.

ZHANG, Z.; LIU, D.; MURUGAN, A. K.; LIU, Z. *et al.* Histone deacetylation of NIS promoter underlies BRAF V600E-promoted NIS silencing in thyroid cancer. **Endocr Relat Cancer**, 21, n. 2, p. 161-173, Apr 2014.