

**PAOLA MARINO DANTONIO**

**O papel de NODAL, membro da superfamília TGF- $\beta$ , no câncer de  
tiroide**

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

Área de concentração: Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Edna Teruko Kimura

Versão original.

São Paulo  
2019

## RESUMO

DANTONIO, PM. **O papel de NODAL, membro da superfamília TGF- $\beta$ , no câncer de tireoide.** 2019. 79 p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O câncer de tireoide é uma neoplasia endócrina cuja incidência tem aumentado ao longo dos últimos anos. Mais de 80% dos casos consiste em carcinomas papilíferos (PTC), que são geralmente bem diferenciados e apresentam bom prognóstico. No entanto, uma fração dos pacientes é diagnosticada com doença agressiva e mau prognóstico. Estes casos são frequentemente resistentes à terapia convencional e apresentam baixo grau de diferenciação celular, sendo considerados pouco diferenciados ou anaplásicos (ATC). A perda de diferenciação se caracteriza pela ausência da expressão de marcadores de diferenciação tireoidiana como tiroglobulina (Tg), tiroperoxidase (TPO), simportador sódio/iodo (NIS), entre outros. A aquisição de características de células-tronco por células tumorais tem sido reportada em diversos cânceres, sendo a reativação de vias de sinalização embrionárias um dos possíveis mecanismos envolvidos nesse processo. A via de sinalização Nodal é crucial para a indução do mesoderma e formação do eixo ântero-posterior durante a embriogênese. Nodal é um ligante pertencente à superfamília TGF- $\beta$ , a qual possui membros que apresentam expressão desregulada em tumores da tireoide, tais como TGF- $\beta$ 1 e activinas A e B. A reativação da sinalização Nodal tem sido reportada no câncer e associada a fenótipos mais agressivos. Mostramos através de coloração por imunohistoquímica que NODAL está presente nas células foliculares de PTC, mas não de ATC. A superexpressão de *NODAL* em linhagem de PTC diminui a proliferação celular, mas não afeta a capacidade de formação de esferas nem a expressão de genes de pluripotência e diferenciação tireoidiana, enquanto o silenciamento parcial de *NODAL* aumenta a expressão de *SOX2* e *NIS*. Tanto a superexpressão quanto silenciamento de *NODAL* não influenciam a ativação da via Smad. Identificamos, ainda, microRNAs com expressão reduzida em amostras de PTC e potencialmente envolvidos na regulação da via Nodal, além de discutirmos os desafios de mensuração de Nodal a níveis proteico e de mRNA. Nossos resultados mostram que NODAL está expresso em carcinomas bem diferenciados da tireoide, mas não em ATC, ao contrário do que se observa em outros tipos de câncer. Além disso, a superexpressão de *NODAL* não promove fenótipo de célula-tronco em

linhagem de câncer diferenciado de tireoide. Em conjunto, nossos dados sugerem que a perda da expressão de NODAL pode estar associada a fenótipos menos diferenciados de câncer de tireoide, como evidenciado pelos resultados de imunohistoquímica. Dessa forma, experimentos adicionais como superexpressão de *NODAL* devem ser conduzidos em linhagens de ATC. Além disso, o uso de modelos mais avançados como animal ou cultura 3D pode ser empregado para estudar o envolvimento do microambiente tumoral, uma vez que o modelo de linhagens celulares apresenta limitações e não recapitula a heterogeneidade tumoral observada no câncer *in vivo*.

**Palavras-chave:** Câncer de tireoide. TGF- $\beta$ . Nodal. Diferenciação celular.

## ABSTRACT

DANTONIO, PM. **The role of NODAL, member of the TGF- $\beta$  superfamily, in thyroid cancer.** 2019. 79 p. Dissertation (Master thesis in Systems Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Thyroid cancer is an endocrine neoplasia with increasing incidence over the last years. More than 80% of cases consist of papillary carcinomas (PTC), which are usually well differentiated and present good prognosis. However, a fraction of patients is diagnosed with aggressive disease and bad prognosis. These cases are frequently resistant to conventional therapy and present low-grade cell differentiation, being considered poorly differentiated or anaplastic (ATC). The loss of differentiation is characterized by the loss of expression of thyroid differentiation markers such as thyroglobulin (Tg), thyroperoxidase (TPO), sodium/iodine symporter (NIS), among others. The acquisition of stem cell features by cancer cells has been reported in several cancers, and reactivation of embryonic signaling pathways is one of the possible mechanisms involved in this process. The Nodal signaling pathway is crucial for mesoderm induction and anterior-posterior axis formation during embryogenesis. Nodal is a ligand belonging to TGF- $\beta$  superfamily, which has members with deregulated expression in thyroid tumors, such as TGF- $\beta$ 1 and activins A and B. Reactivation of Nodal signaling has been reported in cancer and associated with more aggressive phenotypes. We show through immunohistochemistry staining that NODAL is present in follicular cells of PTC, but not ATC. *NODAL* overexpression in PTC cell line decreases cell proliferation but does not affect sphere formation capacity or the expression of pluripotency and thyroid differentiation genes, while *NODAL* knock down increases expression of *SOX2* and *NIS*. Both *NODAL* overexpression and knock down do not influence the activation of Smad signaling. We also identified microRNAs with reduced expression in PTC samples and potentially involved in the regulation of Nodal pathway, besides discussing the challenges of measuring Nodal protein and mRNA expression. Our results show that, contrary to what is observed in other types of cancer, NODAL is expressed in well differentiated thyroid carcinomas rather than in ATC. Moreover, NODAL overexpression does not promote stem cell-like phenotype in differentiated thyroid cancer cell line. Together, our data suggest that NODAL loss might be associated with less differentiated phenotypes in thyroid cancer, as evidenced by our

immunohistochemistry results. Thus, further experiments such as *NODAL* overexpression should be conducted with ATC cell lines. Furthermore, the use of more advanced models such as animal and 3D culture could be employed to study the involvement of tumor microenvironment, once cell line model is limited and do not recapitulate the tumor heterogeneity found in cancer *in vivo*.

**Keywords:** Thyroid cancer. TGF- $\beta$ . Nodal. Cell differentiation.

## 1 INTRODUÇÃO

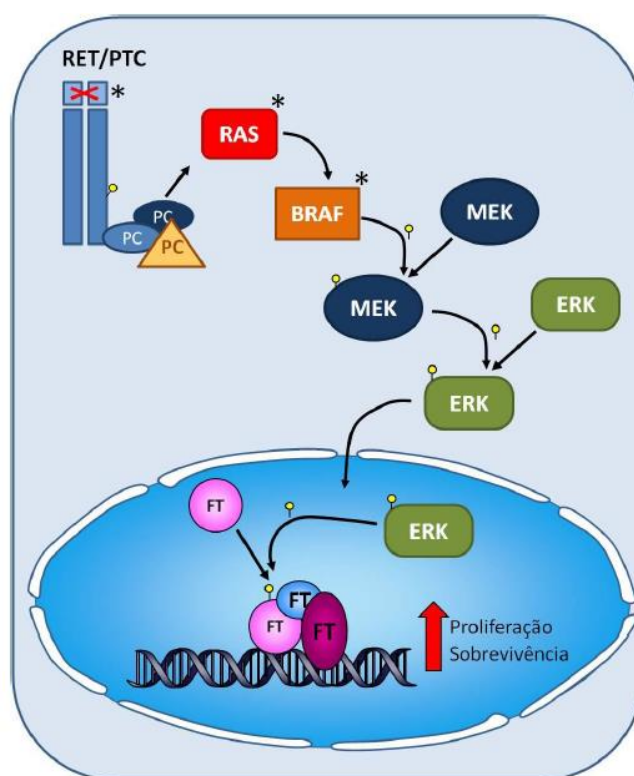
O câncer de tireoide vem apresentando aumento em sua incidência ao longo das últimas décadas (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019). A maioria dos casos consiste em carcinomas papilíferos e foliculares, que geralmente apresentam boa diferenciação celular e bom prognóstico. Entretanto, uma parcela dos pacientes apresenta carcinomas pouco diferenciados ou indiferenciados, caracterizados pela perda de marcadores de diferenciação e função tiroidianas e comportamento mais agressivo, resultando em pior prognóstico. Alterações genéticas que sustentam a ativação da via de sinalização MAPK como as observadas nos genes *BRAF*, *RAS* e *RET* estão fortemente relacionadas ao desenvolvimento de tumores malignos na tireoide (KIMURA; NIKIFOROVA; ZHU; KNAUF *et al.*, 2003; KONDO; EZZAT; ASA, 2006), e alterações adicionais como mutações em *TP53*, *TERT* e na via PI3K/Akt contribuem para progressão e malignidade da doença (FAGIN; WELLS, 2016; NIKIFOROVA; WALD; ROY; DURSO *et al.*, 2013).

A desdiferenciação observada em carcinomas mais agressivos pode estar associada com a aquisição de um fenótipo similar ao de células-tronco. Nesse contexto, a reativação de vias de sinalização embrionárias emerge como um potencial mecanismo através do qual células tumorais poderiam adquirir este fenótipo indiferenciado. A desregulação da via TGF- $\beta$  tem sido estudada em câncer de tireoide (KIMURA; KOPP; ZBAEREN; ASMIS *et al.*, 1999; MATSUO; EBINA; KULCSAR; FRIGUGLIETTI *et al.*, 2003; MATSUO; FIORE; SIGUEMATU; EBINA *et al.*, 2010; MATSUO; LEONI; COLQUHOUN; KIMURA, 2006), e membros dessa superfamília desempenham papéis importantes durante o desenvolvimento embrionário, como é o caso de Nodal. A sinalização Nodal é inibida em tecidos adultos através de uma complexa rede regulatória, mas sua reativação tem sido revelada e associada a fenótipos mais malignos em melanoma, câncer de mama, próstata, entre outros (QUAIL; SIEGERS; JEWER; POSTOVIT, 2013).

### 1.1 O câncer de tireoide

O câncer de tireoide é a neoplasia endócrina mais frequente e sua incidência continua a aumentar nos últimos anos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019), com cerca de

10.000 novos casos estimados para 2019 no Brasil e 52.000 nos Estados Unidos, sendo o quinto câncer mais incidente em mulheres brasileiras (INCA, 2018) e o sexto em mulheres norte-americanas (ACS, 2019). Carcinomas originados de células foliculares tiroidianas são os mais frequentes, compreendendo os histotipos (i) papilífero (PTC) e (ii) folicular (FTC), considerados bem diferenciados; (iii) carcinoma pouco diferenciado (PDTC) e (iv) o carcinoma anaplásico (ATC) ou indiferenciado. O PTC é o tipo histo-patológico mais frequente de câncer da tireoide, representando aproximadamente 90% dos casos, enquanto FTC representa menos de 5% dos casos (HOWLADER N, 2019; XING, 2013). Em geral, os tipos bem diferenciados apresentam bom prognóstico e muitas vezes podem ser curados por ressecção cirúrgica seguida de ablação por radioiodo e tratamento supressivo de TSH (BYRD; YAWN; WILHOIT; SORA *et al.*, 2012; FAGIN; WELLS, 2016).



**Figura 1. A via de sinalização MAPK no câncer de tireoide.** Os rearranjos cromossômicos RET/PTC codificam uma proteína de fusão citoplasmática com capacidade de autofosforilação e ativação de outras proteínas citoplasmáticas (PC). Estas proteínas levam à ativação de RAS, que por sua vez promove a fosforilação da proteína BRAF e a consequente fosforilação da cadeia MEK/ERK. ERK é translocada ao núcleo para promover a fosforilação e ativação de diversos fatores de transcrição (FT), os quais dirigem a transcrição de genes alvo, induzindo a proliferação e sobrevivência celular. Figura cedida por Geraldo, M.V. (2011).

O genótipo de tumores tiroidianos é frequentemente associado com características clínicas e estado de diferenciação (NIKIFOROV; NIKIFOROVA, 2011), indicando que o comportamento do câncer da tireoide pode ser influenciado por seu perfil genético. A oncogênese do câncer de tireoide está intimamente relacionada à ativação de vias de sinalização que estimulam a proliferação, principalmente a via MAPK, causada por alterações genéticas mutuamente exclusivas nos genes *RAS*, *BRAF* ou *RET* (Figura 1) (GRIECO; SANTORO; BERLINGIERI; MELILLO *et al.*, 1990; KIMURA; NIKIFOROVA; ZHU; KNAUF *et al.*, 2003; NAMBA; GUTMAN; MATSUO; ALVAREZ *et al.*, 1990; SOARES; TROVISCO; ROCHA; LIMA *et al.*, 2003).

A mutação mais frequente em câncer de tireoide é a mutação pontual *BRAF<sup>T1799A</sup>*, que consiste na troca de uma base timina por adenina na posição 1799 do gene *BRAF*, resultando na expressão da proteína mutante constitutivamente ativa *BRAF<sup>V600E</sup>*, na qual o aminoácido 600 valina é substituído por ácido glutâmico (KIMURA; NIKIFOROVA; ZHU; KNAUF *et al.*, 2003; NAMBA; NAKASHIMA; HAYASHI; HAYASHIDA *et al.*, 2003; NIKIFOROV; NIKIFOROVA, 2011). Esta alteração ocorre em 60% dos casos de PTC (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, 2014), sendo detectada também em ATC. Mutações na família de genes *RAS* são a segunda alteração genética mais frequente em câncer de tireoide, majoritariamente em FTC e ATC, e estão relacionadas a tumores mais agressivos (HOWELL; HODAK; YIP, 2013).

Em PTC, o proto-oncogene *RET*, que codifica um receptor tirosina-quinase (ISHIZAKA; ITOH; TAHIRA; IKEDA *et al.*, 1989), sofre diferentes rearranjos cromossômicos denominados rearranjos *RET/PTC* (FUSCO; GRIECO; SANTORO; BERLINGIERI *et al.*, 1987) que resultam na ativação constitutiva do receptor e estão associadas ao processo de transformação tumoral. Mais de 15 rearranjos *RET/PTC* foram descritos em PTC (TALLINI; ASA, 2001), sendo *RET/PTC1* e *RET/PTC3* as formas mais comuns (NAKAZAWA; KONDO; KOBAYASHI; TAKAMURA *et al.*, 2005; SUGG; EZZAT; ROSEN; FREEMAN *et al.*, 1998). Estudos com rearranjos *RET/PTC* mostram uma incidência variável desses eventos em PTC, em diferentes populações (NIKIFOROV, 2011; ROMEI; ELISEI, 2012). Dados da literatura são inconclusivos sobre o papel de *RET/PTC* no fenótipo do câncer de tireoide, havendo estudos que demonstram tanto correlações positivas quanto negativas com características clínico-patológicas da doença. Em alguns estudos, a presença de *RET/PTC3* foi positivamente correlacionada a fenótipos mais agressivos, tumores maiores e estágios mais avançados (NIKIFOROV; ROWLAND; BOVE; MONFORTE-MUNOZ *et al.*, 1997; POWELL;



RUSSELL; NIBU; LI *et al.*, 1998), apesar de não influenciar a expressão de marcadores de diferenciação tireoidiana como faz a mutação BRAF<sup>V600E</sup> (ROMEI; CIAMPI; FAVIANA; AGATE *et al.*, 2008). Esses dados indicam que essa alteração genética não deve contribuir para o processo de desdiferenciação. Altas concentrações de iodo desempenham um efeito protetor na presença do rearranjo RET/PTC3 (FIORE; FUZIWARA; KIMURA, 2009), e Knauf *et al.* (2003) demonstraram, ainda, que RET/PTC induz a desdiferenciação de células tireoidianas. O valor prognóstico da presença de rearranjos RET/PTC também tem sido debatido por diversos autores, com evidências que associam RET/PTC1 a um fenótipo mais favorável (SAAD; FALCIGLIA; STEWARD; NIKIFOROV, 2004), enquanto RET/PTC3 pode ser mais propenso a um comportamento agressivo (MOCHIZUKI; KONDO; NAKAZAWA; IWASHINA *et al.*, 2010).

As três alterações genéticas citadas (RET/PTC, BRAF<sup>T1799A</sup> e RAS) resultam na ativação sustentada da via MAPK, promovendo maior capacidade proliferativa (MITSUTAKE; KNAUF; MITSUTAKE; MESA *et al.*, 2005). Além disso, a aquisição de mutações adicionais como nas vias p53 e PI3K contribuem para a progressão para carcinomas tireoidianos pouco diferenciados e anaplásicos (NIKIFOROVA; WALD; ROY; DURSO *et al.*, 2013; RICARTE-FILHO; RYDER; CHITALE; RIVERA *et al.*, 2009).

Apesar de ser a forma mais rara da doença (menos de 1% dos casos) (HOWLADER N, 2019; XING, 2013), o ATC é altamente agressivo e letal com sobrevida média de apenas seis meses, apresentando resistência à terapia convencional, rápido crescimento tumoral e metástases nos pulmões, ossos e cérebro (CABANILLAS; MCFADDEN; DURANTE, 2016; O'NEILL; SHAHA, 2013). Os carcinomas anaplásicos da tireoide podem surgir *de novo* ou progredir de carcinomas diferenciados através de eventos de desdiferenciação, como perda de expressão do receptor de TSH (TSHR), tiroglobulina (TG) e simportador sódio-iodo (NIS) (DAVIES; LATIF; MINSKY; MA, 2011). A perda de marcadores tireoidianos em ATC impõe um grande desafio para terapia, que é geralmente malsucedida (HADDAD; LYDIATT; BALL; BUSAIDY *et al.*, 2015).

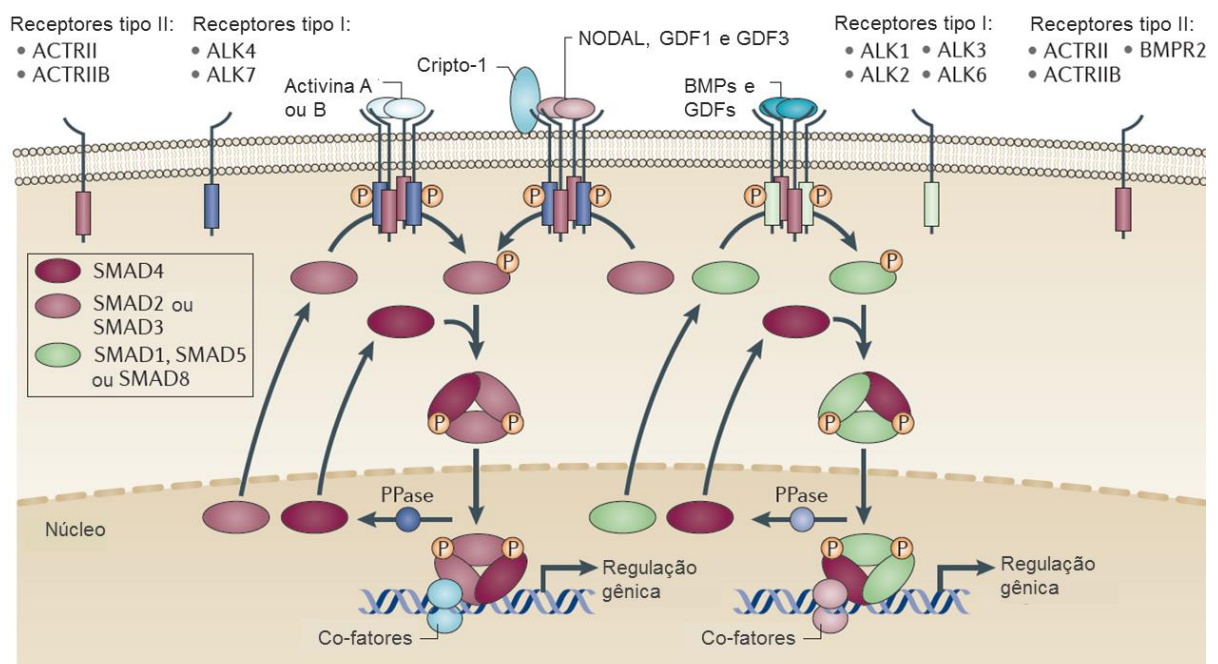
## 1.2 A superfamília TGF- $\beta$

A superfamília TGF- $\beta$  é bem conservada entre vertebrados e possui pelo menos 30 membros em humanos, que podem ser divididos nas subfamílias de ligantes TGF- $\beta$ s, activinas, NODAL, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fatores de crescimento e diferenciação (GDFs), e hormônio anti-Mulleriano (AMH) (WAKEFIELD; HILL, 2013). A família de genes TGF- $\beta$  exerce um grande e complexo papel no início do desenvolvimento embrionário, na biologia de células-tronco e no câncer, atuando em vários processos celulares como homeostase, diferenciação celular, adesão, proliferação e migração em diversos tipos celulares e contextos (HUANG; HUANG, 2005; MASSAGUE; BLAIN; LO, 2000; WATABE; MIYAZONO, 2009; WEISS; ATTISANO, 2013; WU; HILL, 2009).

Todas as proteínas da superfamília TGF- $\beta$  são sintetizadas como precursores, que devem ser clivados por convertases para gerar os ligantes maduros (HARRISON; AL-MUSAWI; WALTON, 2011). Estes, por sua vez, formam dímeros através de pontes dissulfeto e requerem dois tipos de receptores serina/treonina quinase para transmitir seu sinal: os receptores do tipo I e tipo II (HELDIN; MIYAZONO; TEN DIJKE, 1997; HELDIN; MOUSTAKAS, 2016). Após interação com os ligantes, o receptor tipo II fosforila e ativa o receptor tipo I, expondo sítios de ligação para substratos intracelulares à jusante na via de sinalização: as proteínas SMAD reguladas por receptores (R-SMADs). Tradicionalmente, BMPs e GDFs sinalizam através de SMAD1, 5 e 8, enquanto TGF- $\beta$ s, activinas e NODAL sinalizam por SMAD2 e 3 (Figura 2). R-SMADs são fosforiladas pelo complexo de receptor ativado e se associam a outro membro da família SMAD, SMAD4 (SHI; MASSAGUE, 2003). Os complexos SMAD se acumulam no núcleo onde regulam positiva ou negativamente a transcrição gênica, com ou sem o auxílio de outros fatores de transcrição (ROSS; HILL, 2008). A sinalização de SMADs é regulada pelas proteínas SMAD inibitórias (I-SMADs) SMAD6 e 7, as quais controlam os sinais de TGF- $\beta$ s através de feedback negativo (MASSAGUE, 1998; MOUSTAKAS; SOUCHELNYTSKYI; HELDIN, 2001; NAKAO; AFRAKHTE; MOREN; NAKAYAMA *et al.*, 1997). Os mecanismos de antagonismo das I-SMADs são variados, podendo: (i) ligar-se a R-SMADs e SMAD4 e prevenir sua ligação entre si; (ii) direcionar a degradação dos receptores (EBISAWA; FUKUCHI; MURAKAMI; CHIBA *et al.*, 2001; KAVSAK; RASMUSSEN; CAUSING; BONNI *et al.*, 2000); (iii) induzir a desfosforilação dos receptores (SHI; SUN;

HE; XIONG *et al.*, 2004); e (iv) impedir a ativação de promotores por complexos SMAD (ZHANG; FEI; ZHANG; ZHANG *et al.*, 2007).

As vias TGF- $\beta$  podem, ainda, ser moduladas em diferentes níveis por outras vias de sinalização. R-SMADS podem, por exemplo, ser fosforiladas por MAPKs, GSK3 $\beta$  e CDKs, afetando sua estabilidade e acúmulo no núcleo (MASSAGUE, 2012). Adicionalmente, quando ativados, receptores da via TGF- $\beta$  podem estimular outras vias de sinalização de maneira independente de SMADs, como as vias MAPK, NF $\kappa$ B e PI3K/Akt (MOUSTAKAS; HELDIN, 2005; ZHANG, 2017).



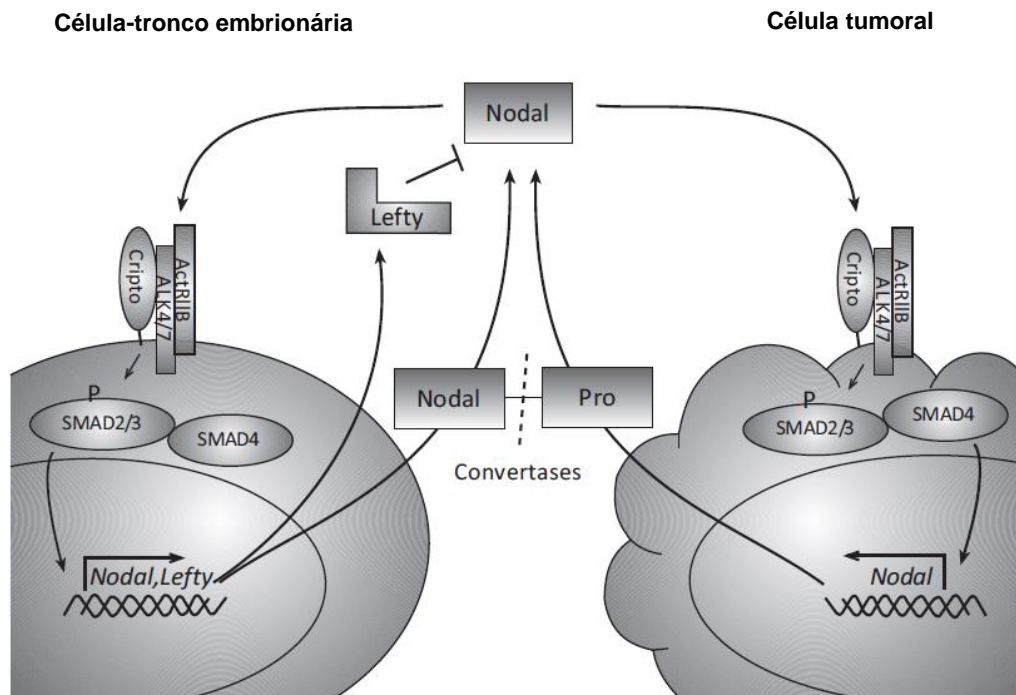
**Figura 2. Sinalização dos ligantes da superfamília TGF- $\beta$ .** O esquema mostra a via de sinalização canônica via SMADs para proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), activinas, NODAL, e fatores de crescimento e diferenciação (GDFs). A sinalização através de ligantes TGF- $\beta$  não é demonstrada. Cada ligante ativa uma combinação diferente de receptores tipo I e II, como indicado na figura. Sete receptores tipo I (ALK1-7) e cinco tipo II foram descritos em humanos. NODAL, GDF1 e GDF3 requerem a participação do co-receptor Cripto-1. Os receptores tipo I ditam quais SMADs reguladas por receptor (R-SMADs) são fosforiladas (P) em resposta a cada ligante. ALK1, ALK2, ALK3 e ALK6 fosforilam SMAD1, SMAD5 e SMAD8, enquanto ALK4, ALK5 e ALK7 fosforilam SMAD2 e SMAD3. A fosforilação de R-SMADs promove a formação de complexos com SMAD4 e subsequente acumulação no núcleo. O complexo SMAD interage com outros fatores de transcrição, co-ativadores ou co-repressores para regular a transcrição de genes alvo. PPase, fosfatase. Adaptado de (WAKEFIELD; HILL, 2013).

### 1.3 A via de sinalização Nodal

Um dos membros da família TGF- $\beta$  é o fator de crescimento e diferenciação NODAL, um morfógeno embrionário que possui papel crucial na indução do mesoderma e formação do eixo anterior-posterior durante a embriogênese, e na manutenção da pluripotência (MESNARD; GUZMAN-AYALA; CONSTAM, 2006; SCHIER, 2003). Já em tecidos adultos a expressão de NODAL está limitada a nichos específicos como a glândula mamária, células-tronco do fígado e células  $\beta$  pancreáticas (QUAIL; SIEGERS; JEWER; POSTOVIT, 2013).

Assim como todos os membros da família TGF- $\beta$ , NODAL é secretado como uma pró-proteína, de aproximadamente 37 kDa, que é geralmente clivada extracelularmente pelas convertases Furin e Pace4 (BECK; LE GOOD; GUZMAN; BEN HAIM *et al.*, 2002). A proteína madura resultante (aproximadamente 13 kDa) forma homodímeros para interagir com os receptores serina-treonina quinase tipo I, ALK4 ou ALK7, e do tipo II, ActRIIB, facilitada pelo co-receptor Cripto-1 (Figura 3) (SHEN; SCHIER, 2000). Apesar da sinalização Nodal geralmente requerer a participação de Cripto-1, sinais independentes do co-receptor têm sido descritos em embriões de camundongo (YEO; WHITMAN, 2001).

A interação dos receptores com NODAL promove a ativação dos receptores do tipo II por fosforilação, que por sua vez fosforilam as proteínas SMAD2/3. Estas se associam a SMAD4 e formam um complexo que é translocado para o núcleo e lá se acumula (SCHIER, 2003). No núcleo, o complexo SMAD interage com fatores de transcrição como FoxH1 e regulam a transcrição de genes alvo. A transdução de sinais mediados por NODAL tem importante participação do processo de endocitose (BLANCHET; LE GOOD; OORSCHOT; BAFLAST *et al.*, 2008). Inicialmente, NODAL e seu co-receptor Cripto são captados por endossomos primários que contêm o complexo de receptores ALK e a proteína estrutural SARA, que acopla os receptores ALK a moléculas SMAD (YAKYMOVYCH; YAKYMOVYCH; HELDIN, 2018). Dessa forma, pode-se dizer que endossomos agem como plataformas de sinalização que auxiliam a fosforilação de SMAD2/3 por receptores ativados por NODAL. Dentre os genes alvo induzidos pela sinalização Nodal estão os genes de pluripotência *NANOG* (VALLIER; MENDJAN; BROWN; CHNG *et al.*, 2009), *POU5F1* (*OCT4*), *SOX2* (PAUKLIN; VALLIER, 2015), e o próprio *NODAL*, criando, portanto, uma alça de *feedback* positivo (SCHIER, 2009), além de induzir a expressão de seu inibidor *Lefty*.



**Figura 3. A via de sinalização Nodal.** No meio extracelular, NODAL liga-se ao complexo de receptores do tipo I (ALK4/7) e tipo II (ActRIIB), levando à fosforilação e ativação de ALK4/7 por ActRIIB. O sinal desencadeado por NODAL é potencializado pelo co-receptor Cripto. Intracelularmente, ALK4/7 fosforila SMAD2/3, que, por sua vez, forma um complexo com SMAD4. O complexo de SMADs transloca para o núcleo, onde se associa com fatores de transcrição, como FOXH1, para propagar o sinal de NODAL. Alvos transcricionais dessa via incluem o próprio *NODAL* e o regulador negativo *LEFTY*, que inibe a ação de NODAL e Cripto. A proteína NODAL é sintetizada como pró-proteína, e clivada por convertases como Furin e Pace4 para gerar a proteína madura. Traduzido de Quail, Taylor & Postovit (2012).

Além de sinalizar através das proteínas SMADs, NODAL é capaz de ativar cascatas de sinalização independentes de SMAD, ainda que através de mecanismos não tão bem estudados. Uma exceção é a bem descrita ativação de p38 durante a especificação do endoderma visceral anterior (CLEMENTS; PERNAUTE; VELLA; RODRIGUEZ, 2011). Davies *et al.* (2005) descreveram a necessidade mútua das sinalizações SMAD e ERK para o processo de transição epitélio-mesênquima (EMT) induzido por TGF- $\beta$ 1 em queratinócitos malignos, e o receptor de TGF- $\beta$ 1 é capaz de ativar a via MAPK (LEE; PARDOUX; HALL; LEE *et al.*, 2007). Quail *et al.* (2014) demonstraram, ainda, que NODAL promove invasão e EMT através da ativação da via ERK1/2 em câncer de mama, e que esses efeitos são anulados mediante inibição da via com U0126, um inibidor de MEK1/2.

NODAL desempenha papéis paradoxicos em células-tronco pluripotentes, mantendo a pluripotência (VALLIER; ALEXANDER; PEDERSEN, 2005) enquanto

promove a indução do mesendoderma (ITOH; WATABE; MIYAZONO, 2014). Tendo em vista os vários e complexos papéis de NODAL, devemos considerar que a quantidade, duração e contexto do sinal são determinantes de como NODAL afeta a determinação celular, exigindo um conjunto intrincado de mecanismos regulatórios.

Em camundongo, a transcrição do gene *NODAL* é regulada em três regiões: nos *enhancers* (i) *left side-specific* (LSE), (ii) assimétrico (ASE), e (iii) *node-specific* (NDE) (NORRIS; ROBERTSON, 1999; SAIJOH; OKI; TANAKA; NAKAMURA *et al.*, 2005). O LSE e ASE estão envolvidos na autorregulação de *NODAL* através do fator de transcrição FOXH1, enquanto o NDE é responsivo à NOTCH (KREBS; IWAI; NONAKA; WELSH *et al.*, 2003; RAYA; KAWAKAMI; RODRIGUEZ-ESTEBAN; BUSCHER *et al.*, 2003). De fato, NOTCH4 regula a expressão de *NODAL* em células de melanoma humano (HARDY; KIRSCHMANN; SEFTOR; MARGARYAN *et al.*, 2010), sugerindo mecanismos similares de regulação transcricional entre humanos e camundongos. A transcrição de *NODAL* também pode ser regulada por mecanismos epigenéticos como metilação. O gene *NODAL* contém uma ilha CpG próxima ao sítio de iniciação da transcrição, e a metilação dessa região tem sido correlacionada com expressão gênica em células de melanoma (POSTOVIT; SEFTOR; SEFTOR; HENDRIX, 2007). Além disso, microRNAs (miRNAs) têm sido implicados na regulação pós-transcricional de *NODAL* durante o desenvolvimento de *zebrafish* (CHOI; GIRALDEZ; SCHIER, 2007), e Luo *et al.* (2012) demonstraram em modelos de trofoblasto que o miR-378a-5p tem como alvo a região 3' não traduzida (3'UTR) de *NODAL*, inibindo sua tradução.

Outros mecanismos de regulação da expressão de *NODAL* incluem controle da tradução, tráfico, processamento e modificações pós-traducionais da proteína. Uma modificação pós-traducional característica de membros da superfamília TGF- $\beta$  é a N-glicosilação (SCHWARZ; AEBI, 2011), que geralmente auxilia na estabilidade da proteína (MITRA; SINHA; RAMYA; SUROLIA, 2006). O pró-domínio de *NODAL*, posteriormente clivado para geração da proteína madura, é indicado como sítio preferencial dessas modificações, enquanto o ligante *NODAL* maduro não possui sítios de N-glicosilação. É sugerido que, após clivagem do pró-domínio N-glicosilado, *NODAL* maduro é rapidamente degradado (LE GOOD; JOUBIN; GIRALDEZ; BEN-HAIM *et al.*, 2005).

A sinalização Nodal é também regulada por Lefty, que age como inibidor endógeno ao se ligar diretamente à *NODAL* ou ao co-receptor Cripto e impedir a

formação do complexo ligante-receptor (CHEN; SHEN, 2004). A expressão de Lefty também pode ser regulada pela via de sinalização embrionária Wnt e Oct4 (TABIBZADEH; HEMMATI-BRIVANLOU, 2006). Além de Lefty, células-tronco embrionárias também secretam Cerberus, outra molécula solúvel extracelular que antagoniza a sinalização Nodal durante o desenvolvimento embrionário (PICCOLO; AGIUS; LEYNS; BHATTACHARYYA *et al.*, 1999), e ambos são responsáveis por inibir a expressão de NODAL em tecidos adultos saudáveis, em adição a mecanismos de silenciamento epigenético (DAHLE; KUMAR; KUEHN, 2010).

A expressão simultânea de agonistas e antagonistas da sinalização Nodal sugere que os sinais dessa via são finamente regulados durante o desenvolvimento embrionário. De fato, a regulação espaço-temporal da sinalização Nodal requer uma regulação precisa, uma vez que as células são sensíveis tanto à dose quanto duração dos sinais dessa via (ROBERTSON, 2014).

A reativação da expressão de NODAL tem sido reportada em vários tipos de câncer, como melanoma (TOPCZEWSKA; POSTOVIT; MARGARYAN; SAM *et al.*, 2006), câncer de mama (QUAIL; WALSH; ZHANG; FINDLAY *et al.*, 2012; QUAIL; ZHANG; WALSH; SIEGERS *et al.*, 2012), próstata (LAWRENCE; MARGARYAN; LOESSNER; COLLINS *et al.*, 2011; VO; KHAN, 2011) e gliomas (HUENG; LIN; HUANG; LIU *et al.*, 2011), e associada à diversas características tumorais como agressividade, plasticidade, proliferação, migração e invasão, EMT, angiogênese e características de células-tronco (Tabela 1) (QUAIL; SIEGERS; JEWER; POSTOVIT, 2013; QUAIL; ZHANG; FINDLAY; HESS *et al.*, 2014). Além disso, alguns estudos revelaram uma correlação negativa entre expressão de NODAL e grau de diferenciação (NING; WANG; GUO; LIU *et al.*, 2015). Em contrapartida, alguns trabalhos demonstram diminuição da proliferação e aumento de apoptose decorrentes dessa sinalização (XU; ZHONG; MUNIR; YANG *et al.*, 2004; ZHONG; XU; YE; LEE *et al.*, 2009).

Os mecanismos responsáveis pelo controle da expressão de NODAL no câncer ainda não estão bem elucidados, mas a expressão baixa ou inexistente do inibidor Lefty tem sido reportada em diversos tumores malignos, tanto em amostras de pacientes quanto em linhagens celulares (HENDRIX; SEFTOR; SEFTOR; KASEMEIER-KULESA *et al.*, 2007; PAPAGEORGIOU; NICHOLLS; WANG; LACKMANN *et al.*, 2009; POSTOVIT; MARGARYAN; SEFTOR; KIRSCHMANN *et al.*, 2008). Além disso, a expressão de NODAL também pode ser modulada por condições microambientais como pH e hipóxia, como demonstrado em câncer de mama e melanoma (QUAIL;

TAYLOR; POSTOVIT, 2012; QUAIL; TAYLOR; WALSH; DIETERS-CASTATOR *et al.*, 2011). Outro componente que regula expressão gênica são os miRNAs, que em diferentes tipos de câncer encontram-se altamente desregulados (RUPAIMOOLE; SLACK, 2017).

**Tabela 1.** Os efeitos pró- e anti-tumorigênicos de NODAL em diferentes tipos de câncer.

<b>Efeitos pró-tumorigênicos</b>	<b>Tipos de câncer</b>	<b>Referências</b>
Invasão e migração	Melanoma, próstata, pâncreas	Lee et al. (2010), Postovit et al. (2007), Topczewska et al. (2006), Lawrence et al. (2011), Lonardo et al. (2011), Vo et al. (2011)
Angiogênese	Melanoma, mama, GBM	Hardy et al. (2010), Quail et al. (2012), Hueng et al. (2011)
Proliferação e apoptose	GBM, endométrio, mama, hepatocelular, próstata	De Silva et al. (2012), Papageorgiou et al. (2009), Cavallari et al. (2013), Quail et al. (2012), Vo et al. (2011)
Características de célula-tronco	GBM, próstata, pâncreas, mama	De Silva et al. (2012), Lawrence et al. (2011), Lonardo et al. (2011)
EMT	Mama	Quail et al. (2014)
<b>Efeitos anti-tumorigênicos</b>		
Proliferação e apoptose	Ovário, mama	Xu et al. (2004), Zhong et al. (2009)
	GBM, glioblastoma.	

Os miRNAs são pequenos (aproximadamente 22 nucleotídeos) RNAs endógenos não-codificantes que agem como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica, inibindo a tradução de mRNAs alvos através do pareamento imperfeito com a 3'UTR (GREGORY; CHENDRIMADA; COOCH; SHIEKHATTAR, 2005). Por ser composto de poucas bases, um único miRNA é capaz de regular diversos mRNAs distintos, da mesma forma que diferentes miRNAs podem regular um único mRNA alvo (BRENNECKE; HIPFNER; STARK; RUSSELL *et al.*, 2003). Dessa maneira, miRNAs emergem como importantes moduladores de sinalização celular devido à sua ação pleiotrópica em mRNAs que compõem as mais diversas vias de



sinalização, podendo controlar processos biológicos como diferenciação celular, proliferação e apoptose e, assim, sua desregulação pode influenciar no processo tumorigênico.

O miRNA miR-302 modula negativamente o inibidor de NODAL, Lefty, em células-tronco embrionárias humanas (BARROSO-DELJESUS; LUCENA-AGUILAR; SANCHEZ; LIGERO *et al.*, 2011). Este miRNA pertence ao *cluster* miR-302-367, que abrange miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d e miR-367. Os membros do *cluster* têm sido extensamente estudados e relacionados à indução de pluripotência, e empregados na reprogramação de células tumorais a um estado semelhante à células-tronco embrionárias pluripotentes (LIN; CHANG; CHANG-LIN; LIN *et al.*, 2008). Em modelos de câncer *in vivo* e *in vitro*, o *cluster* miR-302-367 foi associado a proliferação celular, migração, invasão, pluripotência e angiogênese. A expressão diminuída do *cluster* miR-302-367 em câncer de cólon e melanoma revela um papel supressor tumoral, que foi reestabelecido pela superexpressão de miR-302abcd em linhagens celulares. Nesses modelos, a superexpressão do cluster reduziu a expressão de marcadores de angiogênese, invasão e metástase (MAADI; MOSHTAGHIAN; TAHA; MOWLA *et al.*, 2016). Outros trabalhos seminais em glioma reforçam o papel supressor tumoral do *cluster* miR-302-367 (FAREH; TURCHI; VIROLLE; DEBRUYNE *et al.*, 2012; YANG; CHIBA; BRILL; DELIS *et al.*, 2015). Em contrapartida, Guo *et al.* (2017) demonstraram que a expressão de miR-302-367 encontra-se aumentada em câncer de próstata, induzindo proliferação, migração, formação de esferas e acelerando o crescimento tumoral em modelo animal. Estes efeitos são mediados pela interferência na via de sinalização Hippo, através da inibição de LATS2 e consequente aumento da atividade pró-tumoral de YAP. Em relação à *NODAL*, existem vários potenciais sítios de ligação para diferentes miRNAs na região 3'UTR do gene. Ainda que pobremente conservados entre vertebrados, a grande maioria é conservada em primatas.

Apesar de a maior parte dos estudos associarem um papel pró-tumorigênico a *NODAL*, alguns trabalhos descrevem efeitos protetores decorrentes dessa sinalização, de modo que as particularidades do papel de *NODAL* devem ser estudadas em cada tipo específico de câncer. Além disso, a participação de miRNA na regulação da expressão de *NODAL* em câncer humano ainda permanece pouco esclarecida.

## 6 CONCLUSÕES

- i. A proteína NODAL é expressa no carcinoma papilífero de tireoide humano, mas não em carcinoma anaplásico;
- ii. Há uma discrepância entre os níveis de mRNA e proteína NODAL em linhagens de câncer de tireoide, fenômeno observado em outros tipos de câncer;
- iii. A superexpressão de *NODAL* não altera o perfil de expressão de genes de pluripotência e marcadores tiroidianos na linhagem TPC-1, enquanto o silenciamento parcial de *NODAL* aumenta a expressão de *SOX2* e *NIS* na mesma linhagem;
- iv. A superexpressão de *NODAL* diminui a proliferação celular da linhagem TPC-1;
- v. A modulação de *NODAL* não altera a sinalização de SMADs na linhagem TPC-1;
- vi. Os miRNAs miR-193 e miR-129-1 apresentam expressão reduzida no PTC comparado com amostra não-tumoral e podem estar relacionados ao aumento de NODAL observado via imunohistoquímica em amostras de PTC;
- vii. O estudo de Nodal exige ensaios e modelos mais avançados que abordem a heterogeneidade celular e complexidade do microambiente tumoral.

## REFERÊNCIAS\*

ACS. **Cancer Facts & Figures 2019**. Atlanta: American Cancer Society, 2019.

ADORNO-CRUZ, V.; KIBRIA, G.; LIU, X.; DOHERTY, M. *et al.* Cancer stem cells: targeting the roots of cancer, seeds of metastasis, and sources of therapy resistance. **Cancer Res**, 75, n. 6, p. 924-929, Mar 15 2015.

AGARWAL, V.; BELL, G. W.; NAM, J. W.; BARTEL, D. P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. **Elife**, 4, Aug 12 2015.

BARROSO-DELJESUS, A.; LUCENA-AGUILAR, G.; SANCHEZ, L.; LIGERO, G. *et al.* The Nodal inhibitor Lefty is negatively modulated by the microRNA miR-302 in human embryonic stem cells. **FASEB J**, 25, n. 5, p. 1497-1508, May 2011.

BECK, S.; LE GOOD, J. A.; GUZMAN, M.; BEN HAIM, N. *et al.* Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. **Nat Cell Biol**, 4, n. 12, p. 981-985, Dec 2002.

BLANCHET, M. H.; LE GOOD, J. A.; OORSCHOT, V.; BAFLAST, S. *et al.* Cripto localizes Nodal at the limiting membrane of early endosomes. **Sci Signal**, 1, n. 45, p. ra13, Nov 11 2008.

BRENNECKE, J.; HIPFNER, D. R.; STARK, A.; RUSSELL, R. B. *et al.* bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. **Cell**, 113, n. 1, p. 25-36, Apr 4 2003.

BYRD, J. K.; YAWN, R. J.; WILHOIT, C. S.; SORA, N. D. *et al.* Well differentiated thyroid carcinoma: current treatment. **Curr Treat Options Oncol**, 13, n. 1, p. 47-57, Mar 2012.

CABANILLAS, M. E.; MCFADDEN, D. G.; DURANTE, C. Thyroid cancer. **Lancet**, 388, n. 10061, p. 2783-2795, Dec 3 2016.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. **Cell**, 159, n. 3, p. 676-690, Oct 23 2014.

CAVALLARI, C.; FONSAO, V.; HERRERA, M. B.; BRUNO, S. *et al.* Role of Lefty in the anti tumor activity of human adult liver stem cells. **Oncogene**, 32, n. 7, p. 819-826, Feb 14 2013.

---

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

CHAI, Y. J.; KIM, Y. A.; JEE, H. G.; YI, J. W. *et al.* Expression of the embryonic morphogen Nodal in differentiated thyroid carcinomas: Immunohistochemistry assay in tissue microarray and The Cancer Genome Atlas data analysis. **Surgery**, 156, n. 6, p. 1559-1567; discussion 1567-1558, Dec 2014.

CHEN, C.; RIDZON, D. A.; BROOMER, A. J.; ZHOU, Z. *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, 33, n. 20, p. e179, Nov 27 2005.

CHEN, C.; SHEN, M. M. Two modes by which Lefty proteins inhibit nodal signaling. **Curr Biol**, 14, n. 7, p. 618-624, Apr 6 2004.

CHOI, W. Y.; GIRALDEZ, A. J.; SCHIER, A. F. Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430. **Science**, 318, n. 5848, p. 271-274, Oct 12 2007.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, 162, n. 1, p. 156-159, Apr 1987.

CLEMENTS, M.; PERNAUTE, B.; VELLA, F.; RODRIGUEZ, T. A. Crosstalk between Nodal/activin and MAPK p38 signaling is essential for anterior-posterior axis specification. **Curr Biol**, 21, n. 15, p. 1289-1295, Aug 9 2011.

DAHLE, O.; KUMAR, A.; KUEHN, M. R. Nodal signaling recruits the histone demethylase Jmjd3 to counteract polycomb-mediated repression at target genes. **Sci Signal**, 3, n. 127, p. ra48, Jun 22 2010.

DAVIES, M.; ROBINSON, M.; SMITH, E.; HUNTLEY, S. *et al.* Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF-beta1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways. **J Cell Biochem**, 95, n. 5, p. 918-931, Aug 1 2005.

DAVIES, T. F.; LATIF, R.; MINSKY, N. C.; MA, R. Clinical review: The emerging cell biology of thyroid stem cells. **J Clin Endocrinol Metab**, 96, n. 9, p. 2692-2702, Sep 2011.

DE SILVA, T.; YE, G.; LIANG, Y. Y.; FU, G. *et al.* Nodal promotes glioblastoma cell growth. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 3, p. 59, 2012.

DERYNCK, R.; AKHURST, R. J.; BALMAIN, A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nat Genet**, 29, n. 2, p. 117-129, Oct 2001.

DREMIER, S.; TATON, M.; COULONVAL, K.; NAKAMURA, T. *et al.* Mitogenic, dedifferentiating, and scattering effects of hepatocyte growth factor on dog thyroid cells. **Endocrinology**, 135, n. 1, p. 135-140, Jul 1994.

EBISAWA, T.; FUKUCHI, M.; MURAKAMI, G.; CHIBA, T. *et al.* Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. **J Biol Chem**, 276, n. 16, p. 12477-12480, Apr 20 2001.

ELSALINI, O. A.; VON GARTZEN, J.; CRAMER, M.; ROHR, K. B. Zebrafish *hhex*, *nk2.1a*, and *pax2.1* regulate thyroid growth and differentiation downstream of Nodal-dependent transcription factors. **Dev Biol**, 263, n. 1, p. 67-80, Nov 1 2003.

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.

FAREH, M.; TURCHI, L.; VIROLLE, V.; DEBRUYNE, D. *et al.* The miR 302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. **Cell Death Differ**, 19, n. 2, p. 232-244, Feb 2012.

FELDMAN, B.; GATES, M. A.; EGAN, E. S.; DOUGAN, S. T. *et al.* Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. **Nature**, 395, n. 6698, p. 181-185, Sep 10 1998.

FENG, X. H.; DERYNCK, R. Specificity and versatility in *tgf-beta* signaling through Smads. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 21, p. 659-693, 2005.

FIORE, A. P.; FUZIWARA, C. S.; KIMURA, E. T. High iodine concentration attenuates RET/PTC3 oncogene activation in thyroid follicular cells. **Thyroid**, 19, n. 11, p. 1249-1256, Nov 2009.

FUSCO, A.; GRIECO, M.; SANTORO, M.; BERLINGIERI, M. T. *et al.* A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. **Nature**, 328, n. 6126, p. 170-172, Jul 9-15 1987.

GERALDO, M. V. **Regulação da via de sinalização de TGF- $\beta$  pelo microRNA miR- 146b-5p no câncer de tireoide.** 2011. (PhD) - Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GONG, J.; AMMANAMANCHI, S.; KO, T. C.; BRATTAIN, M. G. Transforming growth factor beta 1 increases the stability of p21/WAF1/CIP1 protein and inhibits CDK2 kinase activity in human colon carcinoma FET cells. **Cancer Res**, 63, n. 12, p. 3340-3346, Jun 15 2003.

GONG, W.; SUN, B.; SUN, H.; ZHAO, X. *et al.* Nodal signaling activates the Smad2/3 pathway to regulate stem cell-like properties in breast cancer cells. **Am J Cancer Res**, 7, n. 3, p. 503-517, 2017.

GONG, Y.; GUO, Y.; HAI, Y.; YANG, H. *et al.* Nodal promotes the self-renewal of human colon cancer stem cells via an autocrine manner through Smad2/3 signaling pathway. **Biomed Res Int**, 2014, p. 364134, 2014.

GRANDE, M.; FRANZEN, A.; KARLSSON, J. O.; ERICSON, L. E. *et al.* Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes. **J Cell Sci**, 115, n. Pt 22, p. 4227-4236, Nov 15 2002.

GREGORY, R. I.; CHENDRIMADA, T. P.; COOCH, N.; SHIEKHATTAR, R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. **Cell**, 123, n. 4, p. 631-640, Nov 18 2005.

GRIECO, M.; SANTORO, M.; BERLINGIERI, M. T.; MELILLO, R. M. *et al.* PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. **Cell**, 60, n. 4, p. 557-563, Feb 23 1990.

GUO, Y.; CUI, J.; JI, Z.; CHENG, C. *et al.* miR-302/367/LATS2/YAP pathway is essential for prostate tumor-propagating cells and promotes the development of castration resistance. **Oncogene**, 36, n. 45, p. 6336-6347, Nov 9 2017.

HADDAD, R. I.; LYDIATT, W. M.; BALL, D. W.; BUSAIDY, N. L. *et al.* Anaplastic Thyroid Carcinoma, Version 2.2015. **J Natl Compr Canc Netw**, 13, n. 9, p. 1140-1150, Sep 2015.

HARDY, K. M.; KIRSCHMANN, D. A.; SEFTOR, E. A.; MARGARYAN, N. V. *et al.* Regulation of the embryonic morphogen Nodal by Notch4 facilitates manifestation of the aggressive melanoma phenotype. **Cancer Res**, 70, n. 24, p. 10340-10350, Dec 15 2010.

HARRISON, C. A.; AL-MUSAWI, S. L.; WALTON, K. L. Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF-beta superfamily ligands. **Growth Factors**, 29, n. 5, p. 174-186, Oct 2011.

HELDIN, C. H.; LANDSTROM, M.; MOUSTAKAS, A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. **Curr Opin Cell Biol**, 21, n. 2, p. 166-176, Apr 2009.

HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K.; TEN DIJKE, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature**, 390, n. 6659, p. 465-471, Dec 4 1997.

HELDIN, C. H.; MOUSTAKAS, A. Signaling Receptors for TGF-beta Family Members. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 8, n. 8, Aug 1 2016.

HENDRIX, M. J.; SEFTOR, E. A.; SEFTOR, R. E.; KASEMEIER-KULESA, J. *et al.* Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. **Nat Rev Cancer**, 7, n. 4, p. 246-255, Apr 2007.

HOEK, K. S.; EICHHOFF, O. M.; SCHLEGEL, N. C.; DOBBELING, U. *et al.* In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. **Cancer Res**, 68, n. 3, p. 650-656, Feb 1 2008.

HOWELL, G. M.; HODAK, S. P.; YIP, L. RAS mutations in thyroid cancer. **Oncologist**, 18, n. 8, p. 926-932, 2013.

HOWLADER N, N. A., Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). **SEER Cancer**

**Statistics Review, 1975-2016.** Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2019. Disponível em: [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2016/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/). Acesso em: 9/25/2019.

HUANG, S. S.; HUANG, J. S. TGF-beta control of cell proliferation. **J Cell Biochem**, 96, n. 3, p. 447-462, Oct 15 2005.

HUENG, D. Y.; LIN, G. J.; HUANG, S. H.; LIU, L. W. *et al.* Inhibition of Nodal suppresses angiogenesis and growth of human gliomas. **J Neurooncol**, 104, n. 1, p. 21-31, Aug 2011.

IKUSHIMA, H.; MIYAZONO, K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, 10, n. 6, p. 415-424, Jun 2010.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil.** . Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA), 2018. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>. Acesso em: 9/25/2019.

ISHIZAKA, Y.; ITOH, F.; TAHIRA, T.; IKEDA, I. *et al.* Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. **Oncogene**, 4, n. 12, p. 1519-1521, Dec 1989.

ITOH, F.; WATABE, T.; MIYAZONO, K. Roles of TGF-beta family signals in the fate determination of pluripotent stem cells. **Semin Cell Dev Biol**, 32, p. 98-106, Aug 2014.

JEWER, M.; LEE, L.; ZHANG, G.; LIU, J. *et al.* Translational control of breast cancer plasticity. **bioRxiv**, 2019 (preprint).

KAVSAK, P.; RASMUSSEN, R. K.; CAUSING, C. G.; BONNI, S. *et al.* Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. **Mol Cell**, 6, n. 6, p. 1365-1375, Dec 2000.

KIMURA, E. T.; KOPP, P.; ZBAEREN, J.; ASMIS, L. M. *et al.* Expression of transforming growth factor beta1, beta2, and beta3 in multinodular goiters and differentiated thyroid carcinomas: a comparative study. **Thyroid**, 9, n. 2, p. 119-125, Feb 1999.

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.

KNAUF, J. A.; KURODA, H.; BASU, S.; FAGIN, J. A. RET/PTC-induced dedifferentiation of thyroid cells is mediated through Y1062 signaling through SHC-RAS-MAP kinase. **Oncogene**, 22, n. 28, p. 4406-4412, Jul 10 2003.

KONDO, T.; EZZAT, S.; ASA, S. L. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. **Nat Rev Cancer**, 6, n. 4, p. 292-306, Apr 2006.

KREBS, L. T.; IWAI, N.; NONAKA, S.; WELSH, I. C. *et al.* Notch signaling regulates left-right asymmetry determination by inducing Nodal expression. **Genes Dev**, 17, n. 10, p. 1207-1212, May 15 2003.

LAWRENCE, M. G.; MARGARYAN, N. V.; LOESSNER, D.; COLLINS, A. *et al.* Reactivation of embryonic nodal signaling is associated with tumor progression and promotes the growth of prostate cancer cells. **Prostate**, 71, n. 11, p. 1198-1209, Aug 1 2011.

LE GOOD, J. A.; JOUBIN, K.; GIRALDEZ, A. J.; BEN-HAIM, N. *et al.* Nodal stability determines signaling range. **Curr Biol**, 15, n. 1, p. 31-36, Jan 11 2005.

LEE, C. C.; JAN, H. J.; LAI, J. H.; MA, H. I. *et al.* Nodal promotes growth and invasion in human gliomas. **Oncogene**, 29, n. 21, p. 3110-3123, May 27 2010.

LEE, M. K.; PARDOUX, C.; HALL, M. C.; LEE, P. S. *et al.* TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. **EMBO J**, 26, n. 17, p. 3957-3967, Sep 5 2007.

LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, 120, n. 1, p. 15-20, Jan 14 2005.

LIN, S. L.; CHANG, D. C.; CHANG-LIN, S.; LIN, C. H. *et al.* Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. **RNA**, 14, n. 10, p. 2115-2124, Oct 2008.

LIU, G.; TAKANO, T.; AMINO, N. TGF-beta 1 inhibits the cell proliferation stimulated by IGF-I by blocking the tyrosine phosphorylation of 175kDa substrate. **Endocr Res**, 22, n. 3, p. 277-287, Aug 1996.

LONARDO, E.; HERMANN, P. C.; MUELLER, M. T.; HUBER, S. *et al.* Nodal/Activin signaling drives self-renewal and tumorigenicity of pancreatic cancer stem cells and provides a target for combined drug therapy. **Cell Stem Cell**, 9, n. 5, p. 433-446, Nov 4 2011.

LUO, L.; YE, G.; NADEEM, L.; FU, G. *et al.* MicroRNA-378a-5p promotes trophoblast cell survival, migration and invasion by targeting Nodal. **J Cell Sci**, 125, n. Pt 13, p. 3124-3132, Jul 1 2012.

MAADI, H.; MOSHTAGHIAN, A.; TAHA, M. F.; MOWLA, S. J. *et al.* Multimodal tumor suppression by miR-302 cluster in melanoma and colon cancer. **Int J Biochem Cell Biol**, 81, n. Pt A, p. 121-132, Dec 2016.

MACIEL, R. M.; KIMURA, E. T.; TAKAHASKI, M. H.; LOPES, M. H. *et al.* Insulin-Like Growth Factor I in Human Thyroid Tissue: Specific Localization by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. **Endocr Pathol**, 6, n. 3, p. 207-215, Autumn 1995.



MASSAGUE, J. TGF-beta signal transduction. **Annu Rev Biochem**, 67, p. 753-791, 1998.

MASSAGUE, J. TGFbeta signalling in context. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 13, n. 10, p. 616-630, Oct 2012.

MASSAGUE, J.; BLAIN, S. W.; LO, R. S. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. **Cell**, 103, n. 2, p. 295-309, Oct 13 2000.

MATSUO, S. E.; EBINA, K. N.; KULCSAR, M. A.; FRIGUGLIETTI, C. U. *et al.* Activin betaB expression in rat experimental goiter and human thyroid tumors. **Thyroid**, 13, n. 3, p. 239-247, Mar 2003.

MATSUO, S. E.; FIORE, A. P.; SIGUEMATU, S. M.; EBINA, K. N. *et al.* Expression of SMAD proteins, TGF-beta/activin signaling mediators, in human thyroid tissues. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 54, n. 4, p. 406-412, Jun 2010.

MATSUO, S. E.; LEONI, S. G.; COLQUHOUN, A.; KIMURA, E. T. Transforming growth factor-beta1 and activin A generate antiproliferative signaling in thyroid cancer cells. **J Endocrinol**, 190, n. 1, p. 141-150, Jul 2006.

MATSUO, S. E.; MARTINS, L.; LEONI, S. G.; HAJJAR, D. *et al.* [Biological markers in thyroid tumors]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 48, n. 1, p. 114-125, Feb 2004.

MESNARD, D.; GUZMAN-AYALA, M.; CONSTAM, D. B. Nodal specifies embryonic visceral endoderm and sustains pluripotent cells in the epiblast before overt axial patterning. **Development**, 133, n. 13, p. 2497-2505, Jul 2006.

MINCIONE, G.; ESPOSITO, D. L.; DI MARCANTONIO, M. C.; PICCIRELLI, A. *et al.* TGF-beta 1 modulation of IGF-I signaling pathway in rat thyroid epithelial cells. **Exp Cell Res**, 287, n. 2, p. 411-423, Jul 15 2003.

MITRA, N.; SINHA, S.; RAMYA, T. N.; SUROLIA, A. N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. **Trends Biochem Sci**, 31, n. 3, p. 156-163, Mar 2006.

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.

MOCHIZUKI, K.; KONDO, T.; NAKAZAWA, T.; IWASHINA, M. *et al.* RET rearrangements and BRAF mutation in undifferentiated thyroid carcinomas having papillary carcinoma components. **Histopathology**, 57, n. 3, p. 444-450, Sep 2010.

MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C. H. Non-Smad TGF-beta signals. **J Cell Sci**, 118, n. Pt 16, p. 3573-3584, Aug 15 2005.

MOUSTAKAS, A.; SOUCHELNYTSKYI, S.; HELDIN, C. H. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. **J Cell Sci**, 114, n. Pt 24, p. 4359-4369, Dec 2001.

NAKAO, A.; AFRAKHTE, M.; MOREN, A.; NAKAYAMA, T. *et al.* Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. **Nature**, 389, n. 6651, p. 631-635, Oct 9 1997.

NAKAZAWA, T.; KONDO, T.; KOBAYASHI, Y.; TAKAMURA, N. *et al.* RET gene rearrangements (RET/PTC1 and RET/PTC3) in papillary thyroid carcinomas from an iodine-rich country (Japan). **Cancer**, 104, n. 5, p. 943-951, Sep 1 2005.

NAMBA, H.; GUTMAN, R. A.; MATSUO, K.; ALVAREZ, A. *et al.* H-ras protooncogene mutations in human thyroid neoplasms. **J Clin Endocrinol Metab**, 71, n. 1, p. 223-229, Jul 1990.

NAMBA, H.; NAKASHIMA, M.; HAYASHI, T.; HAYASHIDA, N. *et al.* Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. **J Clin Endocrinol Metab**, 88, n. 9, p. 4393-4397, Sep 2003.

NIKIFOROV, Y. E. Molecular diagnostics of thyroid tumors. **Arch Pathol Lab Med**, 135, n. 5, p. 569-577, May 2011.

NIKIFOROV, Y. E.; NIKIFOROVA, M. N. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. **Nat Rev Endocrinol**, 7, n. 10, p. 569-580, Aug 30 2011.

NIKIFOROV, Y. E.; ROWLAND, J. M.; BOVE, K. E.; MONFORTE-MUNOZ, H. *et al.* Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. **Cancer Res**, 57, n. 9, p. 1690-1694, May 1 1997.

NIKIFOROVA, M. N.; WALD, A. I.; ROY, S.; DURSO, M. B. *et al.* Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. **J Clin Endocrinol Metab**, 98, n. 11, p. E1852-1860, Nov 2013.

NILSSON, M.; DAHLMAN, T.; WESTERMARK, B.; WESTERMARK, K. Transforming growth factor-beta promotes epidermal growth factor-induced thyroid cell migration and follicle neof ormation in collagen gel separable from cell proliferation. **Exp Cell Res**, 220, n. 2, p. 257-265, Oct 1995.

NILSSON, M.; FAGMAN, H. Development of the thyroid gland. **Development**, 144, n. 12, p. 2123-2140, Jun 15 2017.

NING, F.; WANG, H. F.; GUO, Q.; LIU, Z. C. *et al.* Expression and significance of Nodal in human cancers: a meta-analysis. **Int J Clin Exp Med**, 8, n. 11, p. 20227-20235, 2015.

NORRIS, D. P.; ROBERTSON, E. J. Asymmetric and node-specific nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements. **Genes Dev**, 13, n. 12, p. 1575-1588, Jun 15 1999.

O'NEILL, J. P.; SHAHA, A. R. Anaplastic thyroid cancer. **Oral Oncol**, 49, n. 7, p. 702-706, Jul 2013.

PAPAGEORGIU, I.; NICHOLLS, P. K.; WANG, F.; LACKMANN, M. *et al.* Expression of nodal signalling components in cycling human endometrium and in endometrial cancer. **Reprod Biol Endocrinol**, 7, p. 122, Oct 29 2009.

PAUKLIN, S.; VALLIER, L. Activin/Nodal signalling in stem cells. **Development**, 142, n. 4, p. 607-619, Feb 15 2015.

PICCOLO, S.; AGIUS, E.; LEYNS, L.; BHATTACHARYYA, S. *et al.* The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. **Nature**, 397, n. 6721, p. 707-710, Feb 25 1999.

PISAREV, M. A.; THOMASZ, L.; JUVENAL, G. J. Role of transforming growth factor beta in the regulation of thyroid function and growth. **Thyroid**, 19, n. 8, p. 881-892, Aug 2009.

POSTOVIT, L. M.; MARGARYAN, N. V.; SEFTOR, E. A.; KIRSCHMANN, D. A. *et al.* Human embryonic stem cell microenvironment suppresses the tumorigenic phenotype of aggressive cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 11, p. 4329-4334, Mar 18 2008.

POSTOVIT, L. M.; SEFTOR, E. A.; SEFTOR, R. E.; HENDRIX, M. J. Targeting Nodal in malignant melanoma cells. **Expert Opin Ther Targets**, 11, n. 4, p. 497-505, Apr 2007.

POWELL, D. J., Jr.; RUSSELL, J.; NIBU, K.; LI, G. *et al.* The RET/PTC3 oncogene: metastatic solid-type papillary carcinomas in murine thyroids. **Cancer Res**, 58, n. 23, p. 5523-5528, Dec 1 1998.

QUAIL, D. F.; SIEGERS, G. M.; JEWER, M.; POSTOVIT, L. M. Nodal signalling in embryogenesis and tumourigenesis. **Int J Biochem Cell Biol**, 45, n. 4, p. 885-898, Apr 2013.

QUAIL, D. F.; TAYLOR, M. J.; POSTOVIT, L. M. Microenvironmental regulation of cancer stem cell phenotypes. **Curr Stem Cell Res Ther**, 7, n. 3, p. 197-216, May 2012.

QUAIL, D. F.; TAYLOR, M. J.; WALSH, L. A.; DIETERS-CASTATOR, D. *et al.* Low oxygen levels induce the expression of the embryonic morphogen Nodal. **Mol Biol Cell**, 22, n. 24, p. 4809-4821, Dec 2011.

QUAIL, D. F.; WALSH, L. A.; ZHANG, G.; FINDLAY, S. D. *et al.* Embryonic protein nodal promotes breast cancer vascularization. **Cancer Res**, 72, n. 15, p. 3851-3863, Aug 1 2012.

QUAIL, D. F.; ZHANG, G.; FINDLAY, S. D.; HESS, D. A. *et al.* Nodal promotes invasive phenotypes via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. **Oncogene**, 33, n. 4, p. 461-473, Jan 23 2014.

QUAIL, D. F.; ZHANG, G.; WALSH, L. A.; SIEGERS, G. M. *et al.* Embryonic morphogen nodal promotes breast cancer growth and progression. **PLoS One**, 7, n. 11, p. e48237, 2012.

RAYA, A.; KAWAKAMI, Y.; RODRIGUEZ-ESTEBAN, C.; BUSCHER, D. *et al.* Notch activity induces Nodal expression and mediates the establishment of left-right asymmetry in vertebrate embryos. **Genes Dev**, 17, n. 10, p. 1213-1218, May 15 2003.

RICARTE-FILHO, J. C.; RYDER, M.; CHITALE, D. A.; RIVERA, M. *et al.* Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. **Cancer Res**, 69, n. 11, p. 4885-4893, Jun 1 2009.

ROBERTSON, E. J. Dose-dependent Nodal/Smad signals pattern the early mouse embryo. **Semin Cell Dev Biol**, 32, p. 73-79, Aug 2014.

ROMEI, C.; CIAMPI, R.; FAVIANA, P.; AGATE, L. *et al.* BRAFV600E mutation, but not RET/PTC rearrangements, is correlated with a lower expression of both thyroperoxidase and sodium iodide symporter genes in papillary thyroid cancer. **Endocr Relat Cancer**, 15, n. 2, p. 511-520, Jun 2008.

ROMEI, C.; ELISEI, R. RET/PTC Translocations and Clinico-Pathological Features in Human Papillary Thyroid Carcinoma. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 3, p. 54, 2012.

ROSS, S.; HILL, C. S. How the Smads regulate transcription. **Int J Biochem Cell Biol**, 40, n. 3, p. 383-408, 2008.

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.

SAAD, A.; FALCIGLIA, M.; STEWARD, D. L.; NIKIFOROV, Y. E. Amiodarone-induced thyrotoxicosis and thyroid cancer: clinical, immunohistochemical, and molecular genetic studies of a case and review of the literature. **Arch Pathol Lab Med**, 128, n. 7, p. 807-810, Jul 2004.

SAIJOH, Y.; OKI, S.; TANAKA, C.; NAKAMURA, T. *et al.* Two nodal-responsive enhancers control left-right asymmetric expression of Nodal. **Dev Dyn**, 232, n. 4, p. 1031-1036, Apr 2005.

SCHIER, A. F. Nodal signaling in vertebrate development. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 19, p. 589-621, 2003.

SCHIER, A. F. Nodal morphogens. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 1, n. 5, p. a003459, Nov 2009.

SCHWARZ, F.; AEBI, M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. **Curr Opin Struct Biol**, 21, n. 5, p. 576-582, Oct 2011.

SHEN, M. M.; SCHIER, A. F. The EGF-CFC gene family in vertebrate development. **Trends Genet**, 16, n. 7, p. 303-309, Jul 2000.

SHI, W.; SUN, C.; HE, B.; XIONG, W. *et al.* GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. **J Cell Biol**, 164, n. 2, p. 291-300, Jan 19 2004.

SHI, Y.; MASSAGUE, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell**, 113, n. 6, p. 685-700, Jun 13 2003.

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

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

SOARES, P.; TROVISCO, V.; ROCHA, A. S.; LIMA, J. *et al.* BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. **Oncogene**, 22, n. 29, p. 4578-4580, Jul 17 2003.

STRIZZI, L.; HARDY, K. M.; KIRSCHMANN, D. A.; AHRLUND-RICHTER, L. *et al.* Nodal expression and detection in cancer: experience and challenges. **Cancer Res**, 72, n. 8, p. 1915-1920, Apr 15 2012.

SUGG, S. L.; EZZAT, S.; ROSEN, I. B.; FREEMAN, J. L. *et al.* Distinct multiple RET/PTC gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia. **J Clin Endocrinol Metab**, 83, n. 11, p. 4116-4122, Nov 1998.

SUTHERLAND, R. M.; MCCREDIE, J. A.; INCH, W. R. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. **J Natl Cancer Inst**, 46, n. 1, p. 113-120, Jan 1971.

TABIBZADEH, S.; HEMMATI-BRIVANLOU, A. Lefty at the crossroads of "stemness" and differentiative events. **Stem Cells**, 24, n. 9, p. 1998-2006, Sep 2006.

TAKANO, T.; AMINO, N. Fetal cell carcinogenesis: a new hypothesis for better understanding of thyroid carcinoma. **Thyroid**, 15, n. 5, p. 432-438, May 2005.

TALLINI, G.; ASA, S. L. RET oncogene activation in papillary thyroid carcinoma. **Adv Anat Pathol**, 8, n. 6, p. 345-354, Nov 2001.

TOPCZEWSKA, J. M.; POSTOVIT, L. M.; MARGARYAN, N. V.; SAM, A. *et al.* Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. **Nat Med**, 12, n. 8, p. 925-932, Aug 2006.

VALLIER, L.; ALEXANDER, M.; PEDERSEN, R. A. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. **J Cell Sci**, 118, n. Pt 19, p. 4495-4509, Oct 1 2005.

VALLIER, L.; MENDJAN, S.; BROWN, S.; CHNG, Z. *et al.* Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. **Development**, 136, n. 8, p. 1339-1349, Apr 2009.

VINCI, M.; GOWAN, S.; BOXALL, F.; PATTERSON, L. *et al.* Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. **BMC Biol**, 10, p. 29, Mar 22 2012.

VO, B. T.; KHAN, S. A. Expression of nodal and nodal receptors in prostate stem cells and prostate cancer cells: autocrine effects on cell proliferation and migration. **Prostate**, 71, n. 10, p. 1084-1096, Jul 2011.

WAKEFIELD, L. M.; HILL, C. S. Beyond TGFbeta: roles of other TGFbeta superfamily members in cancer. **Nat Rev Cancer**, 13, n. 5, p. 328-341, May 2013.

WATABE, T.; MIYAZONO, K. Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. **Cell Res**, 19, n. 1, p. 103-115, Jan 2009.

WEISS, A.; ATTISANO, L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, 2, n. 1, p. 47-63, Jan-Feb 2013.

WU, M. Y.; HILL, C. S. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. **Dev Cell**, 16, n. 3, p. 329-343, Mar 2009.

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

XU, G.; ZHONG, Y.; MUNIR, S.; YANG, B. B. *et al.* Nodal induces apoptosis and inhibits proliferation in human epithelial ovarian cancer cells via activin receptor-like kinase 7. **J Clin Endocrinol Metab**, 89, n. 11, p. 5523-5534, Nov 2004.

YAKYMOVYCH, I.; YAKYMOVYCH, M.; HELDIN, C. H. Intracellular trafficking of transforming growth factor beta receptors. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, 50, n. 1, p. 3-11, Jan 1 2018.

YANG, C. M.; CHIBA, T.; BRILL, B.; DELIS, N. *et al.* Expression of the miR-302/367 cluster in glioblastoma cells suppresses tumorigenic gene expression patterns and abolishes transformation related phenotypes. **Int J Cancer**, 137, n. 10, p. 2296-2309, Nov 15 2015.

YEO, C.; WHITMAN, M. Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms. **Mol Cell**, 7, n. 5, p. 949-957, May 2001.

YOO, Y. D.; CHOI, J. Y.; LEE, S. J.; KIM, J. S. *et al.* TGF-beta-induced cell-cycle arrest through the p21(WAF1/CIP1)-G1 cyclin/Cdks-p130 pathway in gastric-carcinoma cells. **Int J Cancer**, 83, n. 4, p. 512-517, Nov 12 1999.

ZAWEL, L.; DAI, J. L.; BUCKHAULTS, P.; ZHOU, S. *et al.* Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. **Mol Cell**, 1, n. 4, p. 611-617, Mar 1998.

ZHANG, S.; FEI, T.; ZHANG, L.; ZHANG, R. *et al.* Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation. **Mol Cell Biol**, 27, n. 12, p. 4488-4499, Jun 2007.

ZHANG, Y. E. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF-beta Family. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 9, n. 2, Feb 1 2017.

ZHONG, Y.; XU, G.; YE, G.; LEE, D. *et al.* Nodal and activin receptor-like kinase 7 induce apoptosis in human breast cancer cell lines: Role of caspase 3. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol**, 1, n. 1, p. 83-96, Feb 27 2009.