

Cesar Seigi Fuziwara

**O *cluster de microRNAs miR-17-92* e seus alvos na
oncogênese tiroidiana: influência de
BRAF^{T1799A} e de iodo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo para
obtenção de Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Edna Teruko Kimura

Versão Original

São Paulo
2014

RESUMO

Fuziwara CS. O *cluster* de microRNAs *miR-17-92* e seus alvos na oncogênese tiroidiana: influência de *BRAF*^{T1799A} e de iodo [tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

O iodo é um importante regulador da função tiroidiana, sendo que seu excesso inibe a proliferação celular e secreção hormonal. Alta dose de iodo é utilizada como medida profilática para proteger a tireoide contra os efeitos genotóxicos do iodo radioativo em caso de acidente nuclear. *In vitro*, alta concentração de iodo retarda os efeitos oncogênicos da ativação de *RET/PTC3* em células foliculares tiroidianas, entretanto o papel do iodo durante a ativação do oncogene *BRAF* permanece pouco esclarecido. A mutação em *BRAF* (T1799A) é o evento genético mais prevalente no câncer de tireoide, encontrada em tumores mais agressivos e de pior prognóstico clínico. Modelo de animal transgênico para *BRAF* desenvolve o câncer de tireoide que progride para histotipo pouco diferenciado e agressivo. Altos níveis de microRNAs (miRNAs) *miR-17-5p*, *miR-17-3p*, *miR-18a*, *miR-19a*, *miR-19b* e *miR-92*, componentes do *cluster miR-17-92*, estão associados a histotipos tumorais agressivos de câncer de tireoide, pulmão e linfoma. Os miRNAs, pequenos RNAs endógenos não codificantes, modulam tumorigênese por regular de forma pós-transcricional a tradução de mRNAs alvo em diversas vias de sinalização oncogênicas. Neste estudo, avaliamos a influência da alta dose de iodo (10^{-5} M NaI) na expressão dos miRNAs frente ativação do oncogene *BRAF* e seus efeitos na biologia da célula folicular tiroidiana. qPCR foi utilizado para quantificar a expressão do *cluster miR-17-92*, ensaio de western-blotting foi utilizado para avaliar a expressão de proteínas da via de sinalização de TGF β e o tratamento com TGF β recombinante para avaliar a responsividade desta via. Análise *in silico* foi utilizada na busca de alvos potenciais e como base na construção de plasmídeo repórter para avaliar a interação de *miR-19* e o mRNA de *Smad4*, além de direcionar o estudo do papel da via de sinalização Notch na regulação de *miR-17-92*. Como resultado, observamos que a indução aguda de *BRAF*^{T1799A} (Dox) ativa o *cluster miR-17-92* em células foliculares tiroidianas, resultando em aumento de 85,8 vezes; 634,3 vezes e 141,6 vezes em *miR-19a*, *miR-19b* e *miR-18a*, respectivamente, comparados com o controle (Ctr). O tratamento prévio com iodo (Dox+NaI) resultou em reversão parcial ou bloqueio completo deste efeito, com expressão de *miR-18a*, *miR-19a* e *miR-19b* em 2,7 vezes; 2,36 vezes e 0,66 vezes em relação ao grupo Ctr, respectivamente. O mRNA de *Smad4* apresenta sítios para interação *miR-19* na região 3'-UTR que foram validados por ensaio de gene repórter e Western-blotting. A redução de *Smad4* no câncer de tireoide induzida por *BRAF* resulta em perda de responsividade ao sinal de TGF β , efeito revertido pelo tratamento com alta dose de iodo ou *antimiR-19*. Demonstramos que ativação de *miR-17-92* por *BRAF* é mediada pela via de sinalização Notch, e que o iodo bloqueia este efeito. Estes resultados indicam que o iodo exerce efeito protetor na célula folicular tiroidiana durante a indução de *BRAF*^{T1799A}, revertendo a ativação dos miRNAs oncogênicos do *cluster miR-17-92* e restaurando os níveis protéicos de *Smad4* por interferir na via de sinalização Notch.

Palavras-chave: Iodo. Câncer de tireoide. MicroRNA. *miR-17-92*. *BRAF*. *Smad4*. Notch.

ABSTRACT

Fuziwara CS. The cluster of microRNAs miR-17-92 and its targets in thyroid oncogenesis: the influence of *BRAF*^{T1799A} and iodine [thesis (PhD in Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Iodine is an important regulator of thyroid function, and excessive concentrations lead to cell proliferation inhibition and hormone synthesis blockage. High dose iodine is used as a prophylactic measure to protect thyroid gland from genotoxic effects of radioactive iodine in case of nuclear accident. *In vitro*, high concentration iodine delays oncogenic effects of *RET/PTC3* activation in thyroid follicular cells, however the role of iodine during *BRAF* oncogene activation remains elusive. *BRAF* mutation (T1799A) is the most prevalent genetic alteration in thyroid cancer, found in more aggressive tumors with poor prognosis. Transgenic mice model for *BRAF* develops thyroid cancer that progress to poor differentiated aggressive histotypes. High levels of microRNAs (miRNAs) *miR-17-5p*, *miR-17-3p*, *miR-18a*, *miR-19a*, *miR-19b* e *miR-92*, components of *miR-17-92*, are associated to aggressive cancers of thyroid gland, lung and lymphoma. miRNA, small non-coding RNAs, modulate tumorigenesis by regulating post-transcriptionally target mRNAs translation of oncogenic signaling pathways. In this study, we evaluated the influence of high dose iodine (10⁻⁵M NaI) in the expression of miRNAs under *BRAF* oncogene activation, and its effects in thyroid follicular cell biology. qPCR was used to quantify *miR-17-92 cluster*, western-blotting was used to measure TGFβ signaling pathway protein expression, and signaling activation was analyzed by recombinant TGFβ treatment. *In silico* analysis was used in target search and as basis for the construction of reporter plasmid for validation of *miR-19/Smad4* mRNA interaction, and Notch signaling regulation over *miR-17-92* transcription. As result, we observed that acute *BRAF*^{T1799AA} (Dox) induction activates cluster *miR-17-92*, with a increase of 85.8-fold; 634.3-fold and 141.6-fold in *miR-19a*, *miR-19b* and *miR-18a*, respectively, compared to control. High iodine treatment prior to *BRAF* induction (Dox+NaI) resulted in complete or partial blockage of this effect with 2.7-fold; 2.36-fold and 0.66-fold expression compared to control. *Smad4* mRNA displays predicted sites for interaction with *miR-19* that were validated by luciferase reporter assay and western-blotting. *BRAF*-induced *Smad4* reduction in thyroid cancer leads to loss of responsiveness to TGFβ, effect reverted by high iodine or *antimiR-19* treatment. *BRAF*-induced *miR-17-92* expression is mediated by Notch signaling that is blocked by high iodine. These results indicate that iodine exerts a protective role in thyroid follicular cell during *BRAF*^{T1799A} induction, blocking activation of oncogenic miRNA *miR-17-92*, and maintaining *Smad4* levels through modulation of Notch signaling.

Keywords: Iodine. Thyroid cancer. MicroRNA. miR-17-92. *BRAF*. *Smad4*. Notch

1 INTRODUÇÃO

Os microRNAs (miRNAs) são importantes reguladores da expressão proteica uma vez que inibem o processo de tradução através do pareamento imperfeito com a região 3'-UTR de mRNAs alvo, em um mecanismo pós-transcricional (Gregory et al., 2005). Apesar de seu pequeno tamanho, ~20 nt, estes RNAs endógenos não codificantes exercem potente efeito sobre diferentes vias de sinalização associadas ao controle da proliferação, apoptose e sobrevivência celular, e assim, sua desregulação influencia o processo tumorigênico.

No câncer, a desregulação na expressão de microRNAs é oncogênica (oncomiRs) quando: i) o aumento da expressão do miRNA inibe a tradução de um gene supressor tumoral ou ii) a diminuição de um miRNA induz a tradução de um oncogene (Esquela-Kerscher, Slack, 2006) (Figura 1).

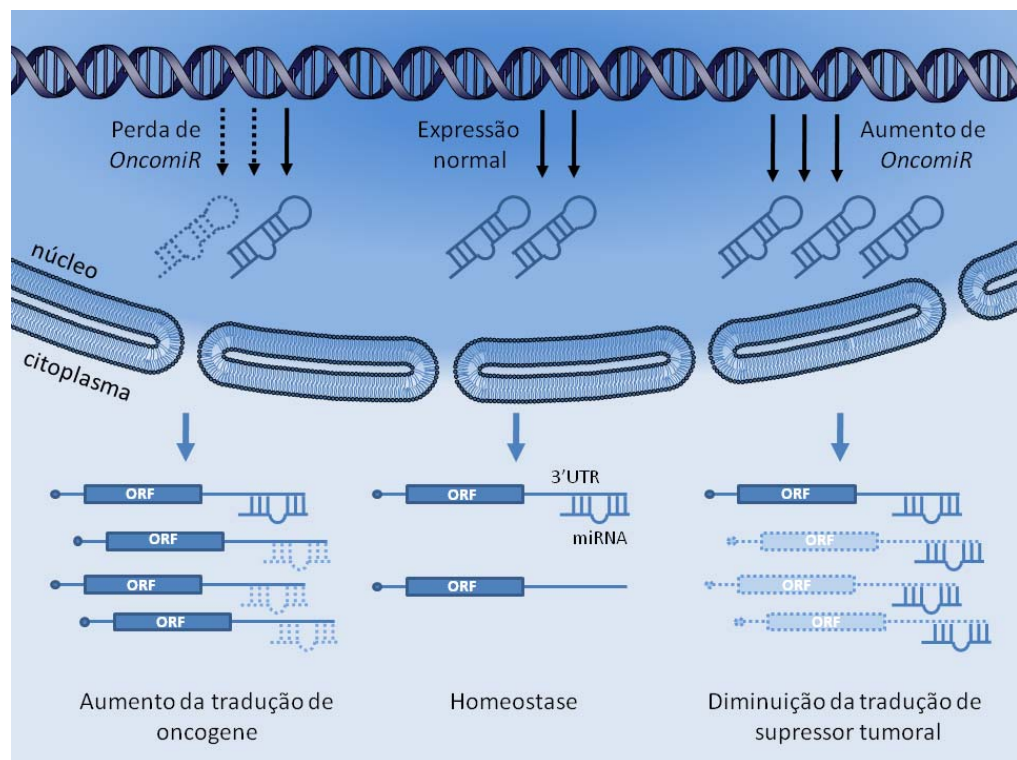


Figura 1. miRNAs e câncer. A desregulação da expressão de um miRNA (oncomiR) pode contribuir com a oncogênese a medida que aumenta a tradução de um oncogene (diminuição do oncomiR) ou diminui a tradução de um gene supresso-tumoral (aumento de um oncomiR). Figura adaptada de (Fuziwara et al., 2012).

O câncer de tireoide derivado da célula folicular compreende os histotipos: carcinoma papilífero (CPT), carcinoma folicular (CFT) e carcinoma anaplásico (CAT). O CPT é o histotipo mais frequente sendo diagnosticado em mais de 80% dos casos. Na última década, houve aumento na incidência do câncer de tireoide na população, sendo que atualmente o

câncer de tireoide é o quinto mais incidente em mulheres (Siegel et al., 2013). O CPT apresenta bom prognóstico clínico com resposta favorável ao tratamento convencional de excisão cirúrgica do tumor e ablação por radioiodoterapia (Cooper et al., 2009). Entretanto, certa fração de CPTs apresenta comportamento agressivo e refratariedade a radioiodoterapia, características indicativas de pior prognóstico, similares ao carcinoma anaplásico o mais agressivo e letal (Kebebew et al., 2005).

A oncogênese tiroidiana é mediada por alterações genéticas na via MAPK nos genes *RET*, *RAS* e *BRAF* e acometem mais de 70% dos casos de CPT (Kimura et al., 2003). A mutação no gene *BRAF* (*BRAF^{T1799A}*) é o evento genético mais prevalente no carcinoma papilífero, sendo detectado em mais de 40% dos casos, seguida da mutação em *RAS* (~15%) e o rearranjo *RET/PTC* (~15%) (Kimura et al., 2003). A mutação *BRAF^{T1799A}* é encontrada também nos carcinomas agressivos como carcinomas pouco diferenciados e anaplásico. A progressão do câncer de tireoide para histotipos de maior agressividade está associada ao acúmulo de alterações genéticas adicionais como mutações em *TP53* (Fagin et al., 1993) e *TERT* (Landa et al., 2013).

Além disto, estudos de expressão de miRNA em larga escala revelaram desbalanço na expressão de miRNAs específicos nos diferentes histotipos de câncer derivados da célula folicular tiroidiana (He et al., 2005; Visone et al., 2007; Weber et al., 2006). Desta forma, na progressão do câncer de tireoide além da participação de alterações genéticas clássicas observa-se o aumento na expressão de miRNAs tais como *miR-17-92*, *miR-146*, *miR-221/222*, ou diminuição de miRNAs como *let-7*, *miR-200* e *miR-30* (Figura 2).

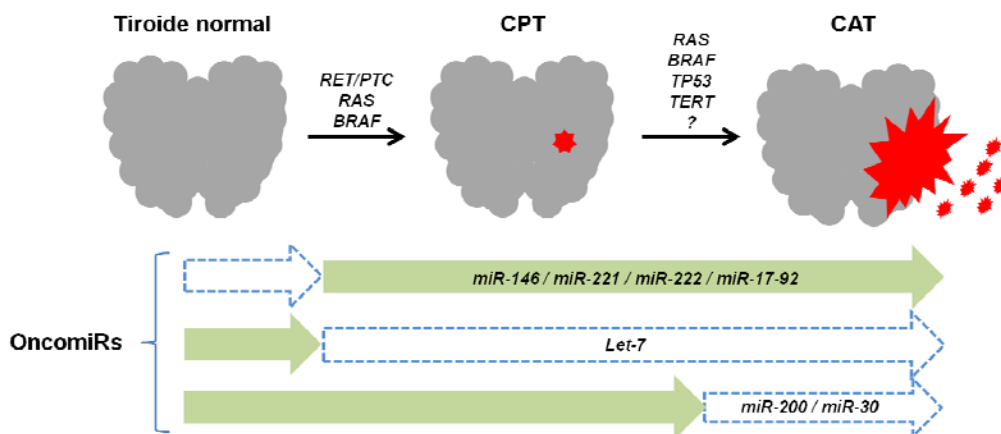


Figura 2. Oncogênese tiroidiana. Alterações genéticas na via de sinalização MAPK induzem a formação do carcinoma papilífero de tireoide (CPT), que pode progredir para carcinomas de comportamento mais agressivo como o carcinoma anaplásico (CAT), altamente letal. Neste processo, ocorre desregulação na expressão de miRNAs, que podem atuar como oncomiRs, controlando a expressão de oncogenes e supressores tumorais e potencializar a tumorigênese e progressão do câncer.

Dentre os diferentes alvos preditos para os miRNAs do *cluster miR-17-92*, encontram-se os receptores (TGFBR1 e TGFBR2) e transdutores (SMAD2, SMAD3, SMAD4) da via de sinalização de TGF β , uma importante via antimitogênica da célula folicular tiroideana. No câncer de tireoide observa-se desbalanço na expressão proteica de isoformas da citocina TGF β e de componentes da via de transdução de TGF β como o receptor TGFBR2, e a proteína inibitória desta sinalização SMAD7 (Kimura et al., 1999; Lazzereschi et al., 1997; Matsuo et al., 2010). Um importante ativador da via de sinalização de TGF β na célula folicular tiroideana é o iodo, que quando em excesso induz a síntese e secreção de TGF β (Cowin et al., 1992; Grubeck-Loebenstein et al., 1989).

Classicamente, é reconhecido que o excesso de iodo inibe a proliferação celular (Tramontano et al., 1989; Wolff et al., 1949), além de bloquear a síntese hormonal. Apesar disto, o entendimento molecular destes efeitos auto-regulatórios da glândula ainda encontra-se em expansão. Mostramos que o excesso de iodo exerce efeitos protetores frente ativação dos oncogenes *BRAF*^{T1799A} e *RET/PTC3* na célula folicular tiroideana *in vitro*, retardando seus efeitos deletérios como a instabilidade genômica e a perda de diferenciação, respectivamente (Fiore et al., 2008; Fuziwara et al., 2010). A suplementação de iodo pela ingestão de tabletes de iodeto de potássio (KI) é uma medida profilática recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em caso de acidente nuclear para saturar a glândula com altas concentrações de iodo e bloquear a captação do iodo radiativo, minimizando os efeitos genotóxicos do iodo radioativo em humanos.

Desta forma, entender a inter-relação de miRNAs, oncogenes e de iodo no processo de oncogênese tiroideana é um importante aspecto da fisiopatologia da célula folicular tiroideana a ser estudado.

6 CONCLUSÕES

Mostramos que os miRNAs são ativados por vias oncogênicas e exercem importantes efeitos na modulação da tumorigênese pois:

- i. o oncogene *BRAF^{T1799A}* induz a expressão do *cluster* de miRNAs *miR-17-92*
- ii. o iodo exerce efeito inibitório, bloqueando a ativação de *miR-17-92* em células com o oncogene *BRAF^{T1799A}* ativado;
- iii. Smad4 é alvo de *miR-19a* e *miR-19b*. Estes miRNAs interagem com o sítio na região 3'-UTR do mRNA e controlam a tradução da proteína Smad4 transdutora da via de TGF β . A modulação experimental de *miR-19a/b* utilizando *antimiR* restaura parcialmente responsividade da via de TGF β em linhagem de câncer de tireoide;
- iv. o oncogene *BRAF^{T1799A}* induz resistência ao sinal antiproliferativo de TGF β ao inibir a expressão de Smad4 e Tgfr2, enquanto o tratamento com iodo reverte este efeito e restaura a responsividade desta via de sinalização;
- v. a indução da expressão de *miR-17-92* é mediada pela via de sinalização de Notch em resposta a ativação de *BRAF^{T1799A}*, sendo que o tratamento com excesso de iodo bloqueia a sinalização de Notch;
- vi. o *knock-down* da sinalização de Notch e bloqueio de *BRAF^{T1799A}* pelo fármaco PLX4032 resultou em redução de *miR-19a* e *miR-19b* em linhagem de carcinoma anaplásico, altamente agressivo.

Desta forma, neste estudo concluímos que o oncogene *BRAF^{T1799A}* induz o *cluster miR-17-92* através de *cross-talk* com a via de sinalização de Notch e diminui a resposta antiproliferativa de TGF β . O excesso de iodo exerce importante efeito protetor na folicular tiroideana, bloqueando os efeitos agudos da ativação de oncogene *BRAF^{T1799A}*, e mantendo a resposta ao TGF β , o que constitui um novo aspecto molecular do efeito auto-regulatório do iodo. No futuro, a modulação dos níveis de *miR-17-92* e de vias de sinalização envolvidas no controle da expressão deste oncomiR se tornaria uma ferramenta terapêutica promissora no tratamento de câncer agressivo.

REFERÊNCIAS*

ABIA. [internet]. Cenário do consumo de sódio no Brasil. Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação. Dados IBGE; 2013. [acesso em: 25 jun. 2014]. Disponível em: <http://www.abia.org.br/sodio/pressrelease.asp>.

ANVISA. [internet]. Programa nacional garante qualidade do sal consumido no país. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde; 2004. [acesso 25 jun. 2014]. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/boletim/41_04.pdf.

Bao B, Wang Z, Ali S, Kong D, Li Y, Ahmad A, Banerjee S, Azmi AS, Miele L, Sarkar FH. Notch-1 induces epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells. *Cancer Lett.* 2011; 307(1):26-36.

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

Bravo SB, Pampin S, Cameselle-Teijeiro J, Carneiro C, Dominguez F, Barreiro F, Alvarez CV. TGF-beta-induced apoptosis in human thyrocytes is mediated by p27kip1 reduction and is overridden in neoplastic thyrocytes by NF-kappaB activation. *Oncogene.* 2003; 22(49):7819-30.

Calil-Silveira J, Serrano-Nascimento C, Nunes MT. Iodide treatment acutely increases pendrin (SLC26A4) mRNA expression in the rat thyroid and the PCCl3 thyroid cell line by transcriptional mechanisms. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 350(1):118-24.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(24):15524-29.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(9):2999-3004.

Chakraborty S, Mehtab S, Patwardhan A, Krishnan Y. Pri-miR-17-92a transcript folds into a tertiary structure and autoregulates its processing. *RNA.* 2012; 18(5):1014-28.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Chaulk SG, Thede GL, Kent OA, Xu Z, Gesner EM, Veldhoen RA, Khanna SK, Goping IS, MacMillan AM, Mendell JT, Young HS, Fahlman RP, Glover JN. Role of pri-miRNA tertiary structure in miR-17~92 miRNA biogenesis. *RNA Biol.* 2011; 8(6):1105-14.

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

Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL, Tuttle RM. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid.* 2009; 19(11):1167-214.

Corcoran DL, Pandit KV, Gordon B, Bhattacharjee A, Kaminski N, Benos PV. Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data. *PLoS One.* 2009; 4(4):e5279, 1-10.

Cowin AJ, Davis JR, Bidey SP. Transforming growth factor-beta 1 production in porcine thyroid follicular cells: regulation by intrathyroidal organic iodine. *J Mol Endocrinol.* 1992; 9(3):197-05.

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

Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature.* 1996; 379(6564):458-60.

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

Dews M, Fox JL, Hultine S, Sundaram P, Wang W, Liu YY, Furth E, Enders GH, El-Deiry W, Schelter JM, Cleary MA, Thomas-Tikhonenko A. The myc-miR-17~92 axis blunts TGF{beta} signaling and production of multiple TGF{beta}-dependent antiangiogenic factors. *Cancer Res.* 2010; 70(20):8233-46.

Eastman CJ, Zimmermann M. [internet]. The iodine deficiency disorders. 2009. [cited 2014 jun 10]. Available from <http://www.thyroidmanager.org>.

Enewold L, Zhu K, Ron E, Marrogi AJ, Stojadinovic A, Peoples GE, Devesa SS. Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18(3):784-91.

Eng PH, Cardona GR, Fang SL, Previti M, Alex S, Carrasco N, Chin WW, Braverman LE. Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology.* 1999; 140(8):3404-10.

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

- Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest.* 1993; 91: 179-184.
- Fiore AP, Fuziwara CS, Kimura ET. High iodine concentration attenuates RET/PTC3 oncogene activation in thyroid follicular cells. *Thyroid.* 2009; 19(11):1249-56.
- Fiore AP, Fuziwara CS, Leoni SG, Kimura ET. High Iodine Concentration Effects in RET/PTC3 Activation in Thyroid Follicular Cells. 79th Annual Meeting of the American Thyroid Association, *Thyroid.* 2008.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009; 19(1):92-105.
- Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem.* 2003; 278(41):40128-35.
- Fuziwara CS, Geraldo MV, Kimura ET. Let-7 and Cancer. In *MicroRNA Let-7: role in human diseases and drug discovery.* N. Dahiya. New York, Nova Science Publishers. 2012,1:109-24.
- Fuziwara CS, Kimura ET. High iodine blocks a Notch/miR-19 loop activated by the BRAF(V600E) oncoprotein and restores the response to TGFbeta in thyroid follicular cells. *Thyroid.* 2014; 24(3):453-62.
- Fuziwara CS, Matsuse M, Mitsutake N, Kimura ET, Yamashita S. Iodine protects thyroid cells from BRAFT1799A oncogene-associated genomic instability. 14th International Thyroid Congress, Paris. 2010.
- Gärtner R, Dugrillon A, Betchner G. Iodolipids and thyroid function and growth. In *The thyroid and iodine.* J. Nauman, D. Glinöer, L. E. Braverman and U. Hostalek. Stuttgart, Schattauer. 1996,19-27.
- Geers C, Colin IM, Gerard AC. Delta-like 4/Notch pathway is differentially regulated in benign and malignant thyroid tissues. *Thyroid.* 2011; 21(12):1323-30.
- Geraldo MV, Yamashita AS, Kimura ET. MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF-beta by repressing SMAD4 in thyroid cancer. *Oncogene.* 2012; 31(15):1910-22.
- Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell.* 2005; 123(4):631-40.
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(Database issue):D154-58.
- Grubeck-Loebenstein B, Buchan G, Sadeghi R, Kissonerghis M, Londei M, Turner M, Pirich K, Roka R, Niederle B, Kassal H, et al. Transforming growth factor beta regulates thyroid growth. Role in the pathogenesis of nontoxic goiter. *J Clin Invest.* 1989; 83(3):764-70.

- Guil S, Caceres JF. The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nat Struct Mol Biol.* 2007; 14(7):591-96.
- Gupta S, Seth A, Davis RJ. Transactivation of gene expression by Myc is inhibited by mutation at the phosphorylation sites Thr-58 and Ser-62. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(8):3216-20.
- Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature.* 1994; 371(6494):257-61.
- Harach HR, Escalante DA, Day ES. Thyroid cancer and thyroiditis in Salta, Argentina: a 40-yr study in relation to iodine prophylaxis. *Endocr Pathol.* 2002; 13(3):175-81.
- Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 2005; 65(21):9628-32.
- He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(52):19075-80.
- He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature.* 2005; 435(7043):828-33.
- Hsieh JJ, Henkel T, Salmon P, Robey E, Peterson MG, Hayward SD. Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Mol Cell Biol.* 1996; 16(3):952-59.
- Hsu PW, Huang HD, Hsu SD, Lin LZ, Tsou AP, Tseng CP, Stadler PF, Washietl S, Hofacker IL. miRNAMap: genomic maps of microRNA genes and their target genes in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(Database issue):D135-39.
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science.* 2001; 293(5531):834-38.
- Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science.* 2002; 297(5589):2056-60.
- Ikushima H, Miyazono K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(6):415-24.
- INCA. [internet]. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA). 2014. [acesso em 10 jun. 2014]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>.
- Inoue Y, Imamura T. Regulation of TGF-beta family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Sci.* 2008; 99(11):2107-12.

International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004; 431(7011):931-45.

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005; 120(5):635-47.

Kebebew E, Greenspan FS, Clark OH, Woeber KA, McMillan A. Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors. *Cancer*. 2005; 103(7):1330-35.

Kim VN. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol*. 2004; 14(4):156-59.

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

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

Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 2003; 63(7):1454-57.

Knauf JA, Ma X, Smith EP, Zhang L, Mitsutake N, Liao XH, Refetoff S, Nikiforov YE, Fagin JA. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res*. 2005; 65(10):4238-45.

Knauf JA, Sartor MA, Medvedovic M, Lundsmith E, Ryder M, Salzano M, Nikiforov YE, Giordano TJ, Ghossein RA, Fagin JA. Progression of BRAF-induced thyroid cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition requiring concomitant MAP kinase and TGFbeta signaling. *Oncogene*. 2011;30(28):3153-62.

Knobel M, Medeiros-Neto G. Relevance of iodine intake as a reputed predisposing factor for thyroid cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007; 51(5):701-12.

Kopp P. Thyroid hormone synthesis. In Werner&Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text. L. E. Braverman and D. S. Cooper. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2013,48-73.

Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42(Database issue):D68-73.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001; 294(5543):853-58.

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

- Landa I, Ganly I, Chan TA, Mitsutake N, Matsuse M, Ibrahimasic T, Ghossein RA, Fagin JA. Frequent somatic TERT promoter mutations in thyroid cancer: higher prevalence in advanced forms of the disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: E1562-66
- Langsteger W, Koltringer P, Wolf G, Dominik K, Buchinger W, Binter G, Lax S, Eber O. The impact of geographical, clinical, dietary and radiation-induced features in epidemiology of thyroid cancer. *Eur J Cancer*. 1993; 29A(11):1547-53.
- Lazzereschi D, Ranieri A, Mincione G, Taccogna S, Nardi F, Colletta G. Human malignant thyroid tumors displayed reduced levels of transforming growth factor beta receptor type II messenger RNA and protein. *Cancer Res*. 1997; 57(10):2071-76.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75(5):843-54.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003; 425(6956):415-19.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004; 23(20):4051-60.
- Lemoine NR, Mayall ES, Jones T, Sheer D, McDermid S, Kendall-Taylor P, Wynford-Thomas D. Characterisation of human thyroid epithelial cells immortalised in vitro by simian virus 40 DNA transfection. *Br J Cancer*. 1989; 60(6):897-03.
- Leoni SG, Galante PA, Ricarte-Filho JC, Kimura ET. Differential gene expression analysis of iodide-treated rat thyroid follicular cell line PCC13. *Genomics*. 2008; 91(4):356-66.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005; 120(1):15-20.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003; 115(7):787-798.
- Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. Vertebrate microRNA genes. *Science*. 2003; 299(5612):1540.
- Liu XH, Chen GG, Vlantis AC, Tse GM, van Hasselt CA. Iodine induces apoptosis via regulating MAPKs-related p53, p21, and Bcl-xL in thyroid cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 320(1-2):128-35.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005; 435(7043):834-38.
- Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004; 303(5654):95-98.
- Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell*. 2008; 134(2):215-30.

Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. 2000; 103(2):295-309.

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

Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med*. 1994; 97(5):418-28.

Mendell JT. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell*. 2008; 133(2):217-22.

Mesa C, Jr., Mirza M, Mitsutake N, Sartor M, Medvedovic M, Tomlinson C, Knauf JA, Weber GF, Fagin JA. Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling. *Cancer Res*. 2006; 66(13):6521-29.

Mestdagh P, Bostrom AK, Impens F, Fredlund E, Van Peer G, De Antonellis P, von Stedingk K, Ghesquiere B, Schulte S, Dews M, Thomas-Tikhonenko A, Schulte JH, Zollo M, Schramm A, Gevaert K, Axelson H, Speleman F, Vandesompele J. The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF-beta pathway in neuroblastoma. *Mol Cell*. 2010; 40(5):762-73.

MiRBase. [internet]. University of Manchester. MiRBase: the microRNA database- release 20. 2014. [cited 2014 jun 10]. Available from: <http://mirbase.org>.

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

Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, Ohtsuru A, Saenko VA, Kanematsu T, Yamashita S. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(9):4393-97.

Nicola JP, Basquin C, Portulano C, Reyna-Neyra A, Paroder M, Carrasco N. The Na⁺/I⁻ symporter mediates active iodide uptake in the intestine. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009; 296(4):C654-62.

Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(11):5399-404.

O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 2005; 435(7043):839-43.

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

Olive V, Bennett MJ, Walker JC, Ma C, Jiang I, Cordon-Cardo C, Li QJ, Lowe SW, Hannon GJ, He L. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev.* 2009; 23(24):2839-49.

Olive V, Sabio E, Bennett MJ, De Jong CS, Biton A, McGann JC, Greaney SK, Sodir NM, Zhou AY, Balakrishnan A, Foth M, Luftig MA, Goga A, Speed TP, Xuan Z, Evan GI, Wan Y, Minella AC, He L. A component of the mir-17-92 polycistronic oncomir promotes oncogene-dependent apoptosis. *Elife.* 2013; 2:e00822, 1-24.

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

Palona I, Namba H, Mitsutake N, Starenki D, Podtcheko A, Sedliarou I, Ohtsuru A, Saenko V, Nagayama Y, Umezawa K, Yamashita S. BRAFV600E promotes invasiveness of thyroid cancer cells through nuclear factor kappaB activation. *Endocrinology.* 2006; 147(12):5699-707.

Park JE, Heo I, Tian Y, Simanshu DK, Chang H, Jee D, Patel DJ, Kim VN. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature.* 2011; 475(7355):201-05.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 2000; 408(6808):86-89.

Petrocca F, Vecchione A, Croce CM. Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res.* 2008; 68(20):8191-94.

Pisarev MA, Thomasz L, Juvenal GJ. Role of transforming growth factor beta in the regulation of thyroid function and growth. *Thyroid.* 2009; 19(8):881-92.

Pretell EA, Delange F, Hostalek U, Corigliano S, Barreda L, Higa AM, Altschuler N, Barragan D, Cevallos JL, Gonzales O, Jara JA, Medeiros-Neto G, Montes JA, Muzzo S, Pacheco VM, Cordero L. Iodine nutrition improves in Latin America. *Thyroid.* 2004; 14(8):590-99.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000; 403(6772):901-06.

Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M, Janakiraman M, Solit D, Knauf JA, Tuttle RM, Ghossein RA, Fagin JA. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res.* 2009; 69(11):4885-93.

Riesco-Eizaguirre G, Gutierrez-Martinez P, Garcia-Cabezas MA, Nistal M, Santisteban P. 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*. 2006; 13(1):257-69.

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

Rivera M, Ghossein RA, Schoder H, Gomez D, Larson SM, Tuttle RM. Histopathologic characterization of radioactive iodine-refractory fluorodeoxyglucose-positron emission tomography-positive thyroid carcinoma. *Cancer*. 2008; 113(1):48-56.

Schug J, Overton GC. TESS:Transcription Element Search Software on the WWW. [internet] 1997; Technical Report CBIL-TR-1997-1001-v0.0. [cited 2012 sept.04] Available from: <http://www.cbil.upenn.edu/tess>.

Serrano-Nascimento C, Calil-Silveira J, Nunes MT. Posttranscriptional regulation of sodium-iodide symporter mRNA expression in the rat thyroid gland by acute iodide administration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010; 298(4):C893-99.

SEER. [internet]. Surveillance, Epidemiology and End Results, National Cancer Institute. 2014. [cited 2014 mai 10]. Available from <http://seer.cancer.gov>.

Shakhtarin VV, Tsyb AF, Stepanenko VF, Orlov MY, Kopecky KJ, Davis S. Iodine deficiency, radiation dose, and the risk of thyroid cancer among children and adolescents in the Bryansk region of Russia following the Chernobyl power station accident. *Int J Epidemiol*. 2003; 32(4):584-91.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013; 63(1):11-30.

Simon P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics*. 2003; 19(11):1439-40.

Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G. The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell*. 2000; 5(4):659-69.

Smale ST, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem*. 2003; 72:449-79.

Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, Heufelder AE. Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83(5):1746-51.

Swierniak M, Wojcicka A, Czetwertynska M, Stachlewska E, Maciag M, Wiechno W, Gornicka B, Bogdanska M, Koperski L, de la Chapelle A, Jazdzewski K. In-depth

characterization of the microRNA transcriptome in normal thyroid and papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98(8):E1401-09.

Takakura S, Mitsutake N, Nakashima M, Namba H, Saenko VA, Rogounovitch TI, Nakazawa Y, Hayashi T, Ohtsuru A, Yamashita S. Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells. *Cancer Sci.* 2008; 99(6):1147-54.

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 2004; 64(11):3753-56.

TargetScan. [internet]. Massachusetts Institute of Technology. Target Scan Human. 2014. [cited 2014 feb 01]. Available from <http://www.targetscan.org/>.

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

Tramontano D, Veneziani BM, Lombardi A, Villone G, Ingbar SH. Iodine inhibits the proliferation of rat thyroid cells in culture. *Endocrinology.* 1989; 125(2):984-92.

Tsuchida A, Ohno S, Wu W, Borjigin N, Fujita K, Aoki T, Ueda S, Takanashi M, Kuroda M. miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. *Cancer Sci.* 2011; 102(12):2264-71.

Uyttersprot N, Pelgrims N, Carrasco N, Gervy C, Maenhaut C, Dumont JE, Miot F. Moderate doses of iodide in vivo inhibit cell proliferation and the expression of thyroperoxidase and Na⁺/I⁻ symporter mRNAs in dog thyroid. *Mol Cell Endocrinol.* 1997; 131(2):195-203.

Vermeulen A, Behlen L, Reynolds A, Wolfson A, Marshall WS, Karpilow J, Khvorova A. The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. *RNA.* 2005; 11(5):674-82.

Visone R, Pallante P, Vecchione A, Cirombella R, Ferracin M, Ferraro A, Volinia S, Coluzzi S, Leone V, Borbone E, Liu CG, Petrocca F, Troncione G, Calin GA, Scarpa A, Colato C, Tallini G, Santoro M, Croce CM, Fusco A. Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. *Oncogene.* 2007; 26:7590-95.

Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(7):2257-61.

Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell.* 2004; 116(6):855-67.

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

WHO/ICCIDD/UNICEF. Assessment of the iodine deficiency disorders and monitoring their elimination. 2007. Geneva, WHO Press.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993; 75(5):855-62.

Wolff J, Chaikoff IL. Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. *The Journal of Biological Chemistry.* 1948; 174:555-64.

Wolff J, Chaikoff IL, Goldberg RC, Meier JR. The temporary nature of the inhibitory action of excess iodine on organic iodine synthesis in the normal thyroid. *Endocrinology.* 1949; 45(5):504-13.

Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, Bendlova B, Yip L, Mian C, Vianello F, Tuttle RM, Robenshtok E, Fagin JA, Puxeddu E, Fugazzola L, Czarniecka A, Jarzab B, O'Neill CJ, Sywak MS, Lam AK, Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P, Nakayama H, Tufano RP, Pai SI, Zeiger MA, Westra WH, Clark DP, Clifton-Bligh R, Sidransky D, Ladenson PW, Sykorova V. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA.* 2013; 309(14):1493-501.

Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, Carson KA, Vasko V, Larin A, Tallini G, Tolaney S, Holt EH, Hui P, Umbricht CB, Basaria S, Ewertz M, Tufano AP, Califano JA, Ringel MD, Zeiger MA, Sidransky D, Ladenson PW. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(12):6373-79.

Yamashita AS, Geraldo MV, Fuziwara CS, Kulcsar MA, Friguglietti CU, da Costa RB, Baia GS, Kimura ET. Notch pathway is activated by MAPK signaling and influences papillary thyroid cancer proliferation. *Transl Oncol.* 2013; 6(2):197-205.

Yuasa R, Eggo MC, Meinkoth J, Dillmann WH, Burrow GN. Iodide induces transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) mRNA in sheep thyroid cells. *Thyroid.* 1992; 2(2):141-45.

Zimmermann MB, Andersson M. Update on iodine status worldwide. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012; 19(5):382-87.