



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

LEONARDO AUGUSTO MARSON

Avaliação do papel supressor tumoral de microRNAs da região genômica DLK1-DIO3 no carcinoma papilífero de tireoide.

Evaluation of the tumor suppressor role of microRNAs from the DLK1-DIO3 genomic region in papillary thyroid carcinoma.

CAMPINAS

2018

LEONARDO AUGUSTO MARSON

Avaliação do papel supressor tumoral de microRNAs da região genômica DLK1-DIO3 no carcinoma papilífero de tireoide.

Evaluation of the tumor suppressor role of microRNAs situated at the DLK1-DIO3 genomic region in papillary thyroid carcinoma.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural, na Área de Biologia Celular

Dissertation presented to the Biology Institute of the State University of Campinas as part of the requisites required to obtain a Master's degree in Cellular and Structural Biology in the Area of Cellular Biology

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO,
LEONARDO AUGUSTO MARSON
ORIENTADO PELO PROF. DR.
MURILO VIEIRA GERALDO.

Orientador: Murilo Vieira Geraldo

CAMPINAS

2018

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M359a Marson, Leonardo Augusto, 1992-
Avaliação do papel supressor tumoral de microRNAs da região genômica
DLK1-DIO3 no carcinoma papilífero de tireoide / Leonardo Augusto Marson. –
Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Murilo Vieira Geraldo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. MicroRNAs. 2. Carcinoma papilífero de tireoide. I. Geraldo, Murilo Vieira,
1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the tumor suppressor role of microRNAs from the
DLK1-DIO3 genomic region in papillary thyroid carcinoma

Palavras-chave em inglês:

MicroRNAs

Thyroid cancer, Papillary

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Murilo Vieira Geraldo [Orientador]

Cristina Pontes Vicente

Gianna Maria Griz Carvalheira

Data de defesa: 14-12-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 14 de dezembro de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Murilo Vieira Geraldo

Prof. (a) Dr.(a). Cristina Pontes Vicente

Prof. (a) Dr.(a). Gianna Maria Griz Carvalheira

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

A minha família e principalmente aos meus pais,
Fernando Cesar Marson e Sandra Regina Furini.

Obrigado por todo apoio, por todo esforço e dedicação em me ajudar e estarem sempre ao meu lado nessa longa e tempestuosa caminhada que se chama vida. Minha eterna gratidão por confiarem em mim nessa trajetória!

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a meu orientador **Murilo Vieira Geraldo**, por ter me aberto as portas de seu laboratório, e me permitido vivenciar os anos de maior crescimento pessoal e profissional de minha vida até o momento. Obrigado pela confiança e por me mostrar que entre os erros e acertos diários, a ciência surge de uma forma inspiradora. Muito obrigado!
- À Professora **Edna Teruko Kimura**, muito obrigado pelo auxílio e por disponibilizar os materiais e espaço de seu laboratório para o início de minhas análises. Foi de grande importância o conhecimento adquirido nesse momento.
- Às minhas colegas de laboratório (LBCC) **Leticia Ferreira** e **Gabriela**. Que apesar de um tempo mais curto de convívio, foram de grande importância para continuar a caminhada na pós-graduação. E a colega do laboratório de Terapia Celular e reparo tecidual, **Micheli Sielski**, muito obrigado por toda paciência e auxílio e parceria ao longo de todo o mestrado.
- Ao meu companheiro **Gildo**, por estar presente em todos os momentos importantes da minha vida. Chegar até aqui enfrentando as angústias e medos que passei, não teria sido possível sem seu apoio e paciência. Obrigado por não desistir da nossa história. E obrigado por estar comigo também nos momentos mais importantes e felizes.
- Meu irmão de coração **Luiz Henrique**, não consigo colocar em palavras a sua importância em minha vida. Seu apoio e incentivo foram extremamente importantes para que eu não desistisse dessa longa e árdua caminhada que vivemos na pós-graduação. E com toda certeza, obrigado por viver comigo os dias mais insanos dessa louca vida.
- A minha segunda família que tive a oportunidade de conhecer em Minas. **Leticia Bolonha, Elton, Elisabeth Lima, Karen Souza, Lorena Bueno, Bruna Leite, Caio Nogueira, Natalia Coriolano, André Fontinelle, Rafael Cardoso, Camila Domingues, Sullivan, Vanessa Carla, Arthur, Isabela Recchi, Maria Teresa,**

Nathany e Vivi. Apesar dos encontros e desencontros da vida adulta, meu coração estará sempre ao lado de cada um de vocês e sempre serei eternamente grato por cada momento que tive e ainda terei junto de cada um.

- Aos meus amigos de Catanduva. **Isabela Stugisnki, Stephanie Uribe, Natalia Serafim, Marianna Peccinelli, Yasmin Melhado, Gustavo Correr, Tais Pelegrino, Giovana Teixeira, Guilherme Hatty e Leandro Degrandi.** Obrigado por cada momento juntos, por todo apoio, carinho e momentos inesquecíveis que tive e tenho ao lado de vocês.
- Aos meus companheiros de dia-a-dia da **República Make Love**, com os quais eu compartilho toda a angústia e estresses diários, mas também os dias de diversão e risadas que vivemos. Meu eterno obrigado por tudo.
- A todas as pessoas de Minas Gerais e Campinas que fazem ou fizeram parte da minha caminhada. Muito obrigado por cada momento que estiveram comigo, seja no dia-a-dia da pós-graduação, nas festas, ou nos encontros e desencontros da vida. Com toda certeza, hoje sou uma pessoa melhor por cada contribuição que tive ao longo dessa trajetória.
- Aos professores e ao curso de **Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia** (*campus* Pontal), por toda base e apoio que me deram no início dessa caminhada, e em especial a **Professora Gabriela Lícia dos Santos Ferreira**, quem eu irei sempre levar em meu coração por todos ensinamentos e conselhos dados!
- Ao curso de **Ciências Biológicas e ao Programa de Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP.** Obrigado por me abrirem as portas e permitirem tamanho crescimento pessoal e profissional nesta universidade.
- Aos profs. **Hernandes F. de Carvalho, Luciana B, e Edson Pimentel** por disponibilizarem equipamentos utilizados. Em especial aos professores **Cristina Pontes Vicente e Cláudio Werneck** pela atenção e auxílio abrindo as portas de seu laboratório.

- À **FAPESP** pela concessão da bolsa e financiamento desta pesquisa.
Processo nº 2016/09107-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma. E você aprende que amar não significa apoiar-se. E que companhia nem sempre significa segurança. Começa a aprender que beijos não são contratos e que presentes não são promessas. Começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança...”

Veronica Shoffstall

RESUMO

O carcinoma papilífero de tireoide (PTC) é o histotipo mais prevalente de carcinomas tireoideanos e sua incidência tem aumentado globalmente. No Brasil, estima-se que em 2018, 1.560 homens e 8.040 mulheres apresentaram novos casos de câncer de tireoide, sendo este o quinto tipo de câncer mais incidente em indivíduos do sexo feminino. Mundialmente, em 2018 o câncer de tireoide acometeu 567.233 indivíduos, dos quais 41,071 chegaram a óbito. Recentemente, a expressão aberrante de microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs não codificadores de proteínas, tem ganhado destaque pelo seu potencial diagnóstico e prognóstico para o PTC. Seu potencial terapêutico, no entanto, permanece pouco explorado. Diversos miRNAs situados ao longo da região genômica DLK1-DIO3 apresentam redução global da expressão no PTC. Desta forma, este projeto teve como objetivo a avaliação da atividade supressora tumoral de miRNAs da região DLK1-DIO3 *in vitro*. Para tanto, foi realizada a predição computacional dos alvos dos 102 miRNAs maduros oriundos da região DLK1-DIO3, aliada à mineração de dados de expressão gênica de amostras teciduais de PTC e tecido tireoideano normal oriundos do *Gene Expression Omnibus* (GEO) e do projeto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Uma matriz de interações entre os miRNAs e seus alvos preditos foi então construída e o ranqueamento dos miRNAs de acordo com (i) o número total de alvos preditos; (ii) de alvos já caracterizados como oncogenes ou (iii) de alvos relacionados ao câncer, apontou *miR-485-5p* como um candidato promissor para as subseqüentes análises funcionais. Este miRNA apresenta em sua lista de alvos, enriquecimento para processos importantes para a progressão tumoral, como a migração celular, transdução de sinal e controle da expressão gênica. As análises funcionais mostraram que a transfecção de mimético comercial de *miR-485-5p* em linhagens de PTC (TPC-1 e BCPAP) foi capaz de inibir a migração, invasão, proliferação e viabilidade celular *in vitro*, corroborando as análises bioinformáticas iniciais. Interessantemente, estes efeitos foram observados apenas nas linhagens portadoras da mutação *BRAFT1799A*, indicando influência do *background* genético do tumor no mecanismo de ação de *miR-485-5p*. De fato, a restauração de *miR-485-5p* leva à diminuição da expressão dos genes-alvo preditos *GAB2*, *RAC1* e *ICAM1*, membros importantes de vias relacionadas à progressão tumoral, apenas na linhagem positiva para *BRAFT1799A*, BCPAP. Assim, nossos resultados sugerem que *miR-485-5p* está envolvido na modulação de genes envolvidos em importantes processos relacionados a progressão tumoral, apontando este miRNA como um promissor alvo molecular para o carcinoma papilífero de tireoide. A exploração destes mecanismos moleculares poderá contribuir com novas estratégias terapêuticas para o PTC, especialmente para aqueles pacientes portadores da mutação *BRAFT1799A*, que tendem a evoluir para o câncer metastático e têm menos opções terapêuticas.

ABSTRACT

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most prevalent histotype of thyroid carcinomas and its incidence has increased globally. In Brazil 1,560 new cases are estimated in men and 8,040 in women in 2018-2019, being the fifth most prevalent cancer in women. Worldwide, 567,233 individuals were affected by thyroid cancer in 2018, leading to 41,071 deaths. More recently, the aberrant expression of microRNAs (miRNAs), small non-protein-coding RNAs, emerged as promising diagnostic and prognostic tools for PTC. However, its therapeutic potential for PTC remains poorly explored. Several miRNAs located along the DLK1-DIO3 genomic region present an overall reduction in PTC expression. Thus, this project aims to evaluate the tumor suppressor activity of DLK1-DIO3 miRNAs *in vitro*. To this purpose, we performed the computational prediction of the targets of the 102 mature miRNAs from the DLK1-DIO3 region, combined with the gene expression data mining from PTC tissue samples and normal thyroid tissue from Gene Expression Omnibus (GEO) and from The Cancer Project Genome Atlas (TCGA). A matrix of interactions between the miRNAs and their predicted targets was subsequently constructed, where the miRNAs were ranked according to (i) the total number of predicted targets; (ii) the number of targets already characterized as oncogenes and (iii) the number cancer-related genes targeted, indicated *miR-485-5p* as a promising candidate for subsequent functional analyses. This list of targets of this miRNA is enriched for biological processes important for tumor progression, such as *cell migration*, *MAPK signal transduction* and *control of gene expression*. Functional analyses showed that transfection of commercial mimetic of *miR-485-5p* in PTC lines (TPC-1 and BCPAP) decreased cell migration, invasion, proliferation and cell viability *in vitro*, corroborating the bioinformatic analyses. Interestingly, these effects were observed only in the *BRAF1799A*-positive cell line (BCPAP), indicating the influence of the tumor genetic *background* on the mechanism of action of *miR-485-5p*. Indeed, the transfection of *miR-485-5p* decreased the levels of its putative target genes *GAB2*, *RAC1* and *ICAM1*, key members of pathways related to tumor progression, only in BCPAP cell line. Thus, our results allow us to conclude that *miR-485-5p* is involved in the modulation of genes involved in important processes related to tumor progression, pointing this molecule as a promising element in the elucidation of papillary thyroid cancer. The exploration of these molecular mechanisms may contribute to new therapeutic strategies for PTC, especially for *BRAF1799A*-positive patients, which tend to progress to metastatic cancer and have fewer therapeutic options.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. BIOGÊNESE DOS MIRNAS.....	17
FIGURA 2. A REGIÃO GENÔMICA DLK1-DIO3	20
FIGURA 3. MODELO DE LESÃO EM MONOCAMADA DE CÉLULAS <i>IN VITRO</i>	29
FIGURA 4. CONSTRUÇÃO DA MATRIZ DE INTERAÇÕES MIRNA:ALVO.	35
FIGURA 5. AGRUPAMENTO POR ANOTAÇÃO FUNCIONAL.....	38
FIGURA 6. DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>MIR-485-5P</i> NO PTC.....	39
FIGURA 7. IMAGEM REPRESENTATIVA DE VIAS DE SINALIZAÇÃO E PROCESSOS BIOLÓGICOS ENRIQUECIDOS NA LISTA DE ALVOS DE <i>MIR-485-5P</i>	40
FIGURA 8. CONFIRMAÇÃO DA SUPER-EXPRESSÃO DE <i>MIR-485-5P</i> EM LINHAGENS DE PTC.	41
FIGURA 9. INFLUÊNCIA DE <i>MIR-485-5P</i> SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR.	42
FIGURA 10. INFLUÊNCIA DE <i>MIR-485-5P</i> SOBRE A MIGRAÇÃO E INVASÃO CELULAR.	43
FIGURA 11. ALVOS DE <i>MIR-485-5P</i> COM EXPRESSÃO AUMENTADA NA CATEGORIA ONTOLÓGICA “ACTIN CYTOSKELETON”.....	44
FIGURA 12. ALVOS DE <i>MIR-485-5P</i> COM EXPRESSÃO AUMENTADA NA CATEGORIA ONTOLÓGICA “FOCAL ADHESION”.....	45
FIGURA 13. ALVOS DE <i>MIR-485-5P</i> COM EXPRESSÃO AUMENTADA NA CATEGORIA “CELL ADHESION MOLECULES”.	45
FIGURA 14. ALVOS DE <i>MIR-485-5P</i> COM EXPRESSÃO AUMENTADA NA CATEGORIA ONTOLÓGICA “TIGHT JUNCTION”.	46
FIGURA 15. <i>RAC1</i> COMO POTENCIAL ALVO DE <i>MIR-485-5P</i>	47
FIGURA 16. MODULAÇÃO DE <i>RAC1</i> POR <i>MIR-485-5P</i> EM PTC.	48
FIGURA 17. <i>ICAM1</i> COMO POTENCIAL ALVO DE <i>MIR-485-5P</i>	50
FIGURA 18. MODULAÇÃO DE <i>ICAM1</i> POR <i>MIR-485-5P</i> EM PTC.....	50
FIGURA 19. <i>ITGA3</i> COMO POTENCIAL ALVO DE <i>MIR-485-5P</i>	51
FIGURA 20. MODULAÇÃO DE <i>ITGA3</i> POR <i>MIR-485-5P</i> EM PTC.....	52
FIGURA 21. <i>MIR-485-5P</i> E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	53
FIGURA 22. INFLUÊNCIA DE <i>MIR-485-5P</i> SOBRE A VIABILIDADE CELULAR <i>IN VITRO</i>	53
FIGURA 23. <i>MIR-485-5P</i> E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A MORTE CELULAR.	54
FIGURA 24. ALVOS DE <i>MIR-485-5P</i> COM EXPRESSÃO AUMENTADA EM DIVERSAS CATEGORIAS ONTOLÓGICAS ENVOLVIDAS NA PROLIFERAÇÃO CELULAR.	57
FIGURA 25. <i>GAB2</i> COMO POTENCIAL ALVO DE <i>MIR-485-5P</i>	59
FIGURA 26. MODULAÇÃO DE <i>GAB2</i> POR <i>MIR-485-5P</i> EM PTC.	60
FIGURA 27. <i>EREG</i> COMO POTENCIAL ALVO DE <i>MIR-485-5P</i>	61
.....	62
FIGURA 28. MODULAÇÃO DE <i>EREG</i> POR <i>MIR-485-5P</i> EM PTC.....	62
FIGURA 29. <i>LMNA</i> COMO POTENCIAL ALVO DE <i>MIR-485-5P</i>	63
.....	63
FIGURA 30. MODULAÇÃO DE <i>LMNA</i> POR <i>MIR-485-5P</i> EM PTC.....	63

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

3'UTR	Região 3" não traduzida
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
mM	Milimolar
Ng	Nanograma
nM	Nanomolar
Nm	Nanômetro
Pb	Pares de base
M	Molar
Mg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
Abs	Absorbância
ATC	Carcinoma anaplásico da tireoide
cDNA	DNA complementar
Ct	Do inglês Cycle Threshold
ddH2O	Água destilada e deionizada
DEPC	Di-etil-pirocarbonato
DMEM	Do inglês Dulbecco' Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirriboucléico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DP	Desvio-padrão
DTT	Ditiotreitol
EUA	Estados Unidos da América
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FA	Adenoma Folicular
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FTC	Carcinoma da tireoide
HCl	Ácido clorídrico
M-MLV	Murine Moloey Leukemia Virus
MAPK	Via de Proteinas kinases ativadas por mitógeno
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	MicroRNA
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Ph	Potencial Hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídeo
pre-miRNA	Precursor de miRNA

pri-miRNA	miRNA primário
PTC	Carcinoma Papilífero da tireoide
qPCR	PCR quantitativo em tempo Real
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RT	Transcriptase reversa
RT-PCR	PCR de Transcrição Reversa
SFB	Soro fetal bovino
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
USA	Estados Unidos da América

LISTA DE NOMENCLATURAS

<i>MIR485</i>	nome do gene miR-485 de acordo com HGNC (HUGO GeneNomenclature Committee)
mir-485	Família gênica miR-485
pri-mir-485	RNA Primário de miR-485
pre-mir-485	RNA Precursor de miR-485
<i>miR-485-5p</i>	miRNA maduro proveniente do braço 5" do mir-485
<i>miR-485-3p</i>	miRNA maduro proveniente do braço 3" do mir-485

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 CÂNCER DE TIREOIDE	17
1.2 ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO CÂNCER DE TIREOIDE.....	18
1.3 MICRORNAS	19
1.4 MICRORNAS E O CÂNCER	21
2 OBJETIVO GERAL	25
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE CANDIDATOS PARA A VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL .	26
4.2 CULTURA CELULAR.....	27
4.2.1 <i>Transfecção transiente do mimético do hsa-miR-485-5p</i>	28
4.3 MIGRAÇÃO CELULAR	28
4.3.1 <i>Migração em ensaio de Lesão em monocamada</i>	28
4.3.2 <i>Migração e Invasão em Câmara de Boyden modificada</i>	29
4.4 PROLIFERAÇÃO CELULAR	29
4.4.1 <i>Curva de crescimento</i>	29
4.4.2 <i>Ensaio de MTT</i>	30
4.4.3 <i>Morte celular</i>	30
4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL	31
4.5.1 <i>Extração de RNA total</i>	31
4.5.2 <i>Síntese de DNA complementar</i>	31
4.5.3 <i>PCR quantitativo em tempo real</i>	32
4.5.4 <i>Cálculo da expressão gênica diferencial</i>	33
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 IDENTIFICAÇÃO DE MI RNAS COM POTENCIAL PAPEL SUPRESSOR TUMORAL	34
5.2 MODELO DE SUPER-EXPRESSÃO DE <i>MIR-485-5P</i> EM LINHAGENS CELULARES DE PTC	40
5.2 <i>MIR-485-5P</i> E A MIGRAÇÃO CELULAR	41
5.2 <i>MIR-485-5P</i> E A PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR	52
6 CONCLUSÃO	65
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
8 ANEXOS	72
8.1 TERMO DE BIOÉTICA/BIOSSEGURANÇA	72
8.2 DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de tireoide

A glândula tireoide é a responsável pelo controle de diversos processos metabólicos no corpo humano através da produção e secreção de dois hormônios, T3 (triiodotironina) e T4 (tiroxina), os quais sua produção e secreção são reguladas através do TSH (hormônio adeno-hipofisiário). Esta glândula possui intensa atividade de produção e armazenamento desses hormônios, o que pode ocasionar em muitos indivíduos a presença de nódulos, podendo interferir ou não na atividade da glândula (Hartmann, 2015). Nos Estados Unidos cerca de 4 a 7% dos adultos apresentam nódulos palpáveis na tireoide, sendo 8 a 16% destes classificados como câncer de tireoide (Burman & Wartofsky, 2016). Dados epidemiológicos obtidos por um estudo realizado no EUA, estimam 1,735,350 novas neoplasias em 2018, sendo 856,370 mil em homens, dos quais 323,630 chegaram a óbito e 878,980 mil em mulheres e sendo 286,010 óbitos. Os tumores do sistema endócrino foram estimados em 56,430 novos casos em 2018 e destes, 53,990 são de câncer de tireoide, tornando-o a neoplasia endócrina mais prevalente. As mulheres apresentam o maior número de casos novos, 40,900, levando a 2,060 mortes, enquanto os homens apresentaram apenas 13,090 casos e 960 mortes (Siegel, Miller, & Jemal, 2018). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que no Brasil em 2018 a cada 100 mil habitantes, 1,560 homens e 8,040 mulheres apresentaram novos casos de câncer de tireoide, o qual encontra-se como o quinto tipo mais incidente em mulheres, apresentando 4% do total de casos no ano (INCA, 2018). Em ordem mundial, 36 tipos diferentes de câncer foram responsáveis por 18,078,957 novos casos em 2018 e 9,555,027 chegaram a óbito. Desses, 567,233 indivíduos foram acometidos por câncer de tireoide, os quais 41,071 chegaram a óbito (Bray et al., 2018).

O câncer de tireoide possui diversos subtipos que são classificados através de suas características histológicas. Esta neoplasia pode ser derivada das células foliculares, as quais são classificadas em: carcinoma folicular papilífero (PTC), subtipo mais frequente, com 80% dos casos; carcinoma folicular da tireoide (FTC) sendo cerca de 15% dos casos e carcinoma anaplásico da tireoide (ATC), acometendo cerca de 2% dos pacientes. Além disso, os carcinomas derivados das células C ou para-foliculares são denominados carcinomas medulares da tireoide (MTC), em 3% do total de casos (Maciel, Kimura, & Cerutti, 2005).

1.2 Alterações genéticas no câncer de tireoide

No câncer de tireoide, principalmente os subtipos PTC e FTC, são observadas diversas alterações genéticas que influenciam na sua progressão e agressividade. Estas podem ser alterações pontuais, como as observadas no gene *BRAF* e *RAS*, que comumente aparecem em 35-70% dos casos de PTC e 50% dos casos de FTC, respectivamente (Fukushima & Takenoshita, 2005). Alterações estruturais, como rearranjos cromossômicos do tipo *RET/PTC* e *PAX8/PPARc* (Omur & Baran, 2014) são observados em aproximadamente 10-20% dos casos de PTC (Jhiang et al., 1992).

A mutação pontual *T1799A* no gene *BRAF* causa a substituição do aminoácido valina por ácido glutâmico (V600E) na proteína, e está presente em cerca de 44% dos casos de PTC e 24% em ATC. Esta alteração induz uma modificação de conformação proteica, induzindo a ativação sustentada da via de sinalização MAPK, envolvida no controle da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Especificamente a mutação *BRAFT1799A* induz alterações transcricionais, epigenômicas e proteômicas, que trazem uma característica fenotípica relacionada a agressividade do PTC, de forma que estas alterações levam a um maior risco de metástase em linfonodos e à distância, e invasão de tecidos extra-tireoideanos (Cancer Genome Atlas Research, 2014; Hall & Kudchadkar, 2014). Neste contexto, são frequentemente observadas intensa perda de diferenciação e transição Epitélio-para-Mesênquima (T.E.M.), o que contribui para o aumento do potencial migratório, remodelagem da matriz extracelular e o processo metastático. Adicionalmente, mecanismos imunossupressores e processos inflamatórios no microambiente tumoral têm sido recentemente relacionados à agressividade tumoral (Aiello & Kang, 2019; Leelawattanachai et al., 2015; Schellerer et al., 2014; Shalpour & Karin, 2015).

O gene *RET*, diferentemente da mutação pontual *BRAFT1799A*, confere características menos agressivas. Este gene, está localizado no braço longo do cromossomo 10 e não se encontra expresso nas células foliculares tireoideanas normais, apenas nas células para-foliculares. Este gene codifica para um receptor de membrana, o qual é ativado pelo seu ligante, o fator de crescimento neurotrófico derivado de células da glia (GDNF), necessitando também da presença de outros fatores como TGF- β e glicosaminoglicanos para auxiliar na sua função (Maciel et al., 2005). No entanto, rearranjos cromossômicos podem fundir a região 5' de diferentes genes expressos na

célula folicular, e conseqüentemente sua região promotora com parte da região codificadora do gene *RET*. Desta forma, o transcrito resultante do rearranjo *RET/PTC* codificará para uma proteína de fusão intracitoplasmática, expressa na célula folicular, capaz de ativar constitutivamente a via de sinalização MAPK, aumentando a capacidade de proliferação, sobrevivência e migração celular.

A partir de 2005, diferentes estudos evidenciaram a expressão diferencial de microRNAs (miRNA) como *miR-221*, *-222*, e *-146*, no câncer de tireoide, apontando importante relação com a patogênese do PTC. (He et al., 2005; Pallante et al., 2006). Foi visto ainda, resultados que apresentaram a expressão alterada de miRNAs em resposta à ativação dos oncogenes *BRAFT1799A* e *RET/PTC* sugerindo a relação entre o controle da expressão de miRNAs e as alterações genéticas mais comuns nas neoplasias tireoidianas (Cahill et al., 2007; Cahill et al., 2006).

1.3 microRNAs

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA fita simples (aproximadamente 19-25 nucleotídeos) que não são codificados em proteínas, mas que possuem uma importante função reguladora pós-transcricional na expressão gênica de plantas e animais. Esta regulação ocorre pela sua interação com a região 3' não traduzida de mRNAs (RNAs mensageiros), permitindo um controle dos níveis proteicos sem que haja alterações na função transcricional do gene (Kim, 2005). O *lin-4* foi o primeiro RNA regulador descrito em 1993, em *C. elegans*. Esta molécula, até então não descrita como um miRNA, atuava na regulação da expressão da proteína *lin-14* que estava ligada ao desenvolvimento larval do nematódeo (R. C. Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993). Após sete anos da descoberta do *lin-4*, um segundo RNA regulador presente em *C. elegans*, foi descrito e denominado *let-7*, o qual é responsável pela diminuição da expressão da proteína *lin-41* durante a passagem do estágio L4 do nematódeo para a fase adulta (Reinhart et al., 2000). Posteriormente em 2001, diversos estudos evidenciaram uma variedade de miRNAs em diferentes espécies (Lagos-Quintana, Rauhut, Lendeckel, & Tuschl, 2001; Lau, Lim, Weinstein, & Bartel, 2001; R. C. Lee & Ambros, 2001). Atualmente, avançaram os estudos com miRNAs em diversas áreas como, por exemplo, câncer, doenças neurodegenerativas e autoimunes (Acunzo, Romano, Wernicke, & Croce, 2015; Juzwik et al., 2018; Tolosa et al., 2018). São catalogados na plataforma de dados miRBase, 1917 genes de miRNAs, responsáveis pela transcrição de cerca de 2.654 miRNAs maduros em humanos (Acesso em setembro de 2018).

A biogênese dos miRNAs se inicia com a transcrição a partir do respectivo gene pela RNA polimerase II, gerando um transcrito primário (pri-miRNA) que contém cap 5' e cauda poli(A). Ainda no núcleo o pri-miRNA é clivado pela RNase III Drosha e seu cofator DGCR (Jhiang et al., 1992) formando a molécula precursora do miRNA maduro, denominada pre-miRNA contendo apenas a estrutura em forma de grampo (hairpin) presente no pri-miRNA (Kim, 2005). Para que o processo de maturação do miRNA continue, é necessário que a molécula seja transportada para o citoplasma, mecanismo este que é realizado pela Exportina-5 (Exp5) que utiliza de Ran-GTP como co-fator. Após o transporte, o pre-miRNA é processado pela RNase III Dicer gerando uma fita dupla de aproximadamente 19-25 nucleotídeos. Após a incorporação a complexo multimérico RISC (*RNA-induced silencing complex*), composto principalmente por proteínas Argonautas, ocorre a maturação do miRNA, onde uma das fitas do duplex é liberada. O complexo RISC-miRNA (miRISC) irá atuar no controle pós-transcricional dos genes alvos, tendo importante papel no controle de vias de regulação das células humanas (**Figura 1**). Alterações neste processo de regulação pós-transcricional são observadas em diversas patologias do corpo humano, incluindo neoplasias. Esta regulação ocorre por meio de um pareamento imperfeito entre o miRNA maduro e a região 3' UTR do RNA mensageiro, impedindo a tradução do mRNA em proteínas. Devido ao pequeno tamanho e a não necessidade de um pareamento completo, os miRNAs podem agir em conjunto na regulação de um mRNA, e também atuar em mais de um RNA mensageiro (Bartel, 2004), compondo assim uma rede de regulação pós-transcricional extremamente complexa.

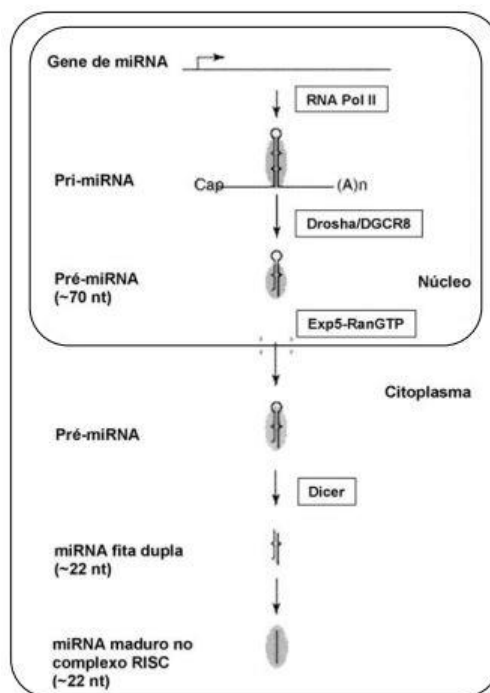


Figura 1. Biogênese dos miRNAs. A transcrição do RNA mensageiro é feita pela enzima RNA polimerase II, gerando um transcrito primário (pri-miRNA) que é clivado pela enzima RNase III DROSHA ainda no núcleo, gerando um transcrito menor em forma de grampo (premiRNA). O pre-miRNA é exportado ao citoplasma pelo complexo Exportina-5/ Ran-GTP e processado pela enzima DICER, gerando transcritos de fita dupla de 19 a 25 nucleotídeos que após a incorporação ao complexo RISC, uma das fitas é liberada do transcrito e a outra permanece incorporada ao complexo, formando assim a molécula de miRNA maduro que irá atuar no seu respectivo alvo por pareamento imperfeito, impedindo sua tradução. Adaptado de (Ricarte Filho & Kimura, 2006)

1.4 MicroRNAs e o Câncer

Os miRNAs estão envolvidos em diferentes processos biológicos de animais e plantas, relacionados a proliferação, desenvolvimento, embriogênese, diferenciação celular, apoptose e em diversos outros processos fisiológicos que estão diretamente envolvidos com a patogênese de doenças humanas (Aukerman & Sakai, 2003; X. Li et al., 2016; Palatnik et al., 2003; Sekar, Venugopal, Sekar, & Ramalingam, 2016). Em 2002 foi publicado o primeiro estudo associando a desregulação de miRNAs e câncer, descrevendo a deleção ou regulação negativa de *miR-15a* e *miR-16-1* em Leucemia Linfocítica Crônica (Calin et al., 2002). A partir disso estudos envolvendo os diferentes tipos de câncer vem sendo publicados afim de elucidar os processos biológicos que os diferentes miRNAs estão envolvidos. Em 2018 estudos sobre câncer de mama foram publicados descrevendo a atuação de *miR-215* na diminuição da proliferação celular e *miR-125-5p* inibindo a proliferação, metástase e invasão celular (Leblanc et al., 2018; Y Li et al, 2018). Em câncer de próstata o *miR-206* atua na regulação da transição epitélio mesenquimal e inibe a invasão e proliferação celular através da modulação de anexin

A2 (N. Yang et al., 2018). Sabe-se também que *miR-421* está associado a um pior prognóstico em câncer de pulmão (Y. Li, et al., 2018). Além disso, diversos miRNAs foram identificados como biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico de diferentes tipos de câncer, ajudando inclusive na estratificação tumoral, isto é, na classificação de risco da doença (Ghorbanmehr et al., 2018; Hu et al., 2018; Kolluru et al., 2018; Peng, Gu, & Yan, 2018).

No câncer de tireoide, apesar do número de estudos funcionais aumentar recentemente, o papel de miRNAs no câncer de tireoide permanece pouco esclarecido. Neste contexto, estudos utilizando análises funcionais *in vitro*, mostram que *miR-146b-5p* modula negativamente a transdução do sinal da via TGF- β , importante via para a tumorigênese da tireoide, contribuindo para aumentar o potencial proliferativo e migratório em linhagens de células foliculares tireoideanas (Geraldo, Yamashita, & Kimura, 2012; Lima et al., 2016). No carcinoma anaplásico de tireoide (ATC) miRNAs das famílias *miR-200* e *miR-30* são regulados negativamente e participam ativamente de processos biológicos ligados a migração, invasão, celular e transição epitélio-mesenquimal (Fuziwara & Kimura, 2014). Estudos recentes contribuíram para consolidar o papel de diversos miRNAs como importantes agentes envolvidos na diminuição e inibição de processos ligados a progressão tumoral, como migração celular, apoptose, invasão e proliferação celular (Gong et al., 2018; P. Li, Dong, & Wang, 2018; X. Wang & Qi, 2018; Yan et al., 2018; X. Zhang et al., 2018).

Os miRNAs formam uma complexa rede regulatória pós-transcricional, que se torna um fator limitante para as análises funcionais destas moléculas, as quais em grande parte do entendimento, provém da identificação de alvos. Desta forma a análise computacional através da predição de alvos combinada à análise de dados de expressão gênica presente em bancos públicos, auxilia a caracterização biológica de miRNAs em diversos processos biológicos, incluindo o câncer (Betel et al., 2010; Betel et al., 2008; Hu et al., 2018). No câncer de tireoide por exemplo, análises *in silico* estimam que miRNAs podem contribuir com agressividade e progressão do carcinoma papilífero de tireoide através da modulação de moléculas de remodelagem da matriz extra-celular e mediadoras do sistema imunológico (Geraldo & Kimura, 2015). Além disso, análises computacionais realizadas pelo mesmo grupo de pesquisa sugerem que miRNAs situados na região 14q32, denominada DLK1-DIO3, potencialmente modulam uma complexa rede de regulação com impacto sobre a migração, adesão, remodelagem de matriz extra-celular

e angiogênese (**Figura 2**)(Geraldo, Nakaya, & Kimura, 2017). Esta região cromossômica abriga mais de 50 genes de miRNAs, os quais se encontram com expressão diminuída em modelo murino de PTC, linhagens celulares tumorais tireoidianas e amostras de PTC humano, o que torna estes miRNAs fortes candidatos a supressores tumorais (Geraldo et al., 2017). Os genes localizados nesta região que codificam para proteínas, como *DLK1*, *RTL1*, e *DIO3*, são expressos a partir do alelo paterno enquanto aqueles que transcrevem RNAs não codificadores, como *MEG3*, *MEG8*, o antisense *RTL1* e todos os miRNAs são expressos maternalmente (Benetatos et al., 2013). Recentes estudos constataram que portadores da síndrome de Temple, nos quais é observada deleção parcial ou total da região *DLK1-DIO3*, apresentam risco aumentado de desenvolver câncer de tireoide prematuramente (Severi et al., 2016), sugerindo um papel crucial desta região na biologia da célula folicular tireoidiana.

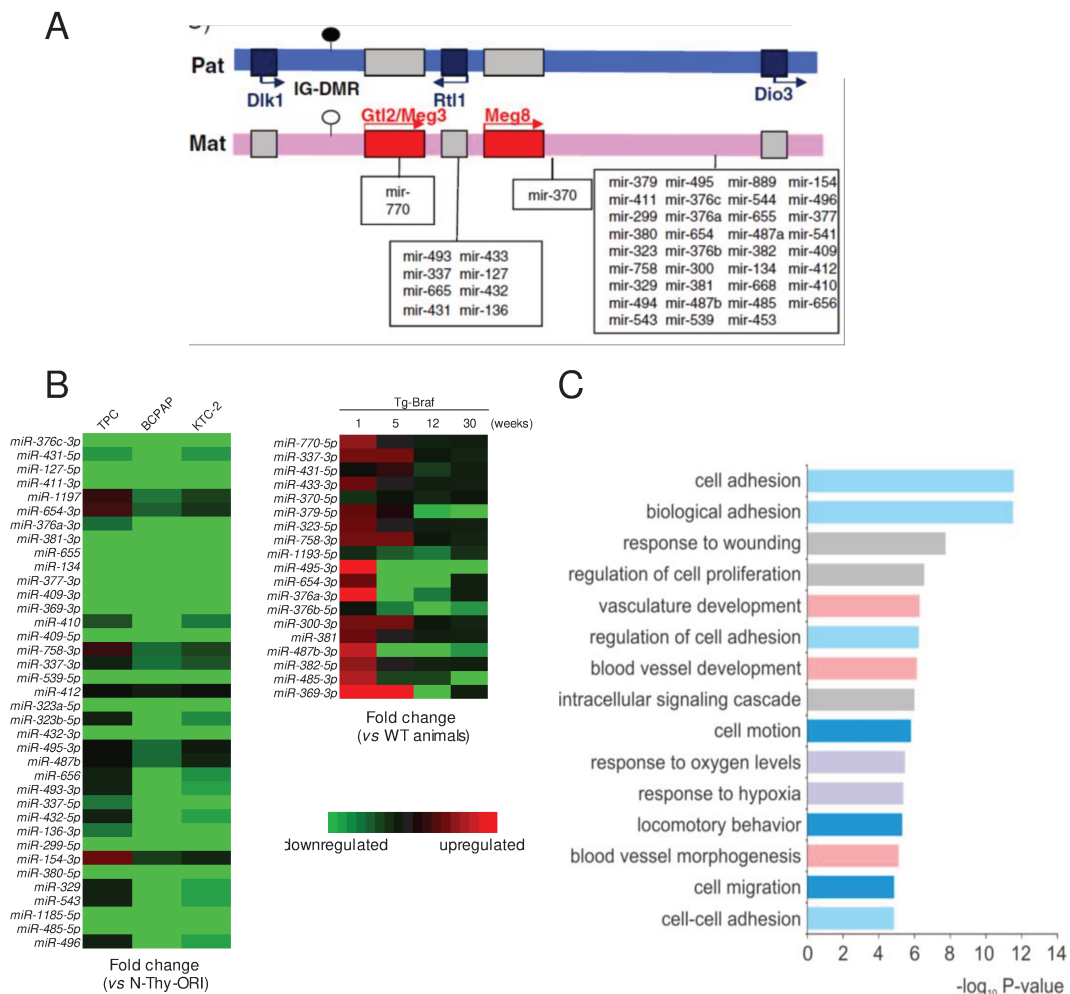


Figura 2. A região genômica *DLK1-DIO3*. (A). Os genes *DLK1*, *RTL1* e *DIO3* são expressos a partir do alelo paterno, enquanto os genes não codificadores de proteínas *MEG3*, *MEG8* e os miRNAs são expressos a partir do alelo materno. A expressão dos genes desta região é controlada por mecanismos epigenéticos durante o desenvolvimento, a partir da região intergênica diferencialmente metilada (IG-DMR) (Adaptado

de Zehavi et al., 2012). **(B)** Análise em larga escala da expressão de miRNAs da região DLK1-DIO3 em linhagens celulares tumorais de tireoide e em modelo murino de progressão do carcinoma papilífero. O heatmap representa a expressão diferencial em linhagens tumorais em relação à linhagem de células foliculares normais (N-Thy-ORI) e de carcinoma papilífero (TPC-1 e BCPAP) e de carcinoma anaplásico (KTC-2) de tireoide. (Adaptado de Geraldo et al., 2017). **(C)** Análise de enriquecimento em lista de genes-alvo dos miRNAs da região DLK1-DIO3. As barras evidenciam a significância estatística (no eixo X, expressa em $-\log P$ -valor) encontrada após teste exato de Fisher. Os processos biológicos e vias de sinalização enriquecidos estão representados no eixo Y (Adaptado de Geraldo et al., 2017).

A literatura demonstra a região DLK1-DIO3 como um importante cluster de miRNAs envolvidos em diversas patologias humanas, entre elas o câncer (Benetatos et al., 2013), no entanto pouco se sabe sobre o papel biológico dos miRNAs da região DLK1-DIO3 no câncer de tireoide, assim como o potencial destas moléculas como supressoras tumorais. Sabe-se que alguns os níveis transcricionais de alguns miRNAs da região DLK1-DIO3, *miR-370*, *miR-323* e *miR-127*, são reduzidos pela ativação oncogênica tanto pelo oncogene *BRAFT1799A* quanto pelo rearranjo *RET/PTC* em linhagens tumorais de PTC (Cahill et al., 2007; Cahill et al., 2006). Desta forma, o presente estudo tem como objetivo identificar miRNAs com atividade supressora tumoral no PTC. Utilizando programas computacionais disponíveis *online* e gratuitamente, visamos identificar, entre o grande número de miRNAs situados na região DLK1-DIO3, aqueles com maior potencial para a regulação de oncogenes e processos-chave para a progressão tumoral, para a subseqüente validação funcional *in vitro*. Esperamos que os resultados obtidos neste estudo possam contribuir com o entendimento da patogênese, diagnóstico e tratamento do câncer de tireoide.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade supressora tumoral de miRNAs situados na região DLK1-DIO3 e sua contribuição para o estabelecimento e progressão do carcinoma papilífero de tireoide.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Análise bioinformática para a identificação de miRNAs da região DLK1-DIO3 com potencial papel supressor tumoral e seleção para análise funcional;

II. Construção de modelo de super-expressão de miRNA candidato em linhagens celulares tumorais de tireoide;

III. Análise do impacto da restauração da expressão do miRNA candidato sobre o estabelecimento e progressão tumoral *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Identificação e seleção de candidatos para a validação experimental

Análise in silico dos alvos potenciais dos miRNAs desregulados: O programa miRWalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>) foi utilizado para a predição computacional de alvos de cada um dos miRNAs diferencialmente expressos. Este programa permite comparar as listas de potenciais alvos geradas por 12 diferentes programas, como por exemplo o TargetScan (www.targetscan.org) e o PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>). Para cruzar os dados foi construída uma matriz onde foram organizados nas linhas os potenciais alvos preditos para cada miRNA e nas colunas cada miRNA da região DLK1-DIO3.

Para a otimização da estratégia de identificação de miRNAs com atividade supressora tumoral, associamos à matriz construída dados de expressão gênica em larga escala oriundos dos bancos *Gene Expression Omnibus* (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) e do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA, <http://cancergenome.nih.gov/>). Resumidamente, foram utilizados dados de análises da expressão gênica entre tecido tireoideano normal e tumoral obtidos previamente a partir de 5 estudos no GEO, compreendendo 101 amostras de PTC e 69 tecidos normais, foram processados utilizando a ferramenta estatística GEO2R (Geraldo & Kimura, 2015). Cada gene foi considerado diferencialmente expresso quando o P-valor ajustado foi menor que 0,01 e concordante em pelo menos 3 dos 5 estudos. Da mesma forma, foram utilizados dados de expressão de mRNAs, em nível 3, de 437 amostras de PTC humano e 59 amostras de tecido tireoideano normal, previamente obtidos do projeto TCGA (Geraldo et al., 2017). Assim a lista de potenciais genes-alvo obtida utilizando o programa miRWalk foi comparada à lista de mRNAs diferencialmente expressos nos diferentes datasets (GEO e TCGA). Uma vez que miRNAs da região DLK1-DIO3 encontram-se com expressão diminuída no PTC, buscamos por potenciais alvos com expressão aumentada nos datasets. Além disso, genes com diferença de expressão menor de 25% (fold change >1,25) e aqueles sem diferença estatística ($p > 0,05$) foram ignorados.

Construção de redes regulatórias exercidas por miRNAs: Para a identificação de potenciais vias de sinalização e processos biológicos relevantes para o câncer de tireoide utilizamos a ferramenta online DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>), a qual possibilitou a identificação de enriquecimento em listas de genes (*Gene Set Enrichment Analysis*). Categorias ontológicas foram analisadas com base no enriquecimento da lista de alvos

modulados pelos miRNAs da região DLK1-DIO3, sua potência de enriquecimento (*fold enrichment*), significância estatística e razão de falso descobrimento (FDR). Desta forma, conseguimos identificar miRNAs candidatos com papel chave nas redes regulatórias, ou seja, aqueles que atuam sobre vias de sinalização e processos biológicos importantes para o desenvolvimento e progressão do câncer de tireoide. Para fortalecer nossa estratégia para identificar miRNAs envolvidos na supressão tumoral, realizamos buscas enviesadas para processos biológicos relacionados ao câncer, como por exemplo, “*Cell-cycle*”, “*Cell adhesion*”, “*regulation of cell migration*”, “*extra-cellular matrix*”, “*positive and negative regulation of apoptosis*” e “*cell-cell adhesion*”. Além disso foi realizado o cruzamento da lista de potenciais alvos com 98 oncogenes bem caracterizados na literatura.

Após a identificação dos miRNAs candidatos à validação funcional, potencialmente envolvidos na supressão tumoral, foi realizada uma nova análise da lista de alvos preditos para um único miRNA escolhido, utilizando a ferramenta Kegg Mapper, Kyoto Encyclopédia of Genes and Genomes (<https://www.genome.jp/kegg/mapper.html>). Esta ferramenta possibilita a análise de uma lista de genes de interesse e de forma integrada e visual, é possível visualizar as vias de sinalização e processos biológicos anotados na plataforma com os quais os genes inseridos estão relacionados. Neste caso, foram utilizadas as listas de genes alvos do miRNA selecionado. Desta forma, foi possível selecionar genes alvo com expressão aumentada em relação ao PTC este miRNA em vias de interesse para a progressão do câncer, principalmente aquelas envolvidas em processos de migração, invasão e proliferação celular. Os genes com expressão aumentada no PTC foram destacados em vermelho nas vias de sinalização e processos biológicos relevantes.

4.2 Cultura celular

Duas linhagens celulares mantidas em nosso laboratório com diferentes *backgrounds* genéticos, foram utilizadas para avaliar a atividade supressora tumoral do *miR-485-5p* no câncer de tireoide. As linhagens derivadas de carcinoma papilífero humano TPC-1 e BCPAP, possuem o rearranjo cromossômico *RET/PTC1* e a mutação *BRAFT1799A*, respectivamente. As linhagens celulares foram gentilmente cedidas pela Profa Dra Edna Teruko Kimura (Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo). As linhagens TPC-1 e BCPAP foram mantidas em meio DMEM suplementadas com 5% e 10% de soro fetal bovino (SFB, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), respectivamente,

em estufa sob condições de 95 % de ar e 5 % de CO₂, a 37°C, na presença de 1 X solução antibiótica e antifúngica (*Antibiotic-Antimycotic, 100X*, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL, e anfotericina B 25 µg/mL, Thermo Fisher, Grand Island, NY, USA).

4.2.1 Transfecção transiente do mimético do *hsa-miR-485-5p*

Para a superexpressão do *hsa-miR-485-5p* utilizou-se um mimético comercial, mirVana™ (PN. MC10837, Thermo Fisher, Pleasanton, CA, USA). As linhagens celulares foram plaqueadas em triplicatas e após 24 horas o meio de cultura foi substituído por meio apropriado na ausência de SFB. Para a padronização, o mimético foi transfectado em duas concentrações, 10 e 25 nM, *overnight*, utilizando lipídeo catiônico Lipofectamine 2000® (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA), segundo instruções do fabricante. O meio sem soro foi então retirado, as células foram lavadas com PBS (*Phosphate Buffer Saline* – NaCl 0.137 M, KCl 0.0027 M, Na₂HPO₄ 0.01 M, KH₂PO₄ 0.0018 M) e novo meio de cultura, com soro fetal, foi adicionado. Em todos os experimentos subsequentes um grupo de células foi submetido à transfecção com lipídeo catiônico, porém não recebeu mimético e foi denominado grupo Mock. A restauração da expressão de *miR-485-5p* foi confirmada por RT-qPCR.

4.3 Migração celular

4.3.1 Migração em ensaio de lesão em monocamada

As linhagens foram previamente submetidas à transfecção com mimético do *miR-485-5p*, conforme descrito acima. Em seguida, com o auxílio de uma ponteira de 200 µL estéril, realizou-se uma lesão em linha vertical na monocamada celular no centro de cada poço (**figura 3A**). O processo de cicatrização foi registrado com câmera (Moticam 2500) acoplada ao computador logo após a realização da lesão nos tempos 0, 16 e 24 h. Para que não houvesse interferência da proliferação celular nas análises, o tempo máximo determinado foi de 24 horas. As imagens obtidas foram registradas em triplicadas referentes a cada poço analisado, e posteriormente com o auxílio do ImageJ®, foram feitas as medidas da distância das lesões nos diferentes tempos. Cada imagem foi medida em três diferentes pontos, os valores da distância em pixels foram coletados para aplicação estatística e construção dos gráficos, com auxílio do programa GraphPad Prism versão 6.0 (**figura 3B**).

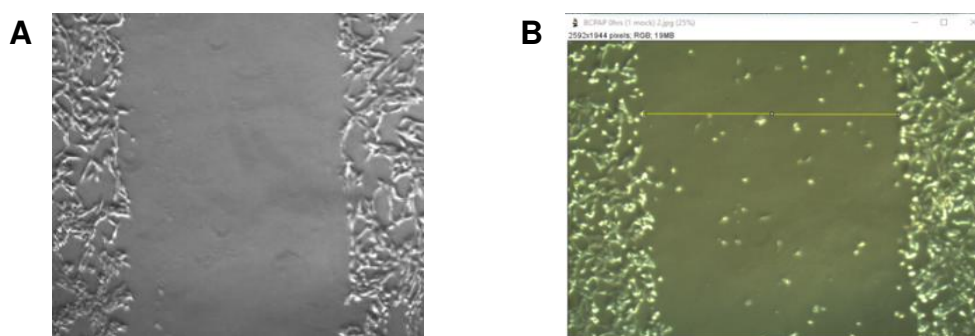


Figura 3. Modelo de lesão em monocamada de células *in vitro*. (A) Microscopia de contraste de fase da monocamada celular lesionada da linhagem celular tiroideana TPC-1. (B) Análise das fotomicrografias por ImageJ®. Fotomicrografia da lesão apresenta um exemplo da medida feita, indicada na barra amarela. As medidas foram feitas em triplicatas, coletando as distâncias em pixels em três diferentes pontos da imagem. Os valores da distância foram coletados e a média de cada ponto foi utilizada para a construção dos gráficos. Aumento 40x.

4.3.2 Migração e invasão em câmara de boyden modificada

O ensaio de migração celular foi realizado usando câmara de Boyden modificada contendo insertos de membrana com poros de 8,0 μm (Corning, Billerica, MA). Após a transfecção com mimético 2×10^4 células foram ressuspensas em meio contendo 0,5% de soro fetal bovino e plaqueadas no compartimento superior da câmara. O compartimento inferior foi preenchido com meio contendo 10% de soro fetal bovino. Após 12 h, o meio de cultura foi removido e a câmara foi lavada duas vezes com PBS. As células do compartimento superior foram removidas e as células no compartimento inferior foram fixadas, coradas com 0,5% Violeta Cristal e fotografadas em microscópio Nikon Eclipse E600. Para os ensaios de invasão celular, foi utilizado 7,5 μL de matriz extracelular (ECM Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma – liquid, BioReagent 8,42 μg), diluída em 22,5 μL de DMEM, e foram plaqueados 30 μL da matriz diluída na parte superior de cada inserto. Após o plaqueamento da matriz, a placa contendo os insertos foi colocada em estufa a 37°C durante duas horas para solidificação da matriz. Posteriormente a preparação dos insertos com matriz, seguiu-se o mesmo protocolo de plaqueamento, coleta das amostras e fotografia do ensaio de migração.

4.4 Proliferação celular

4.4.1 Curva de crescimento

As linhagens foram previamente submetidas à transfecção com mimético *miR-485-5p*, conforme descrito acima, e após 24 h foram tripsinizadas e semeadas na densidade $2,5 \times 10^4$ células/poço em placas de 12 poços. Nos períodos 48 e 72 h, as células foram tripsinizadas, fixadas em 3,7 % formaldeído e mantidas a 4 °C até o momento da

contagem, a qual foi realizada em câmara de Neubauer utilizando microscópio OPTIKA® C-B5 (Ponteranica, BG, Italy).

4.4.2 Ensaio de MTT

O MTT é um ensaio colorimétrico quantitativo baseado na clivagem do sal amarelo brometo de difenil tetrazólio (MTT, Amresco, Solon, OH, EUA) pela enzima mitocondrial dehidrogenase e a subsequente formação do cristal azul escuro insolúvel, que se acumula somente no interior das células viáveis. A absorbância detectada em espectrofotômetro é diretamente proporcional ao número de células viáveis. As células foram semeadas em placa de 96 poços na densidade de 5×10^3 células por poço. MTT foi adicionado 24 h após a transfecção com mimético do *miR-485-5p*, seguido de incubação por 3 h. Após este período, as células foram solubilizadas com uma solução de isopropanol/ HCL 0,4 M e a leitura do sinal foi realizada em espectrofotômetro SpectraMax Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA).

4.4.3 Morte celular

Os índices de morte celular, necrose e apoptose, foram medidos nas linhagens TPC-1 e BCPAP transfectadas com o mimético de *miR-485-5p* nas concentrações de 10 e 25 nM. Para tanto, as linhagens foram semeadas em densidade de 1×10^5 células em placas de 6 poços. Após 24 h de transfecção, o meio de cultura foi coletado para a preservação de células mortas, e as células aderidas foram lavadas 2 vezes em PBS e tripsinizadas. A seguir, foram coletadas em tubos de 1,5 mL, centrifugadas a $500 \times g$ por 10 min e 1×10^6 células foram ressuspendidas em 1X Annexin-V Binding Buffer, parte do Kit Annexin-V FITC Apoptosis (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), seguindo instruções do fabricante para a incubação com Annexin-V FITC e iodeto de propídeo (PI). A leitura dos sinais fluorescentes foi realizada em citômetro de fluxo FACS Calibur™. Foram consideradas células viáveis aquelas com baixa marcação para FITC e PI. Células em apoptose foram consideradas aqueles com alta marcação para FITC e células em necrose aquelas com baixa marcação para FITC e alta marcação para PI. Para a correta normalização dos dados, foram captados os dados de fluorescência de 50.000 eventos para cada amostra.

4.5 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real

4.5.1 Extração de RNA total

Para extração de RNA, foram plaqueadas 1×10^5 células em placas P60, transfectadas com mimético de *miR-485-5p* e coletadas após 24h em trizol. O RNA total foi extraído das linhagens celulares em questão TPC-1 (mock, 10 e 25nM) e BCPAP (Mock, 10 e 25nM) baseado em Chomczynski and Sacchi (1987).

4.5.2 Síntese de DNA complementar

A expressão do *miR-485-5p* e do controle endógeno *RNU6B* foi analisada através de ensaios de PCR em Tempo Real utilizando o kit de quantificação de miRNAs *Taqman® MiRNA Assays* específico para este miRNA (Part Numbers: *miR-485-5p* – 001036; *miR-495-3p* – 001663; *RNU6B* – 001093, Applied Biosystems). Este sistema utiliza síntese dirigida de cDNA para o RNA de interesse (*miR-485-5p*, *miR-495-3p* ou *RNU6B*) pelo método *Stem-Loop* onde o *primer* específico para o RNA provoca a formação de um grampo sobre si mesmo, gerando maior estabilidade para a transcrição reversa (Chen et al., 2005). Para maximizar a síntese de cDNA deste miRNA, foi utilizado o kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Assim, de acordo com instruções do fabricante, 10 ng de RNA total foram utilizados para a síntese, na presença de 1,5 μL de tampão 10x, 0,15 μL de mix de dNTP (100 mM), 0,19 μL de inibidor de RNases (20 U/ μL) e 1 μL de transcriptase reversa *Multiscribe®* (50 U/ μL), e 3 μL de *primer* específico, para *miR-485-5p*, *miR-495-3p* ou *RNU6B*, e 4 μL de H₂O destilada e deionizada (ddH₂O). A reação foi realizada no gelo e depois submetida a 16 °C por 30 min, 42 °C por 30 min, seguida de inativação da transcriptase a 85 °C por 5 min, em termociclador ABI 7300 Sequence Detection System (Thermo Fisher). A síntese de cDNA utilizada para a quantificação do controle endógeno *RPL19* e dos demais genes-alvo analisados foi realizada utilizando 2 μg de RNA total, 1 μL de DTT (100 mM), 1 μL de inibidor de RNase (20 U/ μL), 1 μL de mix de dNTP (10 mM) e 1 μL de transcriptase reversa M-MLV (*Murine-Moloney Leukemia Virus*, Thermo Fisher). A reação foi mantida a 21 °C por 10 min, a 42 °C por 30 min, seguida de inativação da transcriptase a 99 °C por 10 min, em termociclador ABI 7300 Sequence Detection System (Thermo Fisher).

4.5.3 PCR quantitativo em tempo real

Para a quantificação do produto formado durante a reação de PCR para miRNAs foi utilizado o kit *Taqman® MiRNA Assay* Taqman® (Applied Biosystems). Assim, foram usados 1,33 µL da síntese de cDNA, 10 µL de TaqMan® MicroRNA Master Mix, No AmpErase (Applied Biosystems), 1 µL do mix contendo sonda e primers específicos para *miR-485-5p* ou *RNU6B*, e 7,67 µL de ddH₂O. Para a quantificação do produto formado durante a reação de PCR para os genes alvos, foi utilizado o reagente *SYBR® Green Dye* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em volume final de 20 µL, utilizando 5 µL de cDNA diluído 10 vezes a partir do volume final da síntese de cDNA (~5 ng), 5 µL de *primers* específicos, e 10 µL do reagente *2x Master Mix SYBR® Green* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em termociclador ABI 7300 Sequence Detection System® (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, e 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. Para as reações de qPCR utilizando *SYBR® Green Dye*, a especificidade da reação foi avaliada, após o término da reação, através da análise da dissociação do produto amplificado. O programa 7300 SDS Software foi utilizado para a análise dos dados obtidos. Uma lista com os *primers* específicos sintetizados para a detecção da expressão dos genes alvos e os controles endógenos utilizados, está demonstrada na **Tabela 1**.

Tabela 1- Oligonucleotídeos usados para análise da expressão gênica.

<i>Gene</i>	<i>Nome Oficial</i>	<i>Nº de acesso</i>	<i>Seqüência (5'-3')</i>
<i>GAB2</i>	<i>GRB2 associated binding protein 2</i>	<i>NM_080491</i>	F-ATCTCCACCCAGAGCATCAC R-GAACGGGAGATGCAGACACT
<i>RAC1</i>	<i>Rac family small GTPase 1</i>	<i>NM_018890</i>	F-AGAAGCTGACTCCCATCACC R-CTTGAGGCCTCGCTGTGT
<i>ICAM1</i>	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>	<i>NM_000201</i>	F-AGCTTCTCCTGCTCTGCAAC R-CATTGGAGTCTGCTGGGAAT
<i>ITGA3</i>	<i>integrin subunit alpha 3</i>	<i>NM_005501</i>	F-TATTCCTCCGAACCAGCATC R-TCCGAGTCAATGTCCACAGA
<i>EREG</i>	<i>Epiregulin</i>	<i>NM_00143</i>	F-TCCCAGGAGAGTCCAGTGAT R-ATTGACACTTGAGCCACACG
<i>LMNA</i>	<i>lamin A/C</i>	<i>NM_170707</i>	F-CATGGAGATCCACGCCTAC R-CCTGTGTCTGGGATGAGTGA
<i>RPL19</i>	<i>ribosomal protein L19</i>	<i>NM_000981</i>	F-AACAAGCGGATTCTCATGG R-GCGTGCTTCCTGGTCTTAG

4.5.4 Cálculo da expressão gênica diferencial

Primeiramente, para a quantificação da expressão gênica, a concentração dos *primers* utilizados na reação de qPCR foi padronizada. A concentração ideal de *primers* foi obtida realizando-se reações utilizando diferentes concentrações de primers (entre 200 nM e 800 nM) e concentração fixa de cDNA. Foi selecionada a menor concentração, sem formação de dímeros, que não comprometesse a curva de amplificação. Já para *miR-485-5p*, visto que o ensaio é otimizado pelo fabricante, não foi realizada esta etapa de padronização. O gene *RPL19*, que codifica uma proteína ribossomal, foi utilizado como normalizador (controle endógeno) nas reações de qPCR para a análise de mRNAs alvos. Para a análise da expressão de miRNAs o controle endógeno utilizado foi o gene *RNU6B* (Applied Biosystems).

4.6 Análise estatística

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação de miRNAs com potencial papel supressor tumoral

A região DLK1-DIO3 do cromossomo 14q32, contém 53 genes de miRNAs, os quais podem originar aproximadamente 100 miRNAs maduros, tornando complexa a análise funcional. Desta forma, afim de otimizar nossa investigação em relação a região DLK1-DIO3, diferentes recursos de bioinformática foram utilizados. Primeiramente a lista de nomes oficiais dos miRNAs da região DLK1-DIO3 foi obtida utilizando o programa Table Browser, da Universidade da Califórnia em Santa Cruz (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables>). Em seguida, foi utilizado o algoritmo de predição de alvos miRWalk (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>), versão 2.0, a partir do qual foram obtidas as listas de potenciais alvos de cada um dos possíveis miRNAs maduros oriundos na região DLK1-DIO3. As listas de alvos de cada miRNA foram combinadas e os alvos duplicados foram removidos. Em seguida foi construída uma matriz de interação entre os potenciais alvos preditos e cada miRNA da região DLK1-DIO3 (**Figura 4**). Devido ao grande número de alvos preditos encontrados, consideramos válidas apenas interações miRNA-alvo preditas pelo algoritmo TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/), uma vez que este considera a conservação entre espécies para classificar como termodinamicamente estável a interação entre um miRNA e seu alvo. Em seguida, em três diferentes construções, foram considerados válidos os alvos preditos por pelo menos 6, 7 ou 8 dos 12 algoritmos disponíveis no miRWalk, resultando em 13.756, 10.714 e 6.231 alvos, respectivamente. A última construção foi adotada para as análises subsequentes.

Em seguida, para selecionarmos interações válidas entre miRNAs e potenciais alvos, utilizamos dados de expressão de mRNAs oriundos de *datasets* depositados no GEO e no TCGA, previamente baixados e processados por análises bioinformáticas, conforme descrito na **seção 4, Material e Métodos**. Conforme exemplificado no **Quadro 1**, foram consideradas válidas apenas interações com genes-alvos com aumento da expressão de pelo menos 25% (fold change >1,25) e com significância estatística ($p < 0,01$). Desta forma, foram identificados 431 potenciais alvos, os quais foram submetidos à análise de enriquecimento em listas de genes (*Gene Set Enrichment Analysis*), utilizando a ferramenta online DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>).

≥ 6 algoritmos

Heatmap showing interaction counts for ≥ 6 algorithms. Rows include miRNAs (hs-miR-327-3p, etc.) and target genes (AT3N1, PAX3, CRM1, etc.). A yellow box highlights the total count of 13,756.

≥ 7 algoritmos

Heatmap showing interaction counts for ≥ 7 algorithms. Rows include miRNAs and target genes. A yellow box highlights the total count of 10,714.

≥ 8 algoritmos

Heatmap showing interaction counts for ≥ 8 algorithms. Rows include miRNAs and target genes. A yellow box highlights the total count of 6,231.

Figura 4. Construção da matriz de interações miRNA:alvo. Amostra representativa da construção da matriz de interações entre miRNAs da região DLK1-DIO3 e seus alvos preditos pelo programa miRWalk. Nas colunas estão representados os miRNAs da região DLK1-DIO3. Nas linhas estão representados os 15 primeiros potenciais alvos. Em cada interação miRNA:alvo está representado o número de algoritmos que consideram possíveis dada interação. Em amarelo o número total de alvos considerados válidos utilizando o número de ≥ 6, 7 ou 8 algoritmos.

Quadro 1. Matriz de interações miRNA:alvo e comparação com datasets de expressão gênica oriundas do Gene Expression Omnibus (GEO) e The Cancer Genome Atlas (TCGA). Amostra representativa da matriz de interações entre miRNAs e seus alvos preditos segundo o programa miRWalk. O número de algoritmos que predizem cada interação está mostrado. Foram consideradas válidas (✓) interações preditas por 8 ou mais algoritmos, com fold_change maior que 1,25 segundo o TCGA e aumento de expressão em pelo menos 3 dos cinco datasets do GEO.

Table with 5 columns: Alvos, miRNAs maduras, and Fold-change (TC vs Normal Tissue) for TCGA, Reyes, Salvatore, Giordano, He, and Tomas. Rows list target genes like SLC7A11, PLAG1, PRLR, PAPPA, CDH8, MED13, LONRF2, SOX11, NRP1, MEGF9, FRMPD4, FGM2L1, MYO6, PGR, PCSK2, CCND2, PLXNA4, DAGLA, AFF2, C1orf21, WNT5A, HMG2A, CPD, and ITPRIPL2. Red and green checkmarks indicate validity based on the criteria in the caption.

A **Figura 5A** evidencia, em um *heatmap*, o número de alvos potencialmente modulados por cada miRNA, em cada uma das 12 categorias ontológicas mais enriquecidas. O ranqueamento de miRNAs de acordo com o número de alvos potencialmente modulados revelou que, dentre os cerca de 100 miRNAs maduros que podem ser originados da região DLK1-DIO3, 24 miRNAs não participam da regulação dos alvos em questão, sem interação predita em nosso modelo de estudo. Além disso, interessante, apenas 10 miRNAs modulam juntos mais de 60% dos alvos, sendo que os miRNAs *hsa-miR-485-5p*, *hsa-miR-495-3p*, *hsa-miR-539-5p*, *hsa-miR-665*, *hsa-miR-381-3p* e *hsa-miR-300* potencialmente modulam 65 (15.08%), 64 (14.84%), 61 (14.15%), 50 (11.60%), 49 (11.36%) e 43 (9.97%) dos alvos, respectivamente. Estes miRNAs são, portanto, candidatos promissores à análise funcional *in vitro*.

Conforme mencionado anteriormente, a literatura mostra a região DLK1-DIO3 como um importante *cluster* de miRNAs envolvidos em diversas patologias humanas, entre elas o câncer (Benetatos et al., 2013). O *miR-485-5p* já foi descrito como supressor tumoral, inibindo vias relacionadas ao crescimento e mobilidade celular em câncer gástrico (Duan et al., 2017). Em câncer de mama este mesmo miRNA é capaz de diminuir a proliferação e invasão celular (Lou et al., 2016). Enquanto os miRNAs, *miR-495-3p* e *miR-381-3p*, agem como supressores tumorais em câncer gástrico, influenciando na malignidade e crescimento do tumor e com a diminuição da proliferação do carcinoma bucal, respectivamente (Eun et al., 2018; X. Yang et al., 2017). Estudos com o *miR-300* apontam sua ação em muitas vias de diversos tumores, como, promoção da apoptose e inibição da proliferação, invasão, migração e transição epitélio-mesenquimal no câncer de pâncreas e inibição de proliferação e metástase em câncer de laringe (Ge et al., 2016; Zhang et al., 2018). Christopher L. Haga e Donald G. Phinney (2012) exploraram sete miRNAs presentes no cluster da região DLK1-DIO3 (*miR-300*, *-382*, *-494*, *-495*, *-539*, *-543*, e *-544*), os quais em conjunto atuam na repressão de uma rede de sinalização que compreende TWIST1, BMI1, ZEB1/2 e miRNAs da família do *miR-200* (Haga & Phinney, 2012). De modo que o silenciamento do cluster, que ocorre via hipermetilação de ilhas CpG em carcinomas ductais mamários, confere alterações morfológicas, moleculares e de função consistentes com uma transição epitélio-mesenquimal. Além disso, os autores também demonstraram que alterações na expressão do *miR-544* podem influenciar na proliferação celular em diferentes tipos celulares (Haga & Phinney, 2012).

Entre as categorias ontológicas enriquecidas com significância estatística entre os alvos dos miRNAs da região DLK1-DIO3 estão importantes processos biológicos para o

câncer, como “*cell adhesion*”, “*cell junction*”, “*cell-substrate adhesion*”, “*extracellular matrix*” e “*programmed cell death*” (**Figura 5A**). De fato, estes resultados corroboram estudos prévios do grupo, onde a análise de enriquecimento de um grupo menor de miRNAs da região *DLK1-DIO3* sugere a modulação de aspectos importantes para a progressão tumoral, como “*cell-cell adhesion*”, “*intracellular signaling cascade*” e “*locomotory behavior*”, entre outros (Geraldo et al., 2017). Para validar a força dos miRNAs com melhor classificação no ranqueamento, e demonstrar que esses miRNAs são fortes candidatos a validação funcional como supressores tumorais, construímos duas novas matrizes, representadas em forma de *heatmap* na **Figura 5B**. Nestas novas matrizes foram considerados apenas processos biológicos envolvidos no câncer ou genes alvo já caracterizados como oncogenes. Interessantemente, os miRNAs posicionados no topo do ranque na análise anterior permaneceram no topo do ranque na nova análise. Cerca de 40 miRNAs apresentaram pouca ou nenhuma interação com alvos relacionados a vias importantes para o câncer.

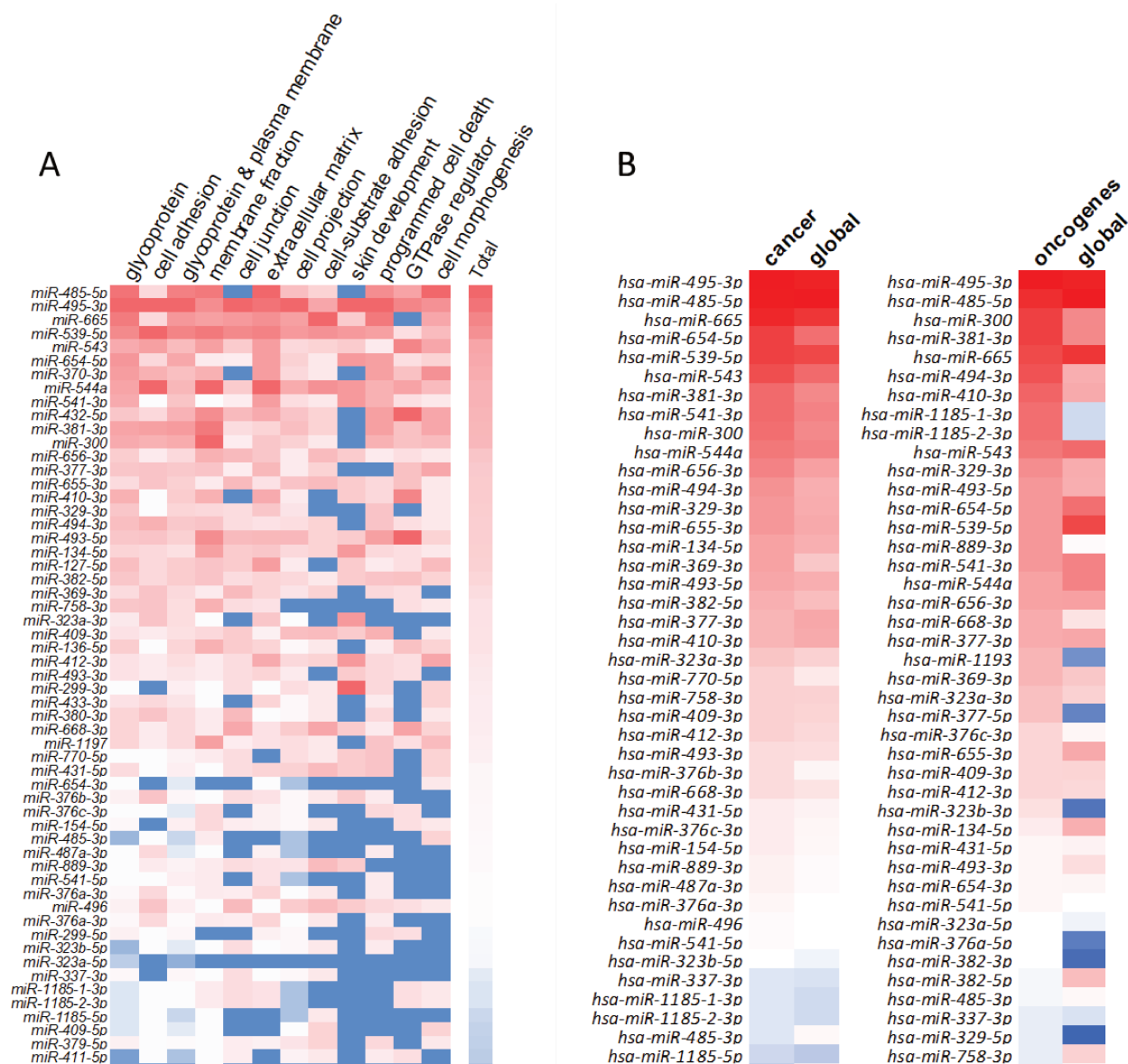


Figura 5. Agrupamento por anotação funcional. (A) Os miRNAs foram ranqueados de acordo com o número total de alvos potencialmente regulados segundo a análise bioinformática (coluna “total”), sendo o maior número de alvos mostrado em vermelho e o menor em azul. Os miRNAs sem interação predita com alvos foram omitidos. (B) Ranqueamento dos miRNAs de acordo com a relação com o câncer. Os miRNAs foram ranqueados de acordo com o número de alvos relacionados a processos relevantes para o câncer (coluna “câncer” potencialmente regulados ou de acordo com a potencial modulação com oncogenes conhecidos (coluna “oncogenes”), em relação ao número total de alvos (coluna “global”).

Por apresentar boa posição no ranque e, conforme mencionado anteriormente, atuar como supressor tumoral em outros tipos de câncer (Anaya-Ruiz et al., 2013; Duan et al., 2017; Guo et al., 2015; Sun et al., 2015), o miRNA *miR-485-5p* foi selecionado então para a validação funcional. Conforme dados obtidos do TCGA, este miRNA apresenta níveis de expressão diminuídos em amostras tireoideanas tumorais em relação a amostras normais (**Figura 6**), por conseguinte, uma lista individual de alvos do *miR-485-5p* foi submetida à ferramenta de enriquecimento DAVID com o intuito de identificar

potenciais vias de sinalização e processos biológicos enriquecidos na interação entre este miRNA e seus alvos. A análise de enriquecimento revelou 51 categorias ontológicas enriquecidas na lista de alvos de *miR-485-5p*. Destas, 22 vias com significância estatística, sendo 6 com P valor $\leq 0,01$ e 16 vias com P valor $\leq 0,05$ estão mostradas na **Figura 7**. Dentre essas 22 vias, pode-se observar as categorias *regulation of cell migration*, *regulation of MAPK cascade*, *signal transduction*, e *positive regulation of gene expression*, processos de grande relevância para o carcinoma papilífero de tireoide.

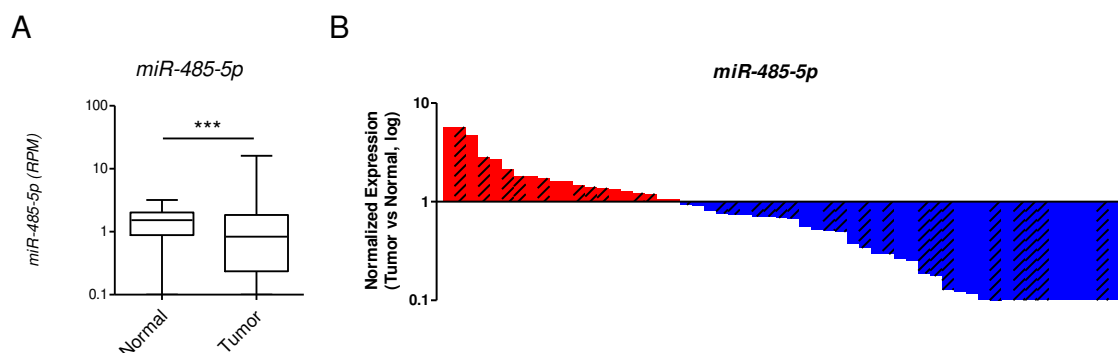


Figura 6. Diminuição da expressão de *miR-485-5p* no PTC. (A) *Box-plot* representando a expressão média de *miR-485-5p* em 437 amostras de PTC em comparação a amostras de tireoide normal. Dados do eixo Y refletem os níveis normalizados de leituras para *miR-485-5p* em análise por miRNA-Seq, de acordo com o TCGA. (B) Gráfico “*waterfall-plot*” representando a comparação da expressão de *miR-485-5p* em 59 amostras pareadas de PTC e tireoide normal. As barras refletem a expressão diferencial de cada amostra tumoral em relação à sua amostra normal pareada. As barras em vermelho representam aumento de expressão em relação à amostra normal pareada, enquanto as barras em azul representam diminuição da expressão em relação ao tecido normal pareado. As linhas tracejadas representam amostras que possuem a mutação *BRAFT1799A*.

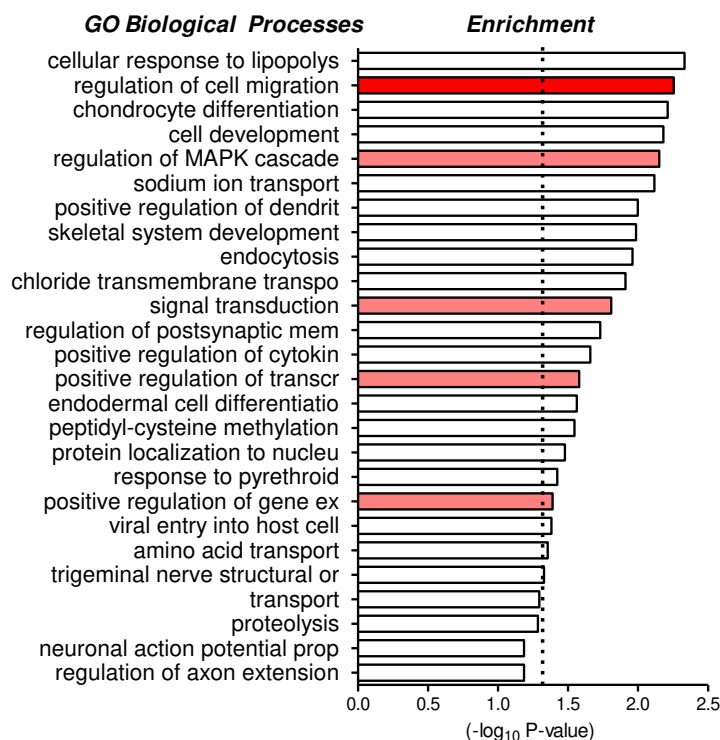


Figura 7. Imagem representativa de vias de sinalização e processos biológicos enriquecidos na lista de alvos de *miR-485-5p*. A linha tracejada representa $P=0,05$. Processos e vias de sinalização com barra que ultrapassam a barra tracejada apresentam $P<0,05$.

5.2 Modelo de super-expressão de *miR-485-5p* em linhagens celulares de PTC

Para a análise funcional de *miR-485-5p*, primeiramente foi construído um modelo de super-expressão a partir da transfecção de *miR-485-5p*, com seu mimético comercial mirVana™ (PN. MC10837, Thermo Fisher), em linhagens de PTC (TPC-1 e BCPAP), nas concentrações de 10nM e 25nM. Após a construção, validamos este modelo através da quantificação por RT-qPCR. Dessa maneira, observamos que a transfecção com o mimético, induziu o aumento significativo da expressão de *miR-485-5p* em ambas as linhagens, em relação à mesma linhagem não submetida à transfecção (Mock) (**Figura 8**). Interessantemente observamos que a transfecção deste miRNA não promoveu o ganho de expressão de maneira dose dependente, uma vez que a concentração de 25 nM não demonstrou ganho de expressão sobre a concentração de 10 nM em ambas as linhagens analisadas.

Sabe-se que a transfecção de miméticos pode interferir na maquinaria de processamento de miRNAs e, em altas concentrações, causar alterações inespecíficas na expressão gênica pela formação de RNAs de alto peso molecular, induzindo alterações na expressão de outros miRNAs (Jin et al., 2015). Desta forma, com o intuito de detectar interferências na expressão de miRNAs eventualmente induzidas pela transfecção do

mimético *miR-485-5p*, realizamos a quantificação da expressão de um miRNA não relevante para nossas análises (*miR-495-3p*). No entanto, observamos que a transfecção de *miR-485-5p* nas concentrações utilizadas não interferiu na eficiência de expressão do *miR-495-3p*, uma vez que a expressão deste miRNA não se mostra alterada nas duas linhagens (**Figura 8**).

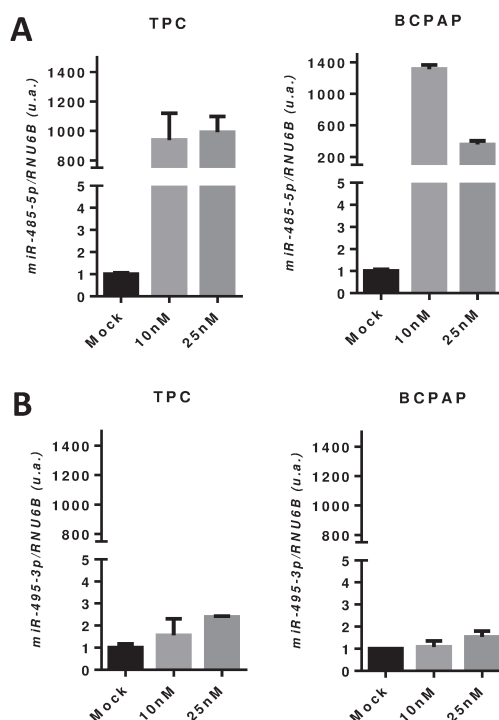


Figura 8. Confirmação da super-expressão de *miR-485-5p* em linhagens de PTC. (A) Confirmação da indução da expressão de *miR-485-5p* na linhagem TPC-1 e BCPAP. **(B)** Quantificação da expressão de *miR-495-3p* como análise de interferência da transfecção de mimético *miR-485-5p* sobre a maquinaria de processamento de miRNAs. Em **A** e **B**, 5×10^5 células foram semeadas em placas de 60 mm e transfectadas (10 e 25nM) ou não (Mock) com mimético de *miR-485-5p overnight*. O RNA total extraído e foi utilizado para síntese de cDNA dirigido e para a subsequente quantificação da expressão dos miRNAs *miR-485-5p* e *miR-495-3p*. O gene *RNU6B* foi utilizado como normalizador das reações. Os valores no eixo Y estão mostrados em unidades arbitrárias (u.a.). Barras representam desvio-padrão.

5.2 *miR-485-5p* e a migração celular

Uma vez que a aquisição da capacidade migratória é uma etapa importante para o processo de progressão tumoral, e esta categoria ontológica se encontra enriquecida entre os alvos de *miR-485-5p*, foi realizado ensaio de lesão em monocamada de células TPC-1 e BCPAP. O processo de migração para fechamento da lesão foi registrado nos tempos 0, 16 e 24 horas. De acordo com os dados obtidos, pudemos observar as células da linhagem BCPAP apresentaram diminuição significativa da capacidade migratória após a

restauração de *miR-485-5p* em ambas as concentrações (10 e 25 nM) em relação ao controle (Mock) (Figura 9; $P < 0,001$).

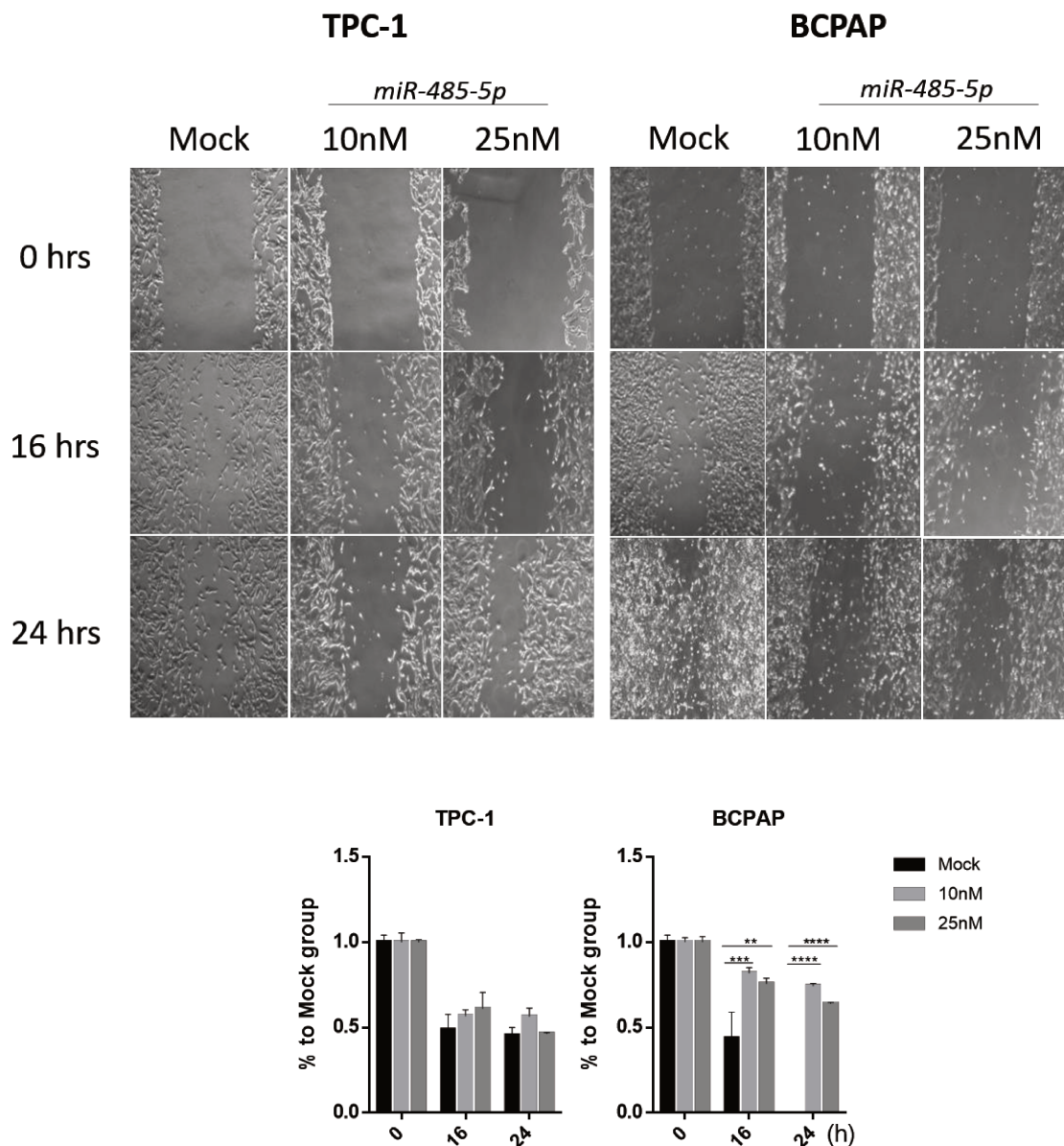


Figura 9. Influência de *miR-485-5p* sobre a migração celular. Microscopia de contraste de fase para análise da lesão na monocamada de células. Após a transfecção de mimético *miR-485-5p* (10 e 25 nM), $4,5 \times 10^4$ células por poço foram plaqueadas em placas de 12 wells. Foi realizada uma lesão no centro de cada poço. As imagens foram registradas nos tempos, 0, 16 e 24 horas. $N = 3$. Aumento 40x. Para a avaliação do fechamento da lesão, foram realizadas 3 medidas da distância entre as bordas da lesão nos tempos 0, 16 e 24 horas utilizando software ImageJ. Asteriscos (*) indicam valores significativos em relação ao controle (Mock). Valores de $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***) foram considerados significativos.

Com o intuito de elucidar a influência de *miR-485-5p* sobre este importante processo biológico, realizamos uma nova análise de migração, em câmara de Boyden modificada para a linhagem BCPAP. Pudemos observar que a linhagem BCPAP apresenta diminuição da migração após a restauração de *miR-485-5p* em ambas as

concentrações (10 e 25 nM) em relação ao controle (Mock) (**Figura 10**), $P < 0,001$. Além disso, para a análise da influência de *miR-485-5p* sobre o potencial de remodelagem de matriz extracelular e invasão, o mesmo ensaio foi realizado, com insertos recobertos com matriz-extracelular reconstituível. A restauração de *miR-485-5p* também induziu significativa diminuição do potencial de invasão em ambas as concentrações (**Figura 10**).

Estes resultados corroboram nossas análises de bioinformática, onde a categoria ontológica “*regulation of cell migration*” se encontra enriquecida na lista de alvos de *miR-485-5p*. De fato, a restauração da expressão deste miRNA diminui a capacidade migratória e invasiva em linhagens celulares de glioma e câncer de mama (Yu et al., 2017; Anaya-Ruiz et al., 2013). Em outro estudo Wu e colaboradores (2017) demonstraram que tanto o braço -5p quanto o braço -3p de *miR-485* são efetivos na diminuição do processo migratório e invasivo relacionados a progressão do câncer também em linhagens de melanoma (Wu et al., 2017).

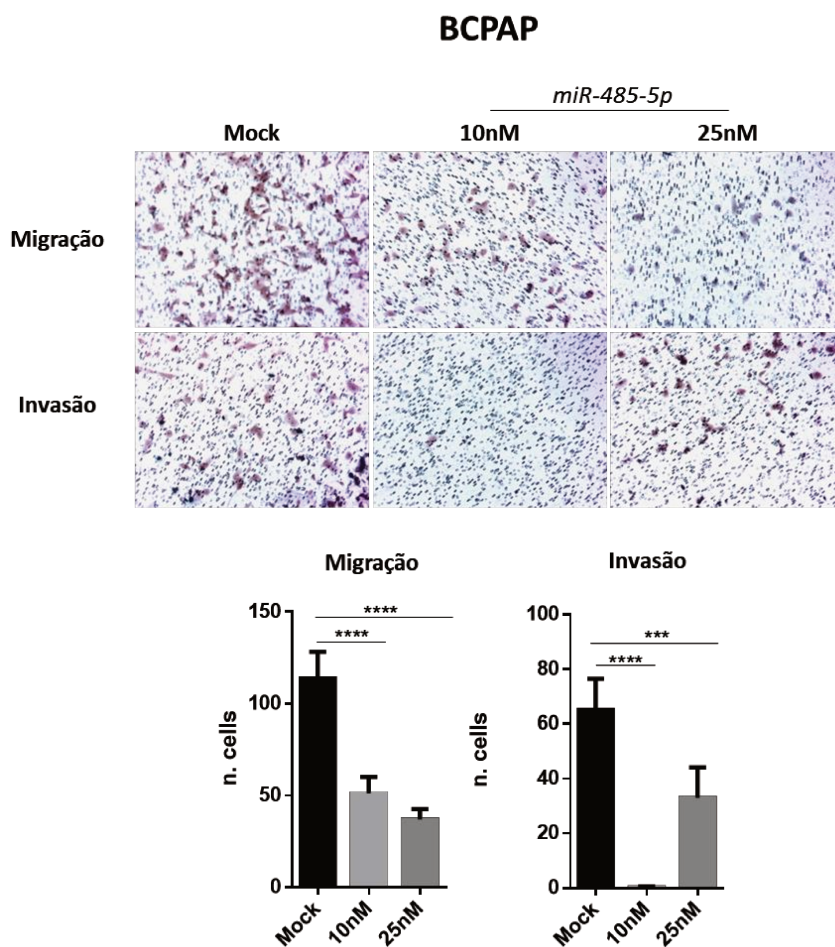


Figura 10. Influência de *miR-485-5p* sobre a migração e invasão celular. Após a transfecção de mimético *miR-485-5p* (10 e 25 nM), 2×10^4 células por foram plaqueadas em placas de 24 wells contendo as câmaras de boyden modificadas cobertas ou não com matriz extracelular reconstituível, para os ensaios de invasão ou migração, respectivamente. Após 24h o compartimento superior foi limpo e as células foram

fixadas e coradas com cristal violeta. As imagens do compartimento inferior do inserto foram capturadas em microscópio invertido trinocular Optika® (Italy), aumento de 40x. Para quantificação dos dados foram tiradas fotos de cinco diferentes pontos de cada câmara de boyden e utilizando software ImageJ® foi feita a contagem das células. $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***)

Em vista destes resultados, realizamos uma análise minuciosa da lista de alvos preditos de *miR-485-5p* visando aqueles com potencial influência nos contextos, principalmente da migração e invasão celular. Com auxílio da ferramenta Kegg Mapper, da plataforma *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (kegg.jp), classificamos os potenciais alvos de *miR-485-5p* em diferentes categorias ontológicas. Para isto, foram utilizados dados de expressão gênica do TCGA, e assim foram selecionados alvos preditos de *miR-485-5p* cujo aumento de expressão em amostras de PTC em comparação com amostras normais possa contribuir com a agressividade e progressão da doença.

No processo de migração e invasão celular, *miR-485-5p* pode atuar por meio da repressão de diversos membros das seguintes categorias ontológicas do Kegg: *Regulation of Actin cytoskeleton* e *Focal Adhesion* (Figuras 11 e 12). Além disso, observamos que este miRNA pode regular outros alvos diretamente envolvidos na interação tumor-hospedeiro, nas categorias *Cell Adhesion Molecules* e *Tight Junction* (Figura 13 e 14).

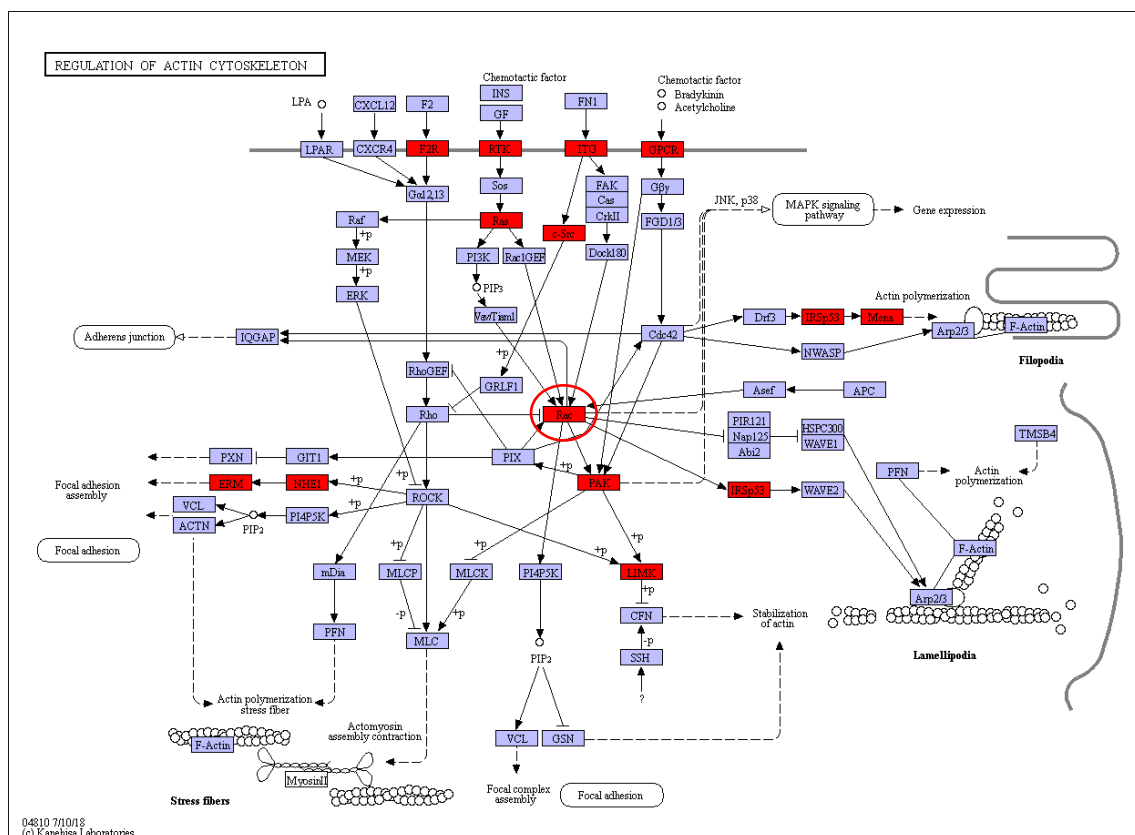


Figura 11. Alvos de *miR-485-5p* com expressão aumentada na categoria ontológica “Actin cytoskeleton”. A imagem obtida a partir da ferramenta Kegg Mapper, da plataforma *Kyoto Encyclopedia*

of Genes and Genomes (kegg.jp), contém a relação de alvos que apresentam aumento de expressão (marcados em vermelho) na categoria ontológica “Actin cytoskeleton” e alvos putativos de *miR-485-5p*.

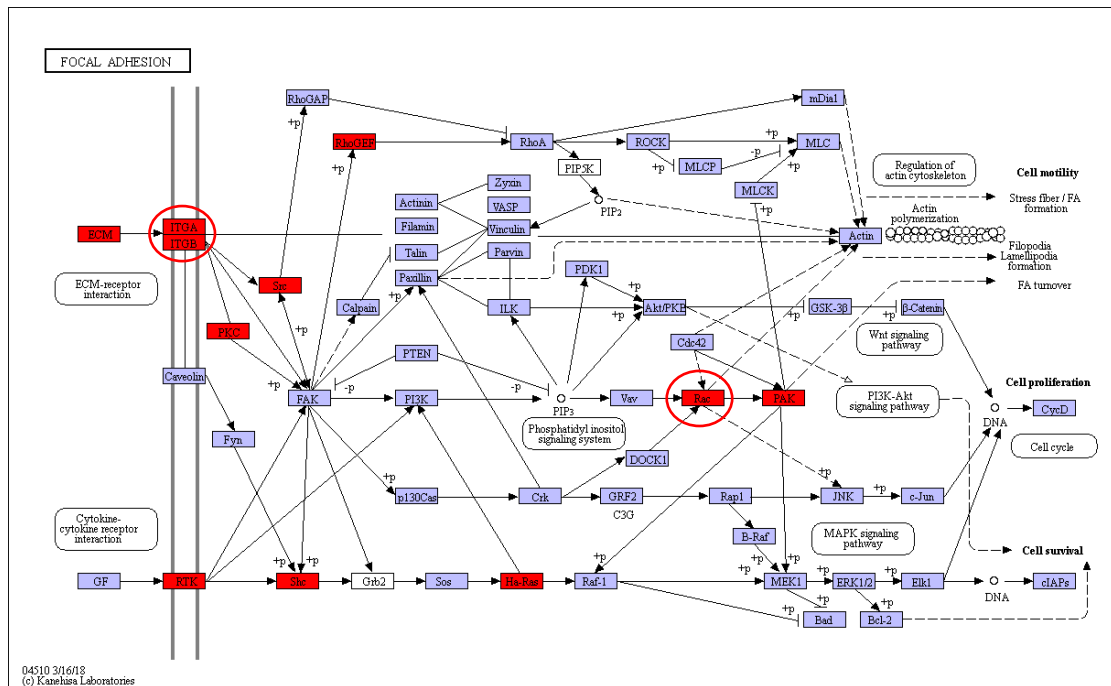


Figura 12. Alvos de *miR-485-5p* com expressão aumentada na categoria ontológica “Focal Adhesion”. A imagem obtida a partir da ferramenta Kegg Mapper, da plataforma Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (kegg.jp), contém a relação de alvos que apresentam aumento de expressão (marcados em vermelho) na categoria ontológica “Focal Adhesion” e alvos putativos de *miR-485-5p*.

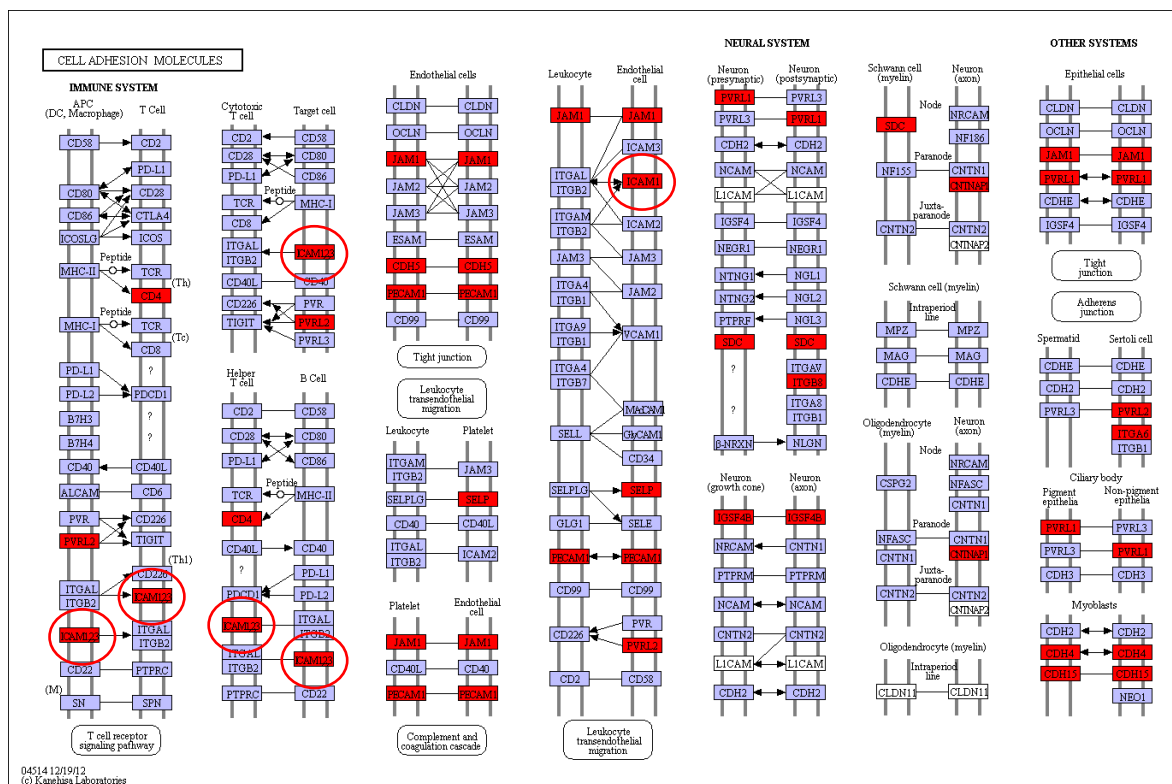


Figura 13. Alvos de *miR-485-5p* com expressão aumentada na categoria “Cell Adhesion Molecules”. A imagem obtida a partir da ferramenta Kegg Mapper, da plataforma Kyoto Encyclopedia of Genes and

Genomes (kegg.jp), contém a relação de alvos que apresentam aumento de expressão (marcados em vermelho) na categoria ontológica “Cell Adhesion Molecules” e alvos putativos de *miR-485-5p*.

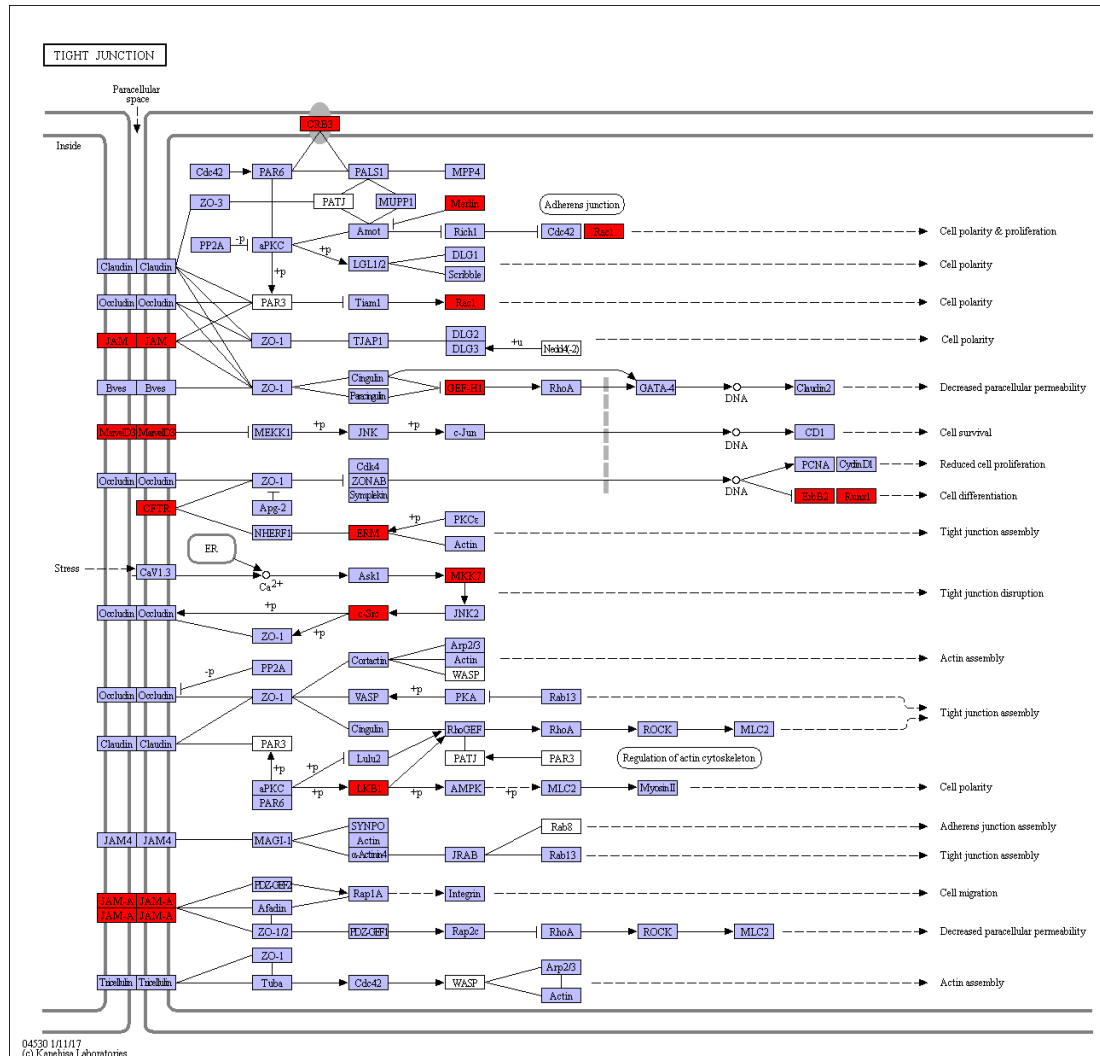


Figura 14. Alvos de *miR-485-5p* com expressão aumentada na categoria ontológica “Tight Junction”. A imagem obtida a partir da ferramenta Kegg Mapper, da plataforma Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (kegg.jp), contém a relação de alvos que apresentam aumento de expressão (marcados em vermelho) na categoria ontológica “Tight Junction” e alvos putativos de *miR-485-5p*.

No contexto da migração celular, o gene *RAC1* é responsável pela tradução de uma proteína que apresenta função central na regulação do citoesqueleto de actina (**Figura 12**). A região 3’UTR de *RAC1* possui apenas um sítio de interação com o *miR-485-5p* e este apresenta-se pouco conservado evolutivamente (**Figura 15A**). Informações obtidas do TCGA com o auxílio da plataforma *cBioportal* (cbioportal.org) mostram o aumento em 19% na expressão de *RAC1* nas amostras tumorais de PTC. Além disso a maior expressão é observada em amostras tumorais portadoras da mutação *BRAF T1799A*, em amostras classificadas como risco aumentado, e naquelas classificadas como células

foliculares e células “altas” (**Figura 15B**). Interessantemente, observamos que a transfecção de *miR-485-5p* induz diminuição expressiva dos níveis de *RAC1* apenas na linhagem tumoral BCPAP (**Figura 16**). Estes resultados corroboram os dados obtidos previamente na análise do potencial migratório, quando a migração foi reprimida por *miR-485-5p* apenas na linhagem portadora de *BRAFT1799A*, BCPAP. Estes dados sugerem que *miR-485-5p* pode contribuir para a progressão tumoral modulando negativamente a expressão de *RAC1* principalmente em tumores portadores da mutação *BRAFT1799A*. Resultados similares foram observados para o *miR-101*, cuja expressão diminuída leva ao aumento nos níveis de *RAC1*, enquanto seu restabelecimento provoca diminuição nos níveis de *RAC1* e modulação negativa da migração e invasão celular (C. Wang et al., 2014). Este gene também é apontado como alvo de um RNA longo não codificante (MEG3), que é capaz de modular *RAC1* diretamente e diminuir a migração e invasão celular em câncer de tireoide (C.Wang et al., 2015).

A

Poorly conserved

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	pCT
Position 466-472 of RAC1 3' UTR	5' ...AUGCGUAAAGCAGAAACAGCCUCC... 	7mer-m8	-0.17	83	-0.16	1.648	N/A
hsa-miR-485-5p	3' CUUAAGUAGUGCCGUCGGAGA						
Position 466-472 of RAC1 3' UTR	5' ...AUGCGUAAAGCAGAAACAGCCUCC... 	7mer-m8	-0.15	79	-0.15	1.648	N/A
hsa-miR-6884-5p	3' GUUGUAGUGGAAGAGUCGGAGA						

B

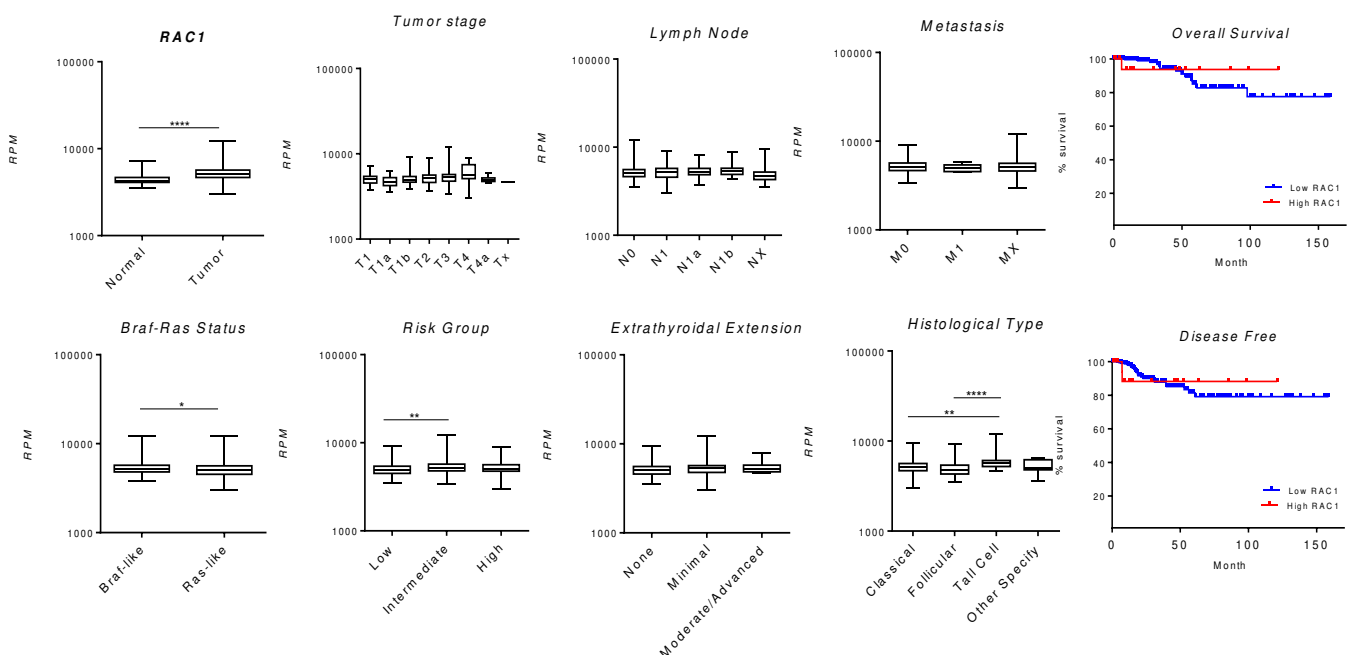


Figura 15. *RAC1* como potencial alvo de *miR-485-5p*.

(A) Visualização dos sítios de ligação de *miR-485-5p* à região 3'UTR de *RAC1*. (B) Comparação da diferença de expressão de *RAC1* entre amostras normais e tumorais, Influência da diferença de expressão

de *RAC1* em estágio tumoral, metástase linfonodal, metástase a distância, Braf-Ras status, grupo de risco, extensão extratiroideana, tipo histológico, curva de sobrevivência geral e livre da doença respectivamente. Dados obtidos pelo dataset TCGA (<https://cancergenome.nih.gov>). Barras representam desvio-padrão. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$.

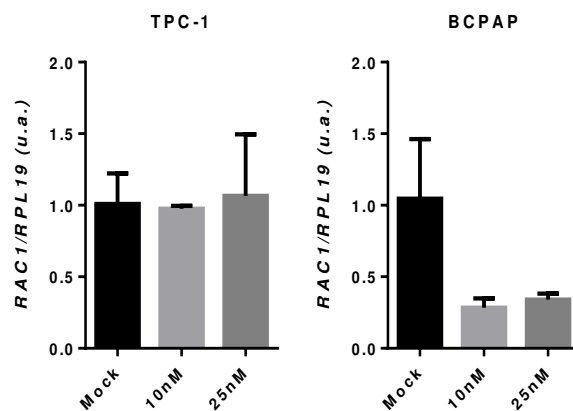


Figura 16. Modulação de *RAC1* por *miR-485-5p* em linhagens de PTC.

Influência de *miR-485-5p* na expressão de *RAC1* nas linhagens TPC-1 e BCPAP. 5×10^5 células foram semeadas em placas de 60 mm e transfectadas (10nM e 25nM) ou não (Mock) pelo mimético comercial de *miR-485-5p overnight*. O RNA total extraído foi utilizado para síntese de cDNA para a subsequente quantificação da expressão gênica de *RAC1*. O gene *RPL19* foi utilizado como normalizador da reação. Os valores no eixo Y estão mostrados em unidades arbitrárias (u.a.). Barras representam desvio-padrão.

Ainda em relação ao contexto da progressão tumoral, o gene *ICAMI* codifica para uma proteína de adesão que interage em grande parte com integrinas em células do sistema imunológico (**Figura 13**). Este gene é apresentado como um marcador de inflamação crônica e também é conhecido por promover um microambiente tumoral imunossupressor auxiliando o desenvolvimento do tumor e surgimento de metástases, pela interação com fibroblastos e macrófagos associados a tumores (Leelawattanachai et al., 2015; Schellerer et al., 2014; Shalpour & Karin, 2015). *ICAMI* possui regiões de ligação para o *miR-485-5p* em sua região 3'UTR pouco conservadas evolutivamente (**Figura 17A**). Luo e colaboradores (2018), demonstraram que existe o aumento da expressão de *ICAMI* em tecidos tumorais, e uma menor expressão do gene em tecidos adjacentes. A diferença de expressão também é encontrada entre linhagens normais e tumorais de tireoide que está correlacionado com uma menor expressão de *miR-335-5p*. E o reestabelecimento deste miRNA modula negativamente a expressão de *ICAMI* promovendo a diminuição da proliferação celular (Luo et al., 2018).

De acordo com os dados do TCGA, as amostras tireoideanas tumorais apresentam maior expressão de *ICAMI* em comparação com amostras tireoideanas normais. Ademais, amostras tumorais com a mutação *BRAF T1799A* também apresentam níveis transcricionais aumentados deste gene. Há também correlação entre o aumento de *ICAMI* e a presença de metástases linfonodais ao diagnóstico, invasão extra-tireoideana, risco

elevado, o tipo histológico classificado como PTC clássico ou variante de células altas e sobrevida livre de doença (**Figura 17B**).

Estes dados correlacionam-se com os resultados obtidos por Buitrago D. e colaboradores (2012), que mostram que maiores níveis de expressão de *ICAM1* podem ser considerados um indicador de agressividade, uma vez que este gene se encontra com expressão mais elevada em PTCs, especialmente aqueles que apresentam metástases linfonodais, e portadores de *BRAFT1799A* (Buitrago et al., 2012).

Em nossas análises, observamos diminuição expressiva de *ICAM1* em resposta à transfecção de *miR-485-5p* na linhagem BCPAP, enquanto nenhuma diferença foi observada entre os grupos na linhagem TPC-1 (**Figura 18**). Desta forma, estes resultados sugerem *ICAM1* como um importante alvo de *miR-485-5p*, que modulado negativamente pode auxiliar a diminuição da progressão e malignidade do câncer.

A

Poorly conserved

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	PCT
Position 1059-1085 of ICAM1 3' UTR	5' ...CCUCCAGCUUUGGAAGCCUCAU... 3' GUUGUAGUGGAAGAGUCGGAGA	7mer-A1	-0.09	58	-0.05	0.699	N/A
Position 1059-1085 of ICAM1 3' UTR	5' ...CCUCCAGCUUUGGAAGCCUCAU... 3' CUUAAGUAGUGCCGGUCGGAGA	7mer-A1	-0.08	56	-0.04	0.699	N/A
Position 1190-1196 of ICAM1 3' UTR	5' ...GUGAUCUCCACCU--CAGCCUCC... 3' GUUGUAGUGGAAGAGUCGGAGA	7mer-m8	-0.10	63	-0.06	0.214	N/A
Position 1190-1196 of ICAM1 3' UTR	5' ...GUGAUCUCCACCU--CAGCCUCC... 3' CUUAAGUAGUGCCGGUCGGAGA	7mer-m8	-0.07	53	-0.04	0.214	N/A

B

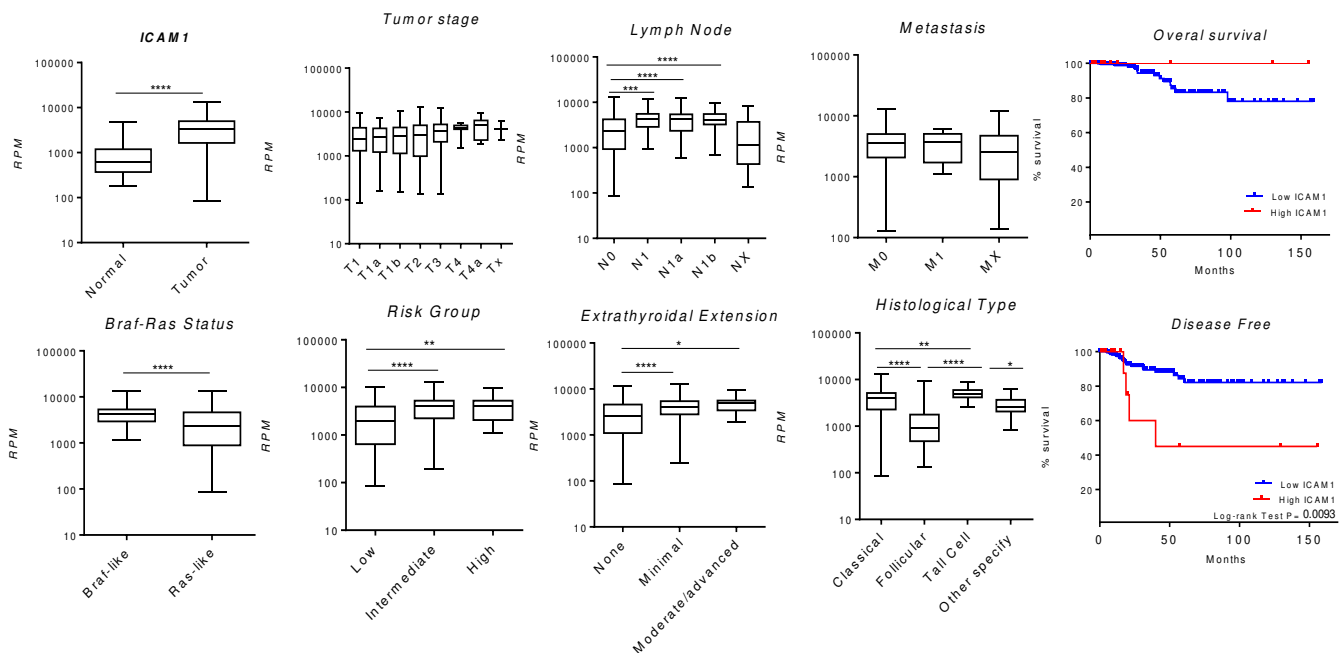


Figura 17. ICAMI como potencial alvo de miR-485-5p.

(A) Esquema representativo dos sítios de ligação de *miR-485-5p* à região 3'UTR de *ICAMI*. (B) Comparação da diferença de expressão de *ICAMI* entre amostras normais e tumorais, Influência da diferença de expressão de *ICAMI* em estágio tumoral, metástase linfonodal, metástase a distância, Braf-Ras status, grupo de risco, extensão extratiroideana, tipo histológico, curva de sobrevivência geral e livre da doença respectivamente. Dados obtidos pelo dataset TCGA (<https://cancergenome.nih.gov>). Barras representam desvio-padrão. (*) $p < 0,05$. (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$. (****) $p < 0,0001$.

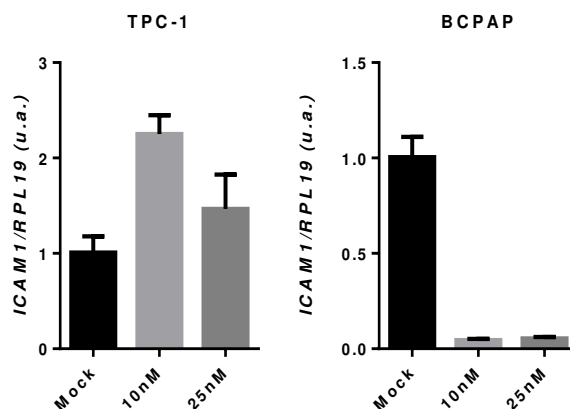


Figura 18. Modulação de ICAMI por miR-485-5p em linhagens de PTC.

Influência de *miR-485-5p* na expressão de *ICAMI* nas linhagens TPC-1 e BCPAP. 5×10^5 células foram semeadas em placas de 60 mm e transfectadas (10nM e 25nM) ou não (Mock) pelo mimético comercial de *miR-485-5p overnight*. O RNA total extraído foi utilizado para síntese de cDNA para a subsequente quantificação da expressão gênica de *ICAMI*. O gene *RPL19* foi utilizado como normalizador da reação. Os valores no eixo Y estão mostrados em unidades arbitrárias (u.a.). Barras representam desvio-padrão.

O gene *ITGA3* codifica para a proteína integrina alfa 3, uma molécula transmembrana que interage com a matriz extracelular e participa da regulação do citoesqueleto de actina e sinalização celular, o que pode interferir diretamente na adesão e migração celular (Figuras 11 e 12). Este gene possui regiões pouco conservadas evolutivamente de ligação de *miR-485-5p* em sua região 3'UTR (Figura 19A).

Em um estudo realizado com colangiocarcinoma, utilizando dados clínicos do TCGA, já foi demonstrado que o gene *ITGA3* está relacionado a pior prognóstico em pacientes com este tipo tumoral. Nestes dados, o aumento dos níveis de *ITGA3* está relacionado à presença de metástase linfonodal e piora na classificação TNM, além de apresentar um pior prognóstico na sobrevida global. *ITGA3* é apontado como um potencial oncogene, dado que a super-expressão em linhagens celulares de colangiocarcinoma leva ao aumento significativo da proliferação celular e progressão do ciclo celular (Huang et al., 2018). Outro estudo também mostra através de dados do TCGA que a alteração no nível de expressão de *ITGA3* está associada a um pior prognóstico em pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático. E em análises funcionais, mostraram que o *miR-124-3p*, quando superexpresso, é capaz de inibir a migração e invasão celular pela modulação de *ITGA3* (Idichi et al., 2018).

Os dados obtidos do TCGA vão de encontro com os estudos feitos em outros tipos tumorais, e mostram que este gene apresenta aumento de expressão em amostras tumorais de PTC, principalmente naquelas que possuem a mutação *BRAFT1799A*. Além disso a alta expressão de *ITGA3* se correlaciona com maior tamanho tumoral e linfonodos comprometidos ao diagnóstico, além de invasão extratiroidiana, tumores de risco elevado, e classificados como carcinoma papilífero clássico e variante de células altas (**Figura 19B**).

A

Poorly conserved

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	PCT
Position 304-310 of <i>ITGA3</i> 3' UTR	5' ...GGGCUCGCGGUGUCAGCCUCU... 3' CUUAAGUAGGCCGGUCGGAGA	7mer-m8	-0.08	58	-0.08	1.102	N/A
Position 830-837 of <i>ITGA3</i> 3' UTR	5' ...CUCACCACUACCAGCCAGCCUCA... 3' CUUAAGUAGGCCGGUCGGAGA	8mer	-0.10	65	-0.09	0.361	N/A
Position 2088-2074 of <i>ITGA3</i> 3' UTR	5' ...AACUGUCACAAGGUCCAGCCUCC... 3' CUUAAGUAGGCCGGUCGGAGA	7mer-m8	-0.02	18	0.00	0.122	N/A
Position 3466-3472 of <i>ITGA3</i> 3' UTR	5' ...GGAAUCUUCUACUUCAGCCUCC... 3' CUUAAGUAGGCCGGUCGGAGA	7mer-m8	-0.10	65	-0.01	0.272	N/A
Position 3800-3806 of <i>ITGA3</i> 3' UTR	5' ...GCAUCCUCCUACUUCAGCCUCC... 3' CUUAAGUAGGCCGGUCGGAGA	7mer-m8	-0.08	58	-0.01	0.134	N/A
Position 2454-2460 of <i>ITGA3</i> 3' UTR	5' ...UGCCUGGGGUCUCCAGCCUCC... 3' CUUAAGUAGGCCGGUCGGAGA	7mer-m8	-0.02	18	0.00	0.319	N/A

B

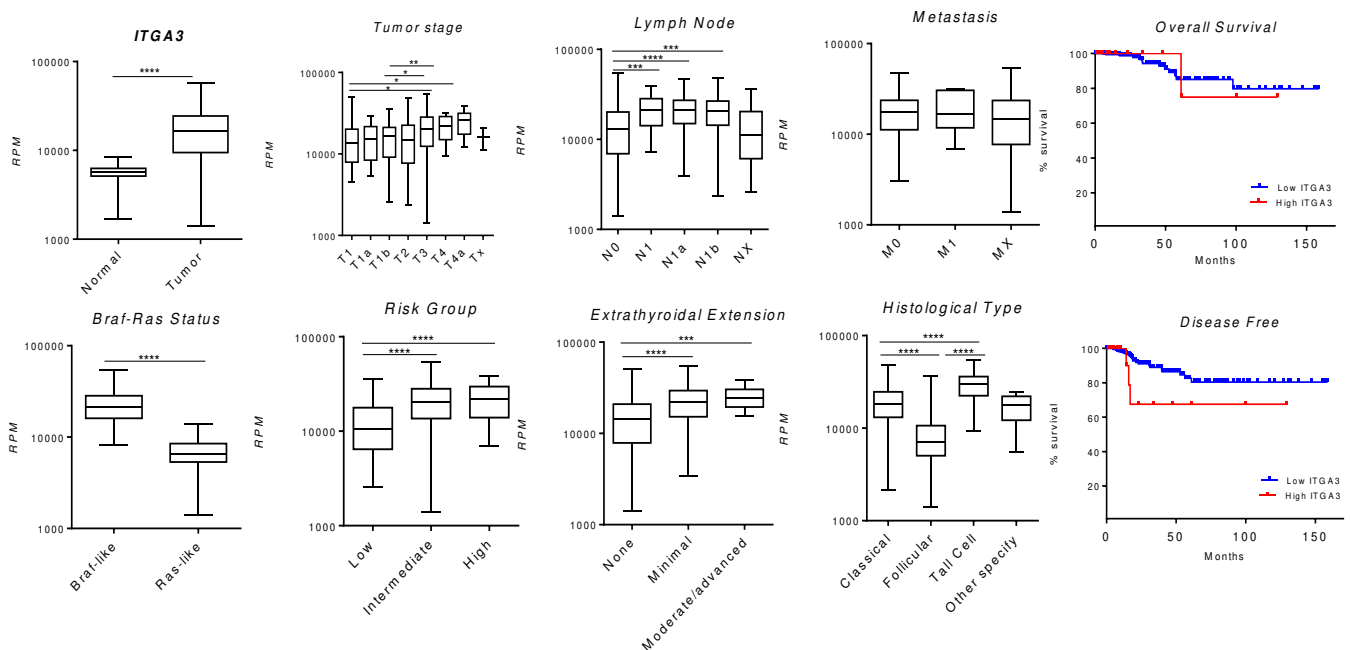


Figura 19. *ITGA3* como potencial alvo de *miR-485-5p*. (A) Visualização dos sítios de ligação de *miR-485-5p* à região 3'UTR de *ITGA3*. (B) Comparação da diferença de expressão de *ITGA3* entre amostras normais e tumorais, Influência da diferença de expressão de *ITGA3* em estágio tumoral, metástase linfonodal, metástase a distância, Braf-Ras status, grupo de risco, extensão extratiroidiana, tipo histológico, curva de sobrevivência geral e livre da doença respectivamente. Dados obtidos pelo dataset TCGA

(<https://cancergenome.nih.gov>). Barras representam desvio-padrão. (*) $p < 0,05$. (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$. (****) $p < 0,0001$.

Em nossos ensaios funcionais *in vitro*, observamos um efeito contraditório na linhagem BCPAP, onde a transfecção de *miR-485-5p* na concentração de 10 nM induziu aumento de sua expressão, e por outro lado, a transfecção em concentração de 25 nM induziu diminuição de *ITGA3*. Por outro lado, observamos aumento da expressão de *ITGA3* após restauração de *miR-485-5p* na linhagem TPC-1, (**Figura 20**).

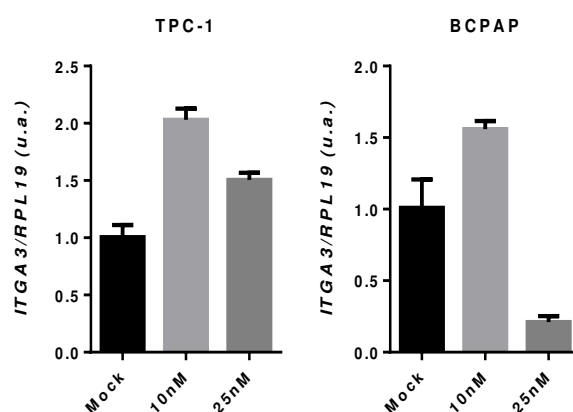


Figura 20. Modulação de *ITGA3* por *miR-485-5p* em PTC.

Influência de *miR-485-5p* na expressão de *ITGA3* nas linhagens TPC-1 e BCPAP. 5×10^5 células foram semeadas em placas de 60 mm e transfectadas (10nM e 25nM) ou não (Mock) pelo mimético comercial de *miR-485-5p overnight*. O RNA total extraído foi utilizado para síntese de cDNA para a subsequente quantificação da expressão gênica de *ITGA3*. O gene *RPL19* foi utilizado como normalizador da reação. Os valores no eixo Y estão mostrados em unidades arbitrárias (u.a.). Barras representam desvio-padrão.

5.2 *miR-485-5p* e a proliferação e morte celular

Para avaliar a influência de *miR-485-5p* sobre a proliferação celular, as linhagens TPC-1 e BCPAP foram submetidas à transfecção com mimético e após 24, 48 e 72 h o número de células foi contado em câmara de Neubauer (**Figura 21**). Os resultados mostram diminuição da proliferação celular após a transfecção de *miR-485-5p* nas duas linhagens, TPC-1 e BCPAP, em ambas concentrações (10 e 25 nM) no tempo de 72h em relação as linhagens não transfectadas (Mock).

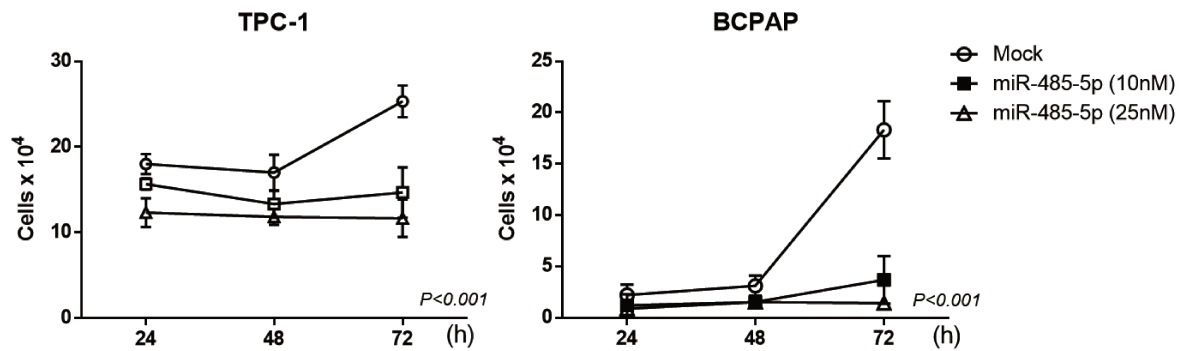


Figura 21. *miR-485-5p* e sua influência sobre a proliferação celular. As linhagens foram semeadas em placas de 12 poços na densidade de $2,5 \times 10^4$ celular/poço e transfectadas com o mimético do *miR-485-5p*. As linhagens foram tripsinazada nos tempos 48 e 72 horas, fixadas e contadas em câmara de Neubauer.

Utilizando a técnica de MTT, observamos que a transfecção de *miR-485-5p* induz diminuição significativa da viabilidade na linhagem BCPAP na concentração 10 nM, em comparação com a mesma linhagem não transfectada (Mock) (Figura 22). Para a linhagem TPC-1, não foram observadas alterações significativas. A seguir, testamos se a transfecção de *miR-485-5p* é capaz de ativar o processo de morte celular nas linhagens TPC-1 e BCPAP, e observamos que a restauração da expressão deste miRNA não apresentou alterações significativas na taxa de morte celular entre os grupos analisados (Figura 23).

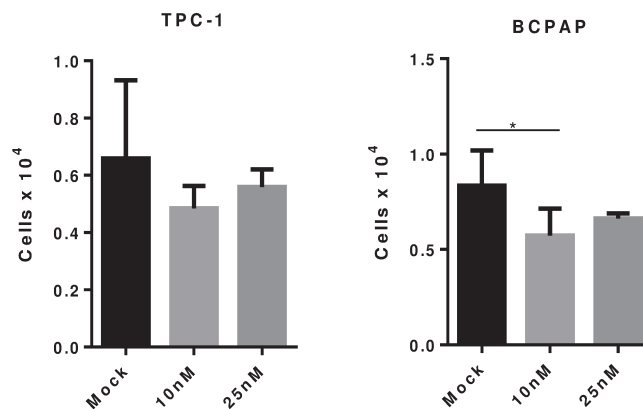


Figura 22. Influência de *miR-485-5p* sobre a viabilidade celular *in vitro*.

Análise da viabilidade celular após transfecção com mimético do *miR-485-5p* em TPC-1 e BCPAP. 5×10^3 células foram semeadas em placas de 96 poços e transfectadas (10 e 25 nM) ou não (Mock) com mimético comercial de *miR-485-5p*. Após 24 h as células foram submetidas ao ensaio de MTT. Barras representam desvio-padrão. (*) $p < 0,05$.

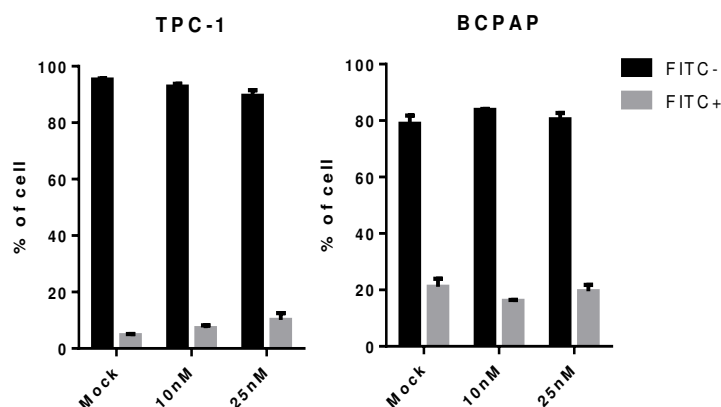


Figura 23. *miR-485-5p* e sua influência sobre a morte celular. As linhagens TPC-1 e BCPAP foram semeadas em placas de 6 poços na densidade de 1×10^5 células por poço e um dia após o plaqueamento foram transfectadas (*miR-485-5p*) ou não (Mock) overnight. Após a transfecção foi realizada a suplementação com SFB por 24 h e posteriormente o meio de cultura foi coletado para a preservação de células mortas, as células aderidas foram tripsinizadas, lavadas em PBS, ressuspensas em Tampão Annexin-V-FITC e o número de células em apoptose e necrose foram medidos de acordo com as instruções do fabricante. A leitura da fluorescência total de FITC e iodeto de propídeo para análise de morte celular foi realizada em Citômetro de Fluxo FACS Calibur. O gráfico apresenta a porcentagem de células viáveis (FITC-) em comparação a porcentagem de células mortas (FITC+).

Uma vez que as taxas de morte celular por apoptose não foram alteradas após transfecção de *miR-485-5p*, concluímos que a diminuição da viabilidade celular observada não é suficiente para explicar a significativa diminuição do número de células em ambas as linhagens. Desta forma, outros mecanismos devem estar envolvidos no controle da proliferação por *miR-485-5p*. Guo-Xiao e colaboradores (2015) demonstraram redução da proliferação celular em linhagens de câncer de fígado frente à transfecção de *miR-485-5p* e repressão pós-transcricional de *STC2* (Guo et al., 2015). Da mesma forma, Yu e colaboradores (2017) demonstraram queda de aproximadamente 50% no número de células em duas linhagens celulares de glioma transfectadas com o *miR-485-5p* através da regulação negativa de *TPD52L2* (Yu et al., 2017). De fato, o gene *STC2* encontra-se com expressão aumentada no PTC, de acordo com dados do TCGA (dados não mostrados). No entanto, nossa estratégia computacional não considerou a interação entre *miR-485-5p* e *STC2* válida e este gene foi descartado. O gene *TPD52L2* também foi descartado das análises por não ser considerado válido por mais de 8 algoritmos. Assim, estudos mais aprofundados devem ser realizados com o intuito de explicar o mecanismo de supressão tumoral observado nas análises de proliferação e morte celular.

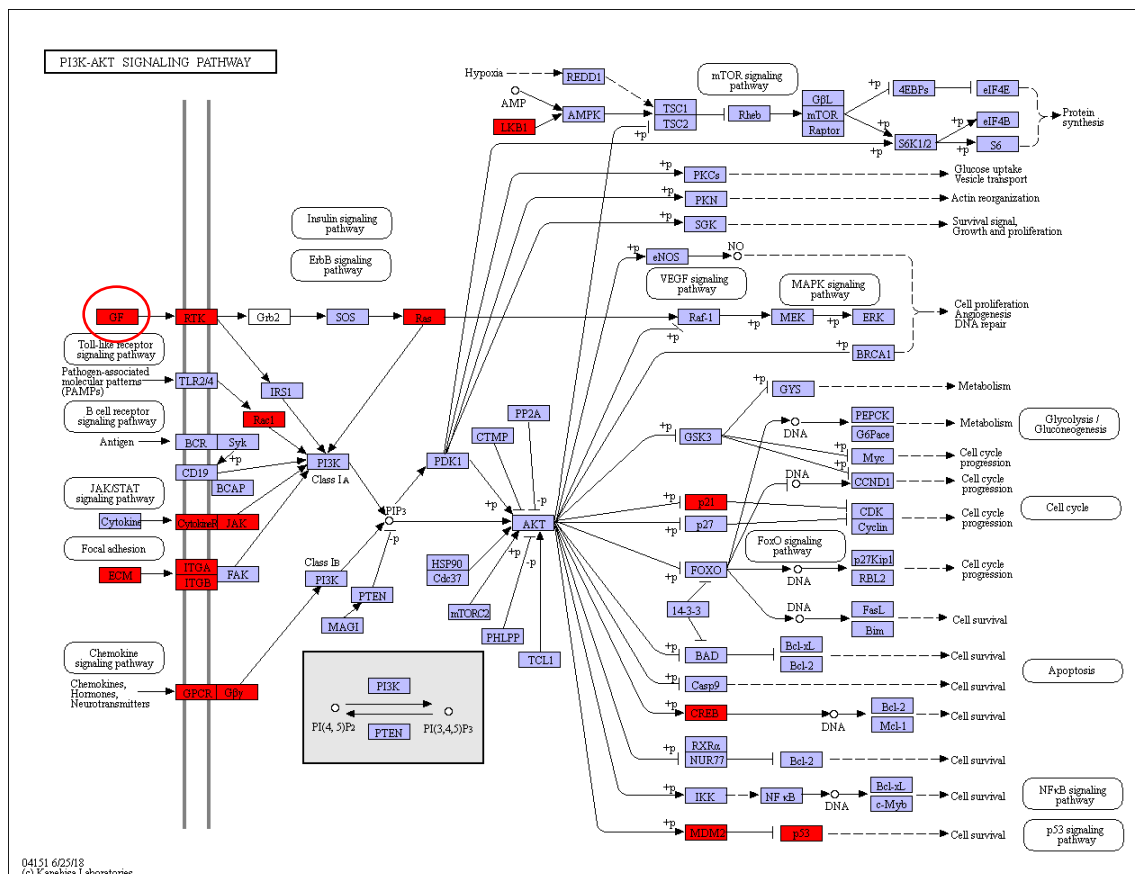
Vale ressaltar que duas das categorias ontológicas enriquecidas entre os alvos deste miRNA são “*regulation of MAPK cascade*” e “*signal transduction*”. Assim, a transfecção de *miR-485-5p* pode impactar diretamente a sinalização mitogênica e a consequente indução da progressão do ciclo celular. De fato, em estudo realizado utilizando linhagens celulares de melanoma, a superexpressão de *miR-485-5p* está

inversamente relacionada com a expressão de seu alvo direto, *FZD7* (Frizzled7), o qual faz parte da via Wnt, e atua diretamente na influência do ciclo celular (Wu et al., 2017).

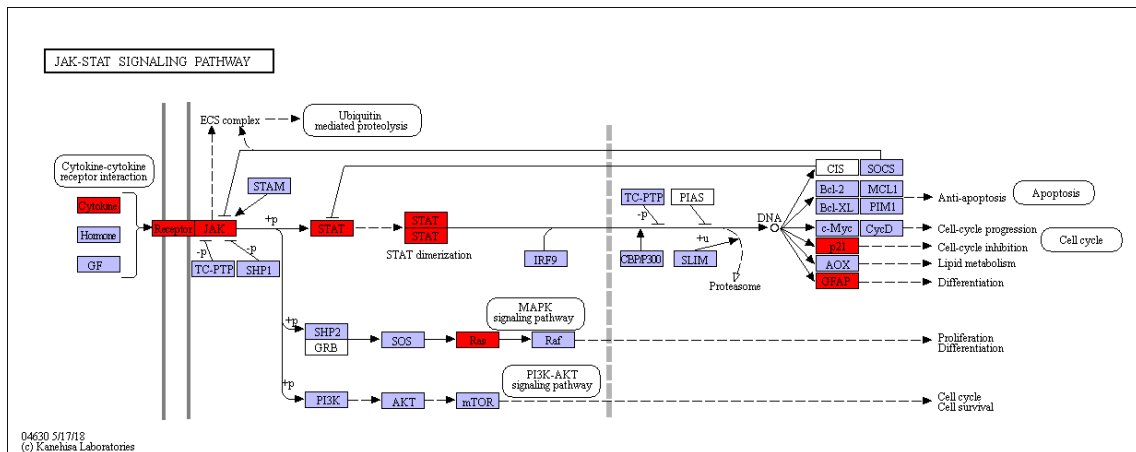
Diferentemente, os estudos que apresentaram a participação do *miR-485-5p* no aumento da morte celular em linhagens, trouxeram este miRNA como um agente coadjuvante no aumento da eficiência terapêutica, como por exemplo, em câncer gástrico *miR-485-5p* aumenta a sensibilidade ao tratamento com DDP (Cisplatina), e em câncer de mama *miR-485-5p* também auxilia na morte celular aumentando a sensibilidade a quimioterápicos como Doxorubicina e Paclitaxel (N. He et al., 2014; Kang et al., 2015).

Em nossas análises bioinformáticas observamos que *miR-485-5p* potencialmente modula diversos membros de vias de sinalização importantes para a indução da proliferação celular, como a PI3K-Akt, JAK-STAT, RAS, MAPK e WNT, além da via de Apoptose (Figura 24).

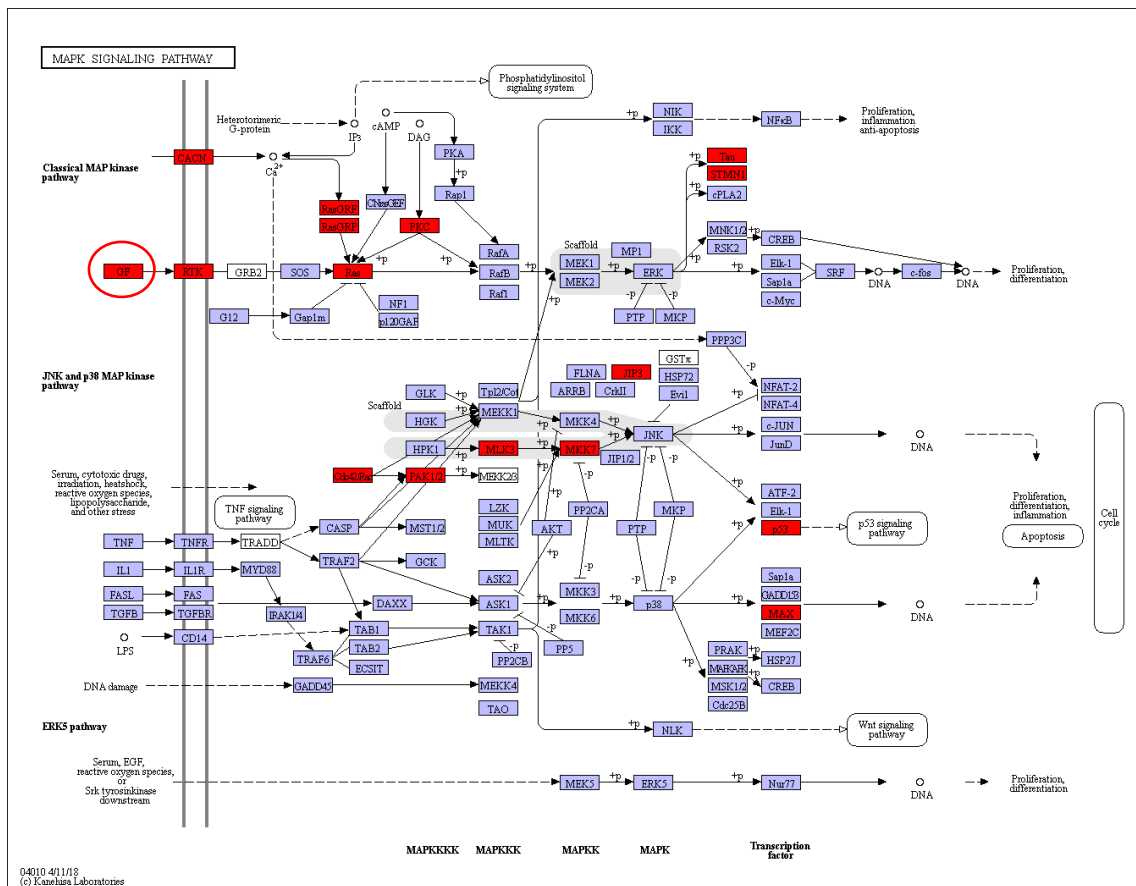
A



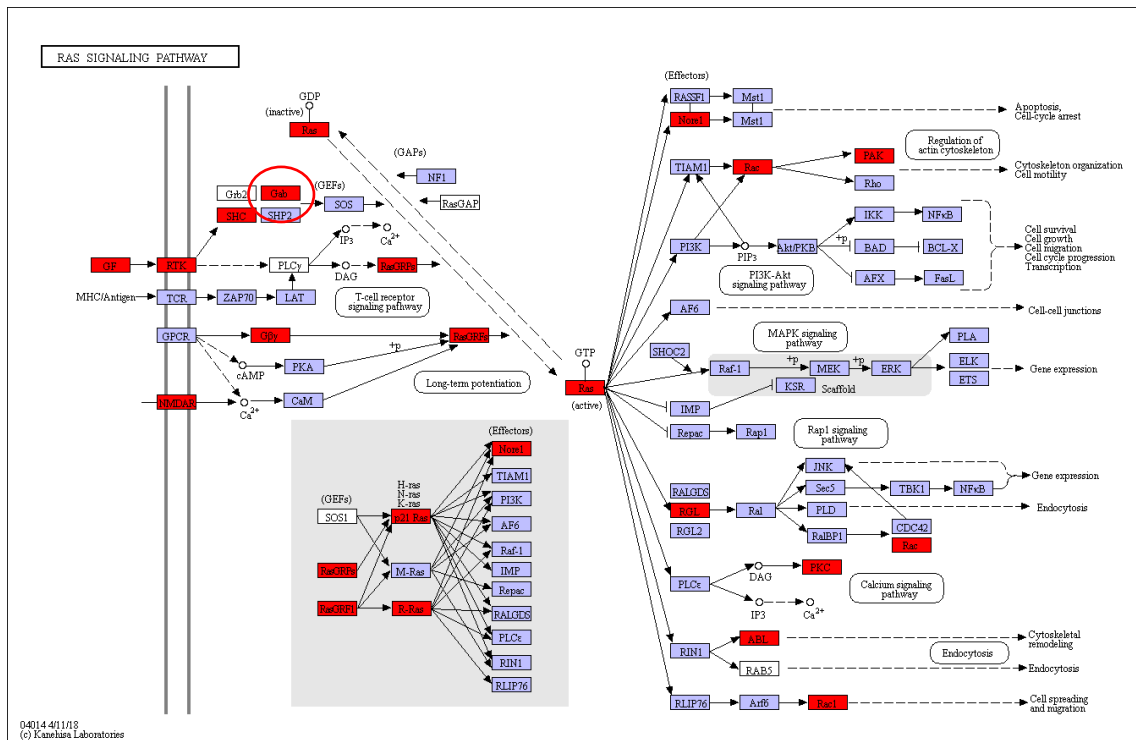
B



C



D



E

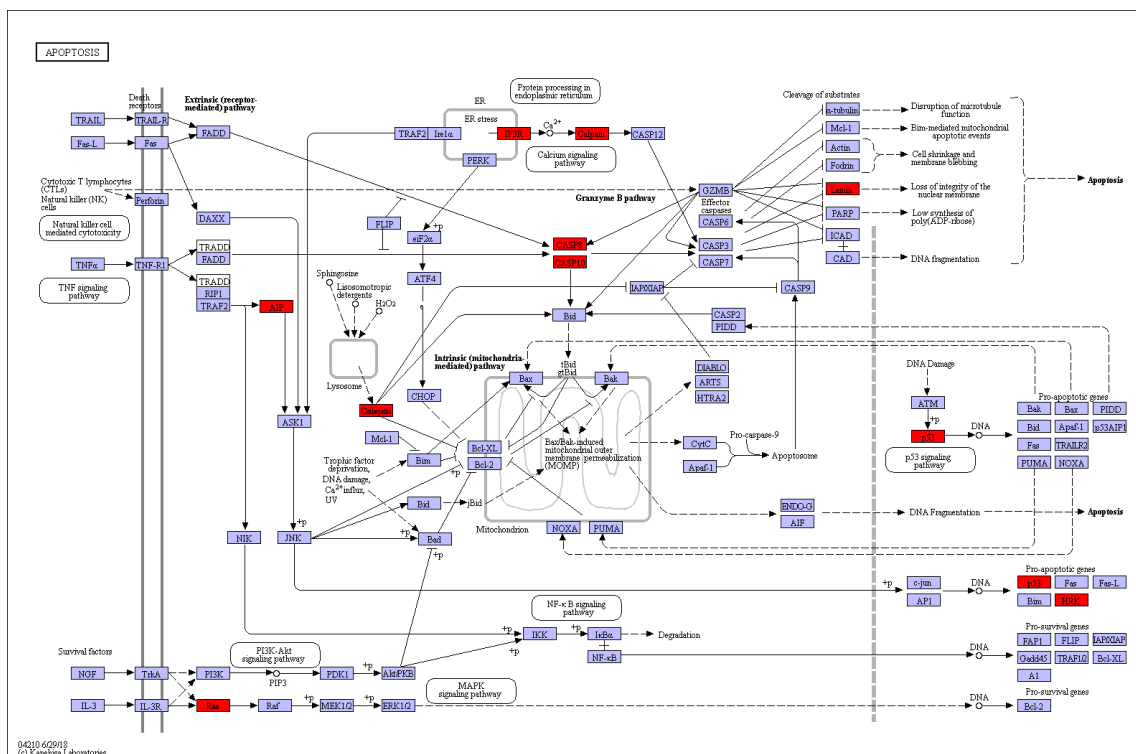


Figura 24. Alvos de *miR-485-5p* com expressão aumentada em diversas categorias ontológicas envolvidas na proliferação celular. As imagens obtidas a partir da ferramenta Kegg Mapper, da plataforma Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (kegg.jp), contém a relação de alvos que apresentam aumento de expressão (marcados em vermelho) nas categorias ontológicas: (A) *PI3K-Akt*

signaling pathway, (B) *JAK-STAT signaling pathway*, (C) *MAPK signaling pathway*, (D) *Ras signaling pathway* e (E) *Apoptosis*, e alvos putativos de *miR-485-5p*.

Em vista dos resultados obtidos, investigamos genes-alvos envolvidos em processos relacionados a proliferação celular, com o intuito de encontrar possíveis mecanismos que estejam influenciando na diminuição do número de células. A plataforma Kegg mostra que o gene *GAB2* está envolvido na modulação das vias de sinalização de RAS e MAPK (**Figura 24C e D**), e o mesmo possui dois sítios em que ocorrem a ligação do *miR-485-5p*, sendo eles, um conservado e outro pouco conservado (**Figura 25A**). De acordo com dados do TCGA, observamos aumento de 84% nos níveis de *GAB2*, em amostras de PTC em comparação com amostras normais. E assim como demonstrado por Heer e colaboradores (2017), o aumento de *GAB2* e *GAB3* na via MAPK, pode levar a modulação de *BRAF* e diminuir a proliferação celular (Herr et al., 2018). Em nossas análises sobre o perfil de expressão de *GAB2* e sua correlação com os dados clínicos disponíveis no TCGA, observamos que este gene se encontra mais expresso em amostras com a mutação *BRAFT1799A*, com implicações na piora da sobrevida global e livre de doença (**figura 25B**).

Os resultados encontrados a partir da transfecção de *miR-485-5p*, mostram a drástica redução da expressão de *GAB2* na linhagem BCPAP, mas não em linhagem TPC-1, sugerindo também forte influência do *background* genético sobre a ação de *miR-485-5p* (**Figura 26**). Esta regulação direta entre *miR-485-5p* e *GAB2* já foi demonstrada por Li e colaboradores (2018), que mostram a diminuição da proliferação em câncer colorretal (J. Li et al., 2018). Estes fatos apresentados sugerem que *miR-485-5p* pode regular negativamente a expressão de *GAB2* na linhagem BCPAP, o que poderia contribuir para diminuição viabilidade e proliferação celular observada em nossas análises funcionais.

A

Conserved

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	P _{CT}
Position 282-288 of GAB2 3' UTR	5' ... CCAAAAAGCAUCCUU--CAGCCUCU... 	7mer-m8	-0.24	94	-0.24	2.970	N/A
hsa-miR-485-5p	3' CUUAAGUAGUGCCGGUCGGAGA						
Position 282-288 of GAB2 3' UTR	5' ... CCAAAAAGCAUCCUU--CAGCCUCU... 	7mer-m8	-0.23	92	-0.23	2.970	N/A
hsa-miR-6884-5p	3' GUUGUAGUGGAAGAGUCGGAGA						

Poorly conserved

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	P _{CT}
Position 2526-2532 of GAB2 3' UTR	5' ... GGGCCCAGACUUAUUGCAGCCUCC... 	7mer-m8	-0.08	56	-0.08	0.134	N/A
hsa-miR-6884-5p	3' GUUGUAGUGGAAGAGUCGGAGA						
Position 2526-2532 of GAB2 3' UTR	5' ... GGGCCCAGACUUAUUGCAGCCUCC... 	7mer-m8	-0.07	53	-0.07	0.134	N/A
hsa-miR-485-5p	3' CUUAAGUAGUGCCGGUCGGAGA						

B

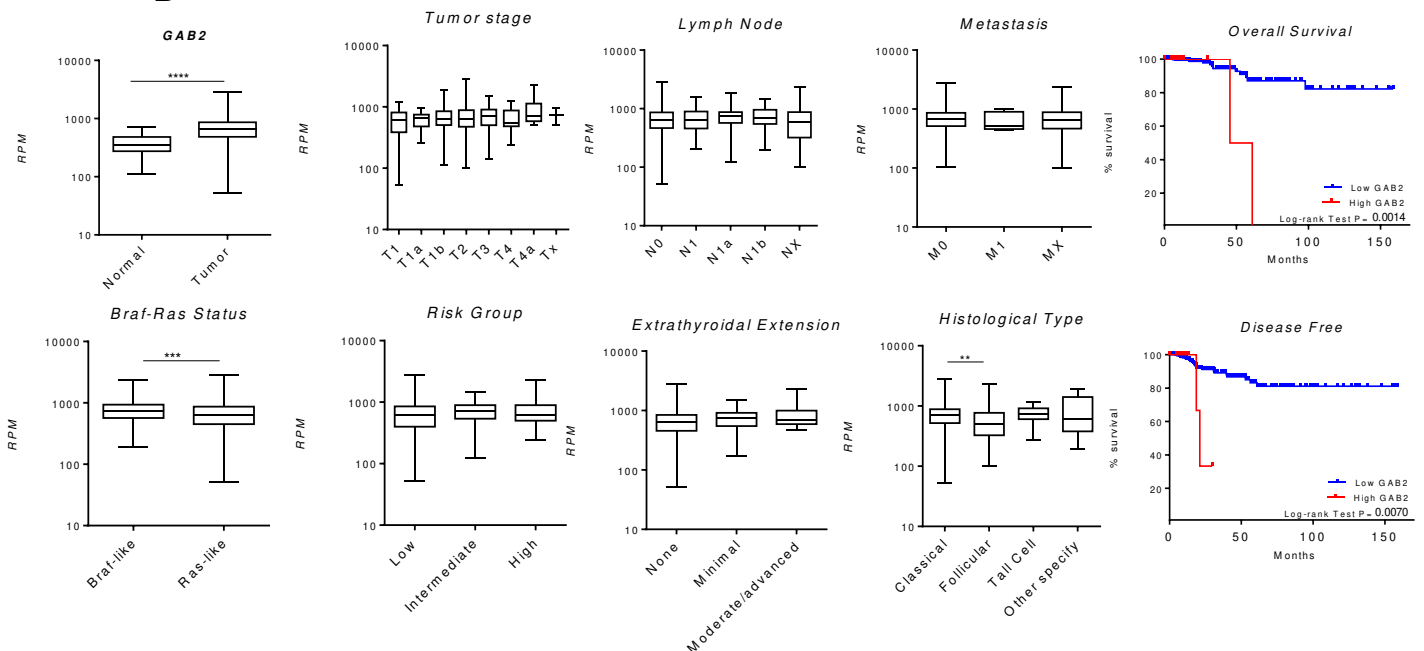


Figura 25. GAB2 como potencial alvo de miR-485-5p.

(A) Esquema representativo dos sítios de ligação de *miR-485-5p* à região 3'UTR de *GAB2*. (B) Comparação da diferença de expressão de *GAB2* entre amostras normais e tumorais, influência da diferença de expressão de *GAB2* em estágio tumoral, metástase linfonodal, metástase a distância, Braf-Ras status, grupo de risco, extensão extratiroideiana, tipo histológico, curva de sobrevivência geral e livre da doença respectivamente. Dados obtidos pelo dataset TCGA (<https://cancergenome.nih.gov>). Barras representam desvio-padrão. (*) $p < 0,05$. (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$. (****) $p < 0,0001$.

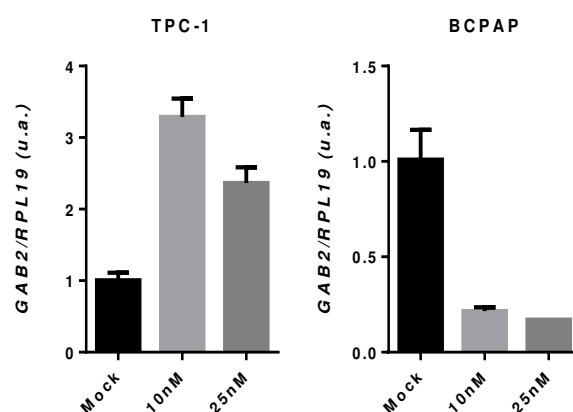


Figura 26. Modulação de *GAB2* por *miR-485-5p* em PTC.

Influência de *miR-485-5p* na expressão de *GAB2* nas linhagens TPC-1 e BCPAP. 5×10^5 células foram semeadas em placas de 60 mm e transfectadas (10nM e 25nM) ou não (Mock) pelo mimético comercial de *miR-485-5p overnight*. O RNA total extraído foi utilizado para síntese de cDNA para a subsequente quantificação da expressão gênica de *GAB2*. O gene *RPL19* foi utilizado como normalizador da reação. Os valores no eixo Y estão mostrados em unidades arbitrárias (u.a.). Barras representam desvio-padrão.

Ainda no contexto da proliferação, o gene *EREG* codifica para uma proteína relacionada à indução da proliferação celular por meio das vias PI3K-Akt e MAPK (**Figura 24A e C**). Este gene possui apenas regiões pouco conservadas de ligação do *miR-485-5p* em sua região 3'UTR (**Figura 27A**). Farroqui e colaboradores (2015), realizaram estudo envolvendo o gene *EREG* em cultura celular bidimensional, tridimensional e crescimento tumoral *in vivo* em câncer de mama, e observaram que o aumento da expressão deste gene promoveu uma maior sobrevivência celular em resposta a agentes quimioterápicos através da regulação de *MMP-1* (Farroqui et al., 2015).

Além disso outros estudos apresentam *EREG* como um importante gene envolvido na tumorigenese em diversos tipos de câncer (M. S. Lee et al., 2016; Qu et al., 2016; Yun et al., 2012). De acordo com o TCGA, as amostras tireoideanas tumorais apresentam aumento de 51% nos níveis de *EREG* em comparação com amostras normais, e as amostras tumorais apresentaram maior número de mutações em *BRAF T1799A* (**Figura 26B**). Diferentemente do observado até então, nossas análises evidenciam a diminuição de *EREG* em resposta a transfecção do *miR-485-5p* em linhagem TPC-1, efeito não observado na linhagem BCPAP, (**Figura 28**).

A

Poorly conserved

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	p _{ct}
Position 2099-2105 of EREG 3' UTR	5' ...GAGAUCCUCCUGCCUCAGCCUCC... 3' GUUGUAGUGGAAGA-GUCGGAGA	7mer-m8	-0.04	38	-0.04	0.131	N/A
Position 2099-2105 of EREG 3' UTR	5' ...GAGAUCCUCCUGCCUCAGCCUCC... 3' CUUAAGUAGUCCCGUCGGAGA	7mer-m8	-0.03	33	-0.03	0.131	N/A
Position 2232-2238 of EREG 3' UTR	5' ...GAGAUCCACCCUCCACAGCCUCC... 3' GUUGUAGUGGAAGA-GUCGGAGA	7mer-m8	-0.07	50	-0.07	0.125	N/A
Position 2232-2238 of EREG 3' UTR	5' ...GAGAUCCACCCUCCACAGCCUCC... 3' CUUAAGUAGUCCCGUCGGAGA	7mer-m8	-0.02	30	-0.02	0.125	N/A

B

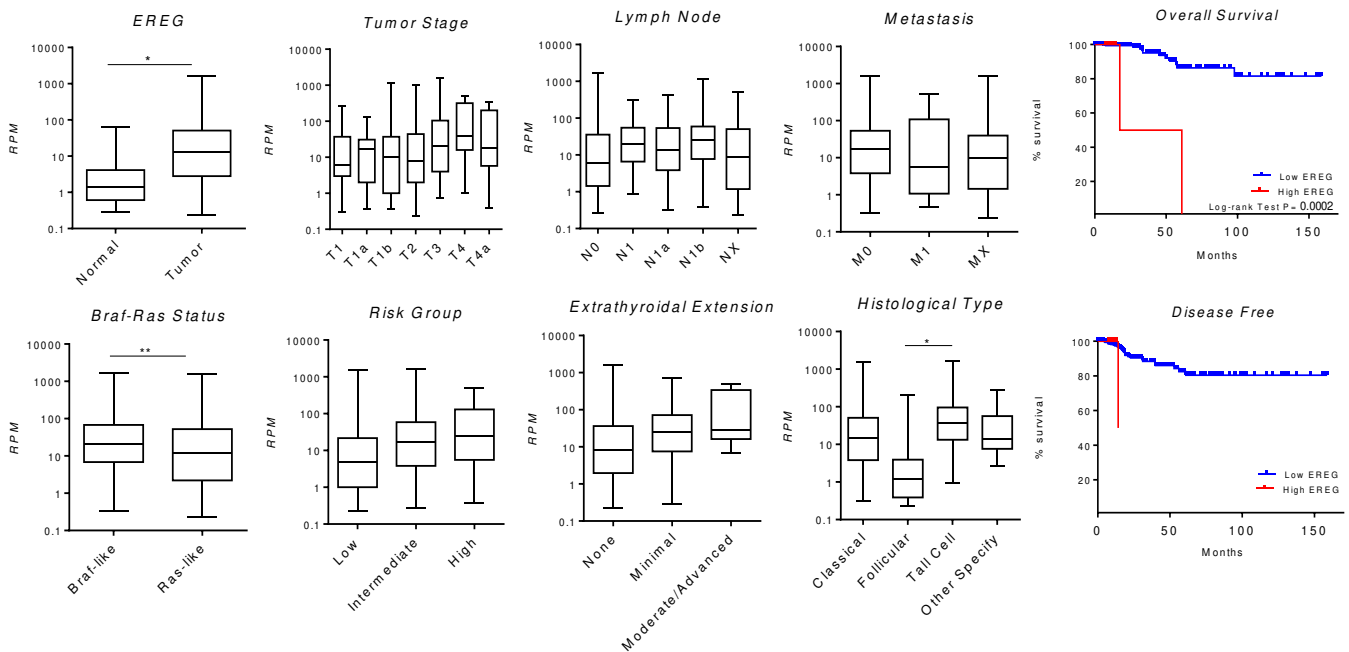


Figura 27. EREG como potencial alvo de miR-485-5p.

(A) Visualização dos sítios de ligação de miR-485-5p à região 3'UTR de EREG. (B) Comparação da diferença de expressão de EREG entre amostras normais e tumorais, Influência da diferença de expressão de EREG em estágio tumoral, metástase linfonodal, metástase a distância, Braf-Ras status, grupo de risco, extensão extratiroidiana, tipo histológico, curva de sobrevivência geral e livre da doença respectivamente. Dados obtidos pelo dataset TCGA (<https://cancergenome.nih.gov>). Barras representam desvio-padrão. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$.

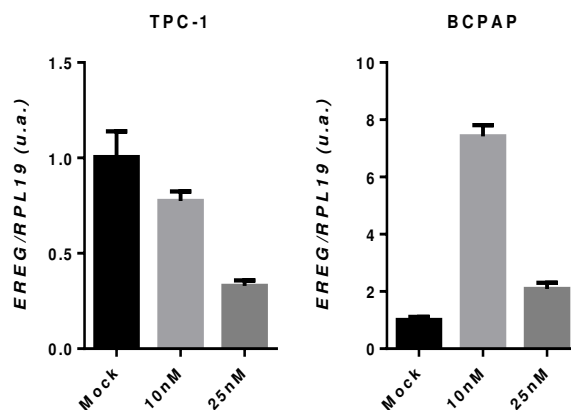


Figura 28. Modulação de *EREG* por *miR-485-5p* em PTC.

Influência de *miR-485-5p* na expressão de *EREG* nas linhagens TPC-1 e BCPAP. 5×10^5 células foram semeadas em placas de 60 mm e transfectadas (10nM e 25nM) ou não (Mock) pelo mimético comercial de *miR-485-5p overnight*. O RNA total extraído foi utilizado para síntese de cDNA para a subsequente quantificação da expressão gênica de *EREG*. O gene *RPL19* foi utilizado como normalizador da reação. Os valores no eixo Y estão mostrados em unidades arbitrárias (u.a.). Barras representam desvio-padrão.

O gene *LMNA* codifica uma proteína que participa da ancoragem da cromatina à face interna do envelope nuclear. Este gene possui apenas regiões pouco conservadas de ligação do *miR-485-5p* em sua região 3'UTR (**Figura 29A**). Apesar de existirem poucos estudos que abordam a diferença de expressão do gene *LMNA* e sua influência em processos tumorais, Cheng e colaboradores (2016), demonstraram que a expressão de *LMNA* em conjunto de CNOT1, é responsável por uma maior atividade oncogênica no papel de progressão tumoral em osteocarcinoma (Cheng et al., 2017). Interessantemente, os dados observados TCGA, percebemos uma forte influência da expressão de *LMNA* no contexto da tumorigênese em amostras tumorais de PTC, pois este apresenta aumento de expressão em 31% no PTC, o que nos despertou interesse na investigação da modulação deste gene por *miR-485-5p*.

Além disso, amostras tumorais com a mutação *BRAF T1799A* possuem maior expressão de *LMNA*, além da expressão do gene também apresentar aumento significativo em amostras tumorais de pacientes com metástase linfonodal, intermediário e alto grupo de risco, invasão extratiroideana, também mostra diferença entre o carcinoma papilífero clássico e folicular, e a diminuição na sobrevida global em pacientes com expressão alterada de *LMNA* (**Figura 29B**). Apesar de todos esses indicativos, a transfecção com *miR-485-5p* não resultou em alterações na expressão de *LMNA* em nenhuma das linhagens, indicando que no PTC, provavelmente não exista uma relação direta entre o *miR-485-5p* e *LMNA* (**Figura 30**).

A

Poorly conserved

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	PCT
Position 41-47 of LMNA 3' UTR	5' ...AGCCAGGCCUGGGGGCAGCCUCU... 	7mer-m8	-0.02	18	-0.02	1.880	N/A
hsa-miR-485-5p	3' CUUAAGUAGUGCCGGUCGAGA						
Position 52-58 of LMNA 3' UTR	5' ...GGGCAGCCUCUCCCGAGCCUCU... 	7mer-m8	-0.18	87	-0.18	0.482	N/A
hsa-miR-485-5p	3' CUUAAGUAGUGCCGGUCGAGA						

B

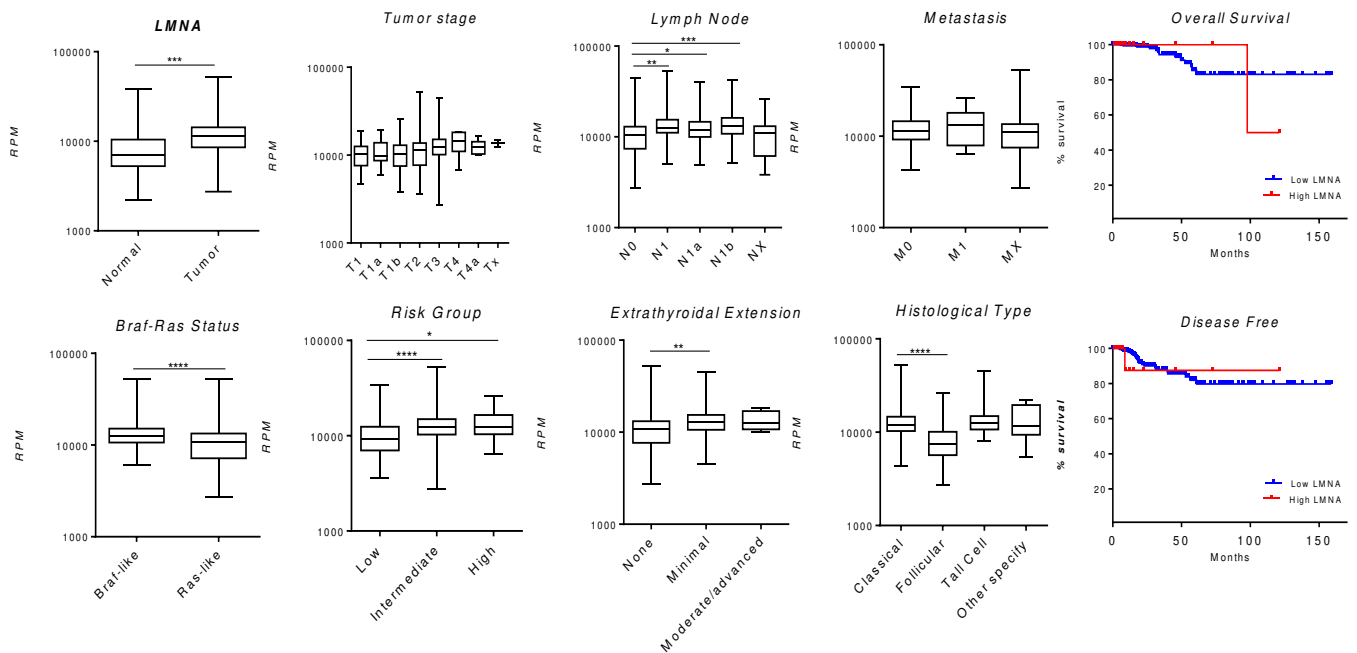


Figura 29. LMNA como potencial alvo de miR-485-5p.

(A) Visualização dos sítios de ligação de *miR-485-5p* à região 3'UTR de *LMNA*. (B) Comparação da diferença de expressão de *LMNA* entre amostras normais e tumorais, Influência da diferença de expressão de *LMNA* em estágio tumoral, metástase linfonodal, metástase a distância, Braf-Ras status, grupo de risco, extensão extratiroideana, tipo histológico, curva de sobrevivência geral e livre da doença respectivamente. Dados obtidos pelo dataset TCGA (<https://cancergenome.nih.gov>). Barras representam desvio-padrão. (*) $p < 0,05$. (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$. (****) $p < 0,0001$.

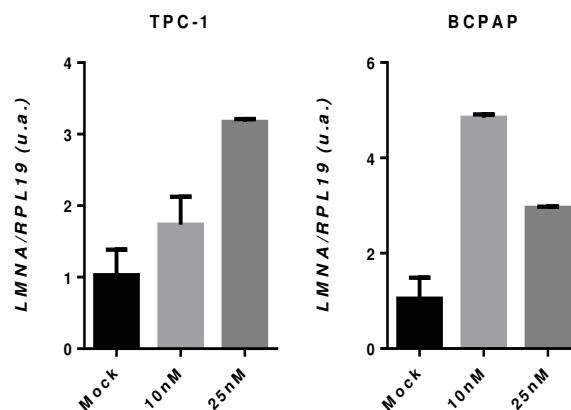


Figura 30. Modulação de LMNA por miR-485-5p em PTC.

Influência de *miR-485-5p* na expressão de *LMNA* nas linhagens TPC-1 e BCPAP. 5×10^5 células foram semeadas em placas de 60 mm e transfectadas (10nM e 25nM) ou não (Mock) pelo mimético comercial de *miR-485-5p* overnight. O RNA total extraído foi utilizado para síntese de cDNA para a subsequente

quantificação da expressão gênica de *LMNA*. O gene *RPL19* foi utilizado como normalizador da reação. Os valores no eixo Y estão mostrados em unidades arbitrárias (u.a.). Barras representam desvio-padrão.

Em vista dos resultados obtidos, observamos que a linhagem BCPAP, positiva para a mutação *BRAFT1799A*, apresentou resultados expressivos após a transfecção de *miR-485-5p*. Estas diferenças, principalmente observadas na análises de migração e invasão celular, poderiam ser explicadas pela modulação dos genes *RAC1* e *ICAM1*, também com expressão impactada por *miR-485-5p* de maneira dependente de *BRAFT1799A*. Diferentemente, a linhagem TPC-1, positiva para o rearranjo *RET/PTC1*, não apresentou alterações expressivas em nossas análises. Interessantemente, a análise do consórcio TCGA para o câncer de tireoide mostrou que a presença da mutação pontual *BRAFT1799A* leva a alterações transcricionais, epigenômicas e proteômicas, induzindo fenótipo particular, relacionado ao comportamento e progressão do PTC. De fato, tumores portadores da mutação *BRAFT1799A* tendem a apresentar maior agressividade, aumento na perda de diferenciação e conseqüentemente trazer maiores dificuldades no tratamento, uma vez que a captação de radioiodo se torna comprometida pela diminuição de expressão de genes envolvidos neste processo. Por outro lado, tumores que apresentam quaisquer outras alterações, tanto em *BRAF* quanto o rearranjo *RET/PTC*, possuem características menos agressivas e com menor perda de diferenciação (Cancer Genome Atlas Research, 2014). Desta forma, estes dados nos levam a hipotetizar que a restauração da expressão de *miR-485-5p* como estratégia terapêutica pode ter efeito sinérgico à presença da mutação *BRAFT1799A*, impactando principalmente o tratamento dos pacientes portadores desta mutação, que tendem a evoluir para o câncer metastático. Estes resultados, portanto, abrem novas perspectivas para a exploração de miRNAs como estratégias adjuvantes para o tratamento do carcinoma papilífero agressivo.

6 CONCLUSÃO

Nossa análise bioinformática revelou que os miRNAs da região DLK1-DIO3 podem modular diversos processos biológicos importantes para o desenvolvimento e progressão do câncer de tireoide. Dentre estes miRNAs, selecionamos *miR-485-5p*, o qual demonstrou seu potencial como supressor tumoral para o PTC, atuando principalmente nos processos de migração, invasão, proliferação e viabilidade celular. Além disso observamos a influência de *miR-485-5p* sobre a expressão dos alvos preditos computacionalmente *GAB2*, *RAC1*, *ICAM1*, *ITGA3* e *EREG*, membros importantes de vias e processos biológicos para a tumorigênese e progressão tumoral. Assim, nossas análises funcionais *in vitro* corroboram os dados obtidos na análise computacional, apontando *miR-485-5p* como um promissor supressor da progressão tumoral no câncer de tireoide, principalmente em tumores mais agressivos, portadores da mutação *BRAFT1799A*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acunzo, M., Romano, G., Wernicke, D., & Croce, C. M. (2015). MicroRNA and cancer--a brief overview. *Adv Biol Regul*, *57*, 1-9. doi: 10.1016/j.jbior.2014.09.013
- Aiello, N. M., & Kang, Y. (2019). Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *J Exp Med*, *216*(5), 1016-1026. doi: 10.1084/jem.20181827
- Anaya-Ruiz, M., Bandala, C., & Perez-Santos, J. L. (2013). miR-485 acts as a tumor suppressor by inhibiting cell growth and migration in breast carcinoma T47D cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, *14*(6), 3757-3760.
- Aukerman, M. J., & Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell*, *15*(11), 2730-2741. doi: 10.1105/tpc.016238
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116*(2), 281-297.
- Benetatos, L., Hatzimichael, E., Londin, E., Vartholomatos, G., Loher, P., Rigoutsos, I., & Briasoulis, E. (2013). The microRNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: involvement in disease pathogenesis. *Cell Mol Life Sci*, *70*(5), 795-814. doi: 10.1007/s00018-012-1080-8
- Betel, D., Koppal, A., Agius, P., Sander, C., & Leslie, C. (2010). Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol*, *11*(8), R90. doi: 10.1186/gb-2010-11-8-r90
- Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D. S., & Sander, C. (2008). The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res*, *36*(Database issue), D149-153. doi: 10.1093/nar/gkm995
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, *68*(6), 394-424. doi: 10.3322/caac.21492
- Buitrago, D., Keutgen, X. M., Crowley, M., Filicori, F., Aldailami, H., Hoda, R., . . . Zarnegar, R. (2012). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is upregulated in aggressive papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg Oncol*, *19*(3), 973-980. doi: 10.1245/s10434-011-2029-0
- Burman, K. D., & Wartofsky, L. (2016). Thyroid Nodules. *N Engl J Med*, *374*(13), 1294-1295. doi: 10.1056/NEJMc1600493
- Cahill, S., Smyth, P., Denning, K., Flavin, R., Li, J., Potratz, A., . . . Sheils, O. (2007). Effect of BRAFV600E mutation on transcription and post-transcriptional regulation in a papillary thyroid carcinoma model. *Mol Cancer*, *6*, 21. doi: 10.1186/1476-4598-6-21
- Cahill, S., Smyth, P., Finn, S. P., Denning, K., Flavin, R., O'Regan, E. M., . . . Sheils, O. (2006). Effect of ret/PTC 1 rearrangement on transcription and post-transcriptional regulation in a papillary thyroid carcinoma model. *Mol Cancer*, *5*, 70. doi: 10.1186/1476-4598-5-70
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., . . . Croce, C. M. (2002). 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*, *99*(24), 15524-15529. doi: 10.1073/pnas.242606799
- Cancer Genome Atlas Research, N. (2014). Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*, *159*(3), 676-690. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.050
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., . . . Guegler, K. J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, *33*(20), e179. doi: 10.1093/nar/gni178

- Cheng, D. D., Li, J., Li, S. J., Yang, Q. C., & Fan, C. Y. (2017). CNOT1 cooperates with LMNA to aggravate osteosarcoma tumorigenesis through the Hedgehog signaling pathway. *Mol Oncol*, *11*(4), 388-404. doi: 10.1002/1878-0261.12043
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, *162*(1), 156-159. doi: 10.1006/abio.1987.9999
- Duan, J., Zhang, H., Li, S., Wang, X., Yang, H., Jiao, S., & Ba, Y. (2017). The role of miR-485-5p/NUDT1 axis in gastric cancer. *Cancer Cell Int*, *17*, 92. doi: 10.1186/s12935-017-0462-2
- Eun, J. W., Kim, H. S., Shen, Q., Yang, H. D., Kim, S. Y., Yoon, J. H., . . . Nam, S. W. (2018). MicroRNA-495-3p functions as a tumor suppressor by regulating multiple epigenetic modifiers in gastric carcinogenesis. *J Pathol*, *244*(1), 107-119. doi: 10.1002/path.4994
- Farooqui, M., Bohrer, L. R., Brady, N. J., Chuntova, P., Kemp, S. E., Wardwell, C. T., . . . Schwertfeger, K. L. (2015). Epiregulin contributes to breast tumorigenesis through regulating matrix metalloproteinase 1 and promoting cell survival. *Mol Cancer*, *14*, 138. doi: 10.1186/s12943-015-0408-z
- Fukushima, T., & Takenoshita, S. (2005). Roles of RAS and BRAF mutations in thyroid carcinogenesis. *Fukushima J Med Sci*, *51*(2), 67-75.
- Fuziwara, C. S., & Kimura, E. T. (2014). MicroRNA Deregulation in Anaplastic Thyroid Cancer Biology. *Int J Endocrinol*, *2014*, 743450. doi: 10.1155/2014/743450
- Ge, W., Han, C., Wang, J., & Zhang, Y. (2016). MiR-300 suppresses laryngeal squamous cell carcinoma proliferation and metastasis by targeting ROS1. *Am J Transl Res*, *8*(9), 3903-3911.
- Geraldo, M. V., & Kimura, E. T. (2015). Integrated Analysis of Thyroid Cancer Public Datasets Reveals Role of Post-Transcriptional Regulation on Tumor Progression by Targeting of Immune System Mediators. *PLoS One*, *10*(11), e0141726. doi: 10.1371/journal.pone.0141726
- Geraldo, M. V., Nakaya, H. I., & Kimura, E. T. (2017). Down-regulation of 14q32-encoded miRNAs and tumor suppressor role for miR-654-3p in papillary thyroid cancer. *Oncotarget*, *8*(6), 9597-9607. doi: 10.18632/oncotarget.14162
- Geraldo, M. V., Yamashita, A. S., & Kimura, E. T. (2012). MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF-beta by repressing SMAD4 in thyroid cancer. *Oncogene*, *31*(15), 1910-1922. doi: 10.1038/onc.2011.381
- Ghorbanmehr, N., Gharbi, S., Korsching, E., Tavallaei, M., Einollahi, B., & Mowla, S. J. (2018). miR-21-5p, miR-141-3p, and miR-205-5p levels in urine-promising biomarkers for the identification of prostate and bladder cancer. *Prostate*. doi: 10.1002/pros.23714
- Gong, Y., Wu, W., Zou, X., Liu, F., Wei, T., & Zhu, J. (2018). MiR-26a inhibits thyroid cancer cell proliferation by targeting ARPP19. *Am J Cancer Res*, *8*(6), 1030-1039.
- Guo, G. X., Li, Q. Y., Ma, W. L., Shi, Z. H., & Ren, X. Q. (2015). MicroRNA-485-5p suppresses cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting stanniocalcin 2. *Int J Clin Exp Pathol*, *8*(10), 12292-12299.
- Haga, C. L., & Phinney, D. G. (2012). MicroRNAs in the imprinted DLK1-DIO3 region repress the epithelial-to-mesenchymal transition by targeting the TWIST1 protein signaling network. *J Biol Chem*, *287*(51), 42695-42707. doi: 10.1074/jbc.M112.387761
- Hall, R. D., & Kudchadkar, R. R. (2014). BRAF mutations: signaling, epidemiology, and clinical experience in multiple malignancies. *Cancer Control*, *21*(3), 221-230. doi: 10.1177/107327481402100307

- Hartmann, K. (2015). Thyroid Disorders in the Oncology Patient. *J Adv Pract Oncol*, 6(2), 99-106.
- He, H., Jazdzewski, K., Li, W., Liyanarachchi, S., Nagy, R., Volinia, S., . . . de la Chapelle, A. (2005). The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(52), 19075-19080. doi: 10.1073/pnas.0509603102
- He, N., Zheng, H., Li, P., Zhao, Y., Zhang, W., Song, F., & Chen, K. (2014). miR-485-5p binding site SNP rs8752 in HPGD gene is associated with breast cancer risk. *PLoS One*, 9(7), e102093. doi: 10.1371/journal.pone.0102093
- Herr, R., Halbach, S., Heizmann, M., Busch, H., Boerries, M., & Brummer, T. (2018). BRAF inhibition upregulates a variety of receptor tyrosine kinases and their downstream effector Gab2 in colorectal cancer cell lines. *Oncogene*, 37(12), 1576-1593. doi: 10.1038/s41388-017-0063-5
- Hu, G., Lv, Q., Yan, J., Chen, L., Du, J., Zhao, K., & Xu, W. (2018). MicroRNA-17 as a promising diagnostic biomarker of gastric cancer: An investigation combining TCGA, GEO, meta-analysis, and bioinformatics. *FEBS Open Bio*, 8(9), 1508-1523. doi: 10.1002/2211-5463.12496
- Huang, Y., Kong, Y., Zhang, L., He, T., Zhou, X., Yan, Y., . . . Wang, W. (2018). High Expression of ITGA3 Promotes Proliferation and Cell Cycle Progression and Indicates Poor Prognosis in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Biomed Res Int*, 2018, 2352139. doi: 10.1155/2018/2352139
- Idichi, T., Seki, N., Kurahara, H., Fukuhisa, H., Toda, H., Shimonosono, M., . . . Natsugoe, S. (2018). Involvement of anti-tumor miR-124-3p and its targets in the pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma: direct regulation of ITGA3 and ITGB1 by miR-124-3p. *Oncotarget*, 9(48), 28849-28865. doi: 10.18632/oncotarget.25599
- Jhiang, S. M., Caruso, D. R., Gilmore, E., Ishizaka, Y., Tahira, T., Nagao, M., . . . Mazzaferri, E. L. (1992). Detection of the PTC/refTPC oncogene in human thyroid cancers. *Oncogene*, 7(7), 1331-1337.
- Jin, H. Y., Gonzalez-Martin, A., Miletic, A. V., Lai, M., Knight, S., Sabouri-Ghomi, M., . . . Xiao, C. (2015). Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution. *Front Genet*, 6, 340. doi: 10.3389/fgene.2015.00340
- Juzwik, C. A., Drake, S., Lecuyer, M. A., Johnson, R. M., Morquette, B., Zhang, Y., . . . Fournier, A. E. (2018). Neuronal microRNA regulation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Sci Rep*, 8(1), 13437. doi: 10.1038/s41598-018-31542-y
- Kang, M., Ren, M. P., Zhao, L., Li, C. P., & Deng, M. M. (2015). miR-485-5p acts as a negative regulator in gastric cancer progression by targeting flotillin-1. *Am J Transl Res*, 7(11), 2212-2222.
- Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(5), 376-385. doi: 10.1038/nrm1644
- Kolluru, V., Chandrasekaran, B., Tyagi, A., Dervishi, A., Ankem, M., Yan, X., . . . Damodaran, C. (2018). miR-301a expression: Diagnostic and prognostic marker for prostate cancer. *Urol Oncol*, 36(11), 503 e509-503 e515. doi: 10.1016/j.urolonc.2018.07.014
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543), 853-858. doi: 10.1126/science.1064921
- Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., & Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543), 858-862. doi: 10.1126/science.1065062

- Leblanc, N., Harquail, J., Crapoulet, N., Ouellette, R. J., & Robichaud, G. A. (2018). Pax-5 Inhibits Breast Cancer Proliferation Through MiR-215 Up-regulation. *Anticancer Res*, 38(9), 5013-5026. doi: 10.21873/anticancer.12820
- Lee, M. S., McGuffey, E. J., Morris, J. S., Manyam, G., Baladandayuthapani, V., Wei, W., . . . Kopetz, S. (2016). Association of CpG island methylator phenotype and EREG/AREG methylation and expression in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 114(12), 1352-1361. doi: 10.1038/bjc.2016.87
- Lee, R. C., & Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543), 862-864. doi: 10.1126/science.1065329
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854.
- Leelawattanachai, J., Kwon, K. W., Michael, P., Ting, R., Kim, J. Y., & Jin, M. M. (2015). Side-by-Side Comparison of Commonly Used Biomolecules That Differ in Size and Affinity on Tumor Uptake and Internalization. *PLoS One*, 10(4), e0124440. doi: 10.1371/journal.pone.0124440
- Li, J., Xu, J., Yan, X., Jin, K., Li, W., & Zhang, R. (2018). MicroRNA-485 plays tumour-suppressive roles in colorectal cancer by directly targeting GAB2. *Oncol Rep*, 40(1), 554-564. doi: 10.3892/or.2018.6449
- Li, P., Dong, M., & Wang, Z. (2018). Downregulation of TSPAN13 by miR-369-3p inhibits cell proliferation in papillary thyroid cancer (PTC). *Bosn J Basic Med Sci*. doi: 10.17305/bjbms.2018.2865
- Li, X., Ding, Z., Zhang, C., Zhang, X., Meng, Q., Wu, S., . . . Chen, R. (2016). MicroRNA-1228(*) inhibit apoptosis in A549 cells exposed to fine particulate matter. *Environ Sci Pollut Res Int*, 23(10), 10103-10113. doi: 10.1007/s11356-016-6253-9
- Li, Y., Cui, X., Li, Y., Zhang, T., & Li, S. (2018). Upregulated expression of miR-421 is associated with poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *Cancer Manag Res*, 10, 2627-2633. doi: 10.2147/CMAR.S167432
- Li, Y., Wang, Y., Fan, H., Zhang, Z., & Li, N. (2018). miR-125b-5p inhibits breast cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting KIAA1522. *Biochem Biophys Res Commun*, 504(1), 277-282. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.08.172
- Lima, C. R., Geraldo, M. V., Fuziwara, C. S., Kimura, E. T., & Santos, M. F. (2016). MiRNA-146b-5p upregulates migration and invasion of different Papillary Thyroid Carcinoma cells. *BMC Cancer*, 16, 108. doi: 10.1186/s12885-016-2146-z
- Lou, C., Xiao, M., Cheng, S., Lu, X., Jia, S., Ren, Y., & Li, Z. (2016). MiR-485-3p and miR-485-5p suppress breast cancer cell metastasis by inhibiting PGC-1alpha expression. *Cell Death Dis*, 7, e2159. doi: 10.1038/cddis.2016.27
- Luo, L., Xia, L., Zha, B., Zuo, C., Deng, D., Chen, M., . . . Zhang, Q. (2018). miR-335-5p targeting ICAM-1 inhibits invasion and metastasis of thyroid cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 106, 983-990. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.046
- Maciel, R. M., Kimura, E. T., & Cerutti, J. M. (2005). [Pathogenesis of differentiated thyroid cancer (papillary and follicular)]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 49(5), 691-700. doi: /S0004-27302005000500009
- Omur, O., & Baran, Y. (2014). An update on molecular biology of thyroid cancers. *Crit Rev Oncol Hematol*, 90(3), 233-252. doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.12.007
- Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J. C., & Weigel, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, 425(6955), 257-263. doi: 10.1038/nature01958

- Pallante, P., Visone, R., Ferracin, M., Ferraro, A., Berlingieri, M. T., Troncone, G., . . . Fusco, A. (2006). MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer*, *13*(2), 497-508. doi: 10.1677/erc.1.01209
- Peng, Z. Y., Gu, R. H., & Yan, B. (2018). Downregulation of exosome-encapsulated miR-548c-5p is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J Cell Biochem*. doi: 10.1002/jcb.27291
- Qu, X., Sandmann, T., Frierson, H., Jr., Fu, L., Fuentes, E., Walter, K., . . . Kabbarah, O. (2016). Integrated genomic analysis of colorectal cancer progression reveals activation of EGFR through demethylation of the EREG promoter. *Oncogene*, *35*(50), 6403-6415. doi: 10.1038/onc.2016.170
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., . . . Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *403*(6772), 901-906. doi: 10.1038/35002607
- Ricarte Filho, J. C., & Kimura, E. T. (2006). [MicroRNAs: novel class of gene regulators involved in endocrine function and cancer]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, *50*(6), 1102-1107.
- Schellerer, V. S., Langheinrich, M., Hohenberger, W., Croner, R. S., Merkel, S., Rau, T. T., . . . Naschberger, E. (2014). Tumor-associated fibroblasts isolated from colorectal cancer tissues exhibit increased ICAM-1 expression and affinity for monocytes. *Oncol Rep*, *31*(1), 255-261. doi: 10.3892/or.2013.2860
- Sekar, D., Venugopal, B., Sekar, P., & Ramalingam, K. (2016). Role of microRNA 21 in diabetes and associated/related diseases. *Gene*, *582*(1), 14-18. doi: 10.1016/j.gene.2016.01.039
- Severi, G., Bernardini, L., Briuglia, S., Bigoni, S., Buldrini, B., Magini, P., . . . Graziano, C. (2016). New patients with Temple syndrome caused by 14q32 deletion: Genotype-phenotype correlations and risk of thyroid cancer. *Am J Med Genet A*, *170A*(1), 162-169. doi: 10.1002/ajmg.a.37346
- Shalapour, S., & Karin, M. (2015). Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J Clin Invest*, *125*(9), 3347-3355. doi: 10.1172/JCI80007
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*, *68*(1), 7-30. doi: 10.3322/caac.21442
- Sun, X., Liu, Y., Li, M., Wang, M., & Wang, Y. (2015). Involvement of miR-485-5p in hepatocellular carcinoma progression targeting EMMPRIN. *Biomed Pharmacother*, *72*, 58-65. doi: 10.1016/j.biopha.2015.04.008
- Tolosa, E., Botta-Orfila, T., Morato, X., Calatayud, C., Ferrer-Lorente, R., Marti, M. J., . . . Fernandez-Santiago, R. (2018). MicroRNA alterations in iPSC-derived dopaminergic neurons from Parkinson disease patients. *Neurobiol Aging*, *69*, 283-291. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.05.032
- Wang, C., Lu, S., Jiang, J., Jia, X., Dong, X., & Bu, P. (2014). Hsa-microRNA-101 suppresses migration and invasion by targeting Rac1 in thyroid cancer cells. *Oncol Lett*, *8*(4), 1815-1821. doi: 10.3892/ol.2014.2361
- Wang, C., Yan, G., Zhang, Y., Jia, X., & Bu, P. (2015). Long non-coding RNA MEG3 suppresses migration and invasion of thyroid carcinoma by targeting of Rac1. *Neoplasia*, *62*(4), 541-549. doi: 10.4149/neo_2015_065
- Wang, X., & Qi, M. (2018). miR-718 is involved in malignancy of papillary thyroid cancer through repression of PDPK1. *Pathol Res Pract*, *214*(11), 1787-1793. doi: 10.1016/j.prp.2018.08.022
- Wu, J., Li, J., Ren, J., & Zhang, D. (2017). MicroRNA-485-5p represses melanoma cell invasion and proliferation by suppressing Frizzled7. *Biomed Pharmacother*, *90*, 303-310. doi: 10.1016/j.biopha.2017.03.064

- Yan, R., Yang, T., Zhai, H., Zhou, Z., Gao, L., & Li, Y. (2018). MicroRNA-150-5p affects cell proliferation, apoptosis, and EMT by regulation of the BRAF(V600E) mutation in papillary thyroid cancer cells. *J Cell Biochem*, *119*(11), 8763-8772. doi: 10.1002/jcb.27108
- Yang, N., Wang, L., Liu, J., Liu, L., Huang, J., Chen, X., & Luo, Z. (2018). MicroRNA-206 regulates the epithelial-mesenchymal transition and inhibits the invasion and metastasis of prostate cancer cells by targeting Annexin A2. *Oncol Lett*, *15*(6), 8295-8302. doi: 10.3892/ol.2018.8395
- Yang, X., Ruan, H., Hu, X., Cao, A., & Song, L. (2017). miR-381-3p suppresses the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells by directly targeting FGFR2. *Am J Cancer Res*, *7*(4), 913-922.
- Yu, J., Wu, S. W., & Wu, W. P. (2017). A tumor-suppressive microRNA, miRNA-485-5p, inhibits glioma cell proliferation and invasion by down-regulating TPD52L2. *Am J Transl Res*, *9*(7), 3336-3344.
- Yun, J., Song, S. H., Park, J., Kim, H. P., Yoon, Y. K., Lee, K. H., . . . Kim, T. Y. (2012). Gene silencing of EREG mediated by DNA methylation and histone modification in human gastric cancers. *Lab Invest*, *92*(7), 1033-1044. doi: 10.1038/labinvest.2012.61
- Zehavi, L., Avraham, R., Barzilai, A., Bar-Ilan, D., Navon, R., Sidi, Y., . . . Leibowitz-Amit, R. (2012). Silencing of a large microRNA cluster on human chromosome 14q32 in melanoma: biological effects of mir-376a and mir-376c on insulin growth factor 1 receptor. *Mol Cancer*, *11*, 44. doi: 10.1186/1476-4598-11-44
- Zhang, J. Q., Chen, S., Gu, J. N., Zhu, Y., Zhan, Q., Cheng, D. F., . . . Peng, C. H. (2018). MicroRNA-300 promotes apoptosis and inhibits proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/beta-catenin signaling pathway by targeting CUL4B in pancreatic cancer cells. *J Cell Biochem*, *119*(1), 1027-1040. doi: 10.1002/jcb.26270
- Zhang, X., Liu, L., Deng, X., Li, D., Cai, H., Ma, Y., . . . Lv, Z. (2018). MicroRNA 483-3p targets Pard3 to potentiate TGF-beta1-induced cell migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition in anaplastic thyroid cancer cells. *Oncogene*. doi: 10.1038/s41388-018-0447-1

8 ANEXOS

8.1 Termo de bioética/biossegurança



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgeb@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "**Avaliação do papel supressor tumoral de microRNAs da região genômica DLK1-DIO3 no carcinoma papilífero de tireoide**", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Leonardo A Marson
Nome do(a) aluno(a): Leonardo Augusto Marson

Assinatura: Murilo Vieira Geraldo
Nome do(a) orientador(a): Murilo Vieira Geraldo

Data: 06 de maio de 2019

8.2 Declaração de direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Avaliação do papel supressor tumoral de microRNAs da região genômica DLK1-DIO3 no carcinoma papilífero de tireoide**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 06 de maio de 2019

Assinatura: Leonardo A Marson
Nome do(a) autor(a): **Leonardo Augusto Marson**
RG n.º 48.651.097-9

Assinatura: Murilo Vieira Geraldo
Nome do(a) orientador(a): **Murilo Vieira Geraldo**
RG n.º 32.568.273-2