

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA**

**O papel do miR-21-3p e miR-146b-5p na patogênese do câncer papilar da
tireoide**

ANA PAULA PALAURO GOULARTE

Porto Alegre, Março de 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

**O papel de miR-21-3p e miR-146b-5p na patogênese do câncer papilar da
tireoide**

ANA PAULA PALAURO GOULARTE

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Endocrinologia, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lucieli Ceolin

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Luiza Maia

Porto Alegre, Março de 2022

"Sou muito grato às adversidades que apareceram na minha vida, pois elas me ensinaram a tolerância, a simpatia, o autocontrole, a perseverança e outras qualidades que, sem essas adversidades, eu jamais conheceria".

Napoleon Hill

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Rita, maior incentivadora, dos meus sonhos. Agradeço por acreditar em mim e não me deixar desistir sobre nenhuma possibilidade. Aos meus irmãos, Paulo, Roberta e Aline que sempre acreditaram no meu potencial e se orgulham da irmã que tem e entederam minha ausência, morando longe de casa.

À professora Lucieli Ceolin por ter me aceito como orientanda desde a graduação. Além de uma orientadora tenho uma amiga que entende todas as etapas que passei para chegar até aqui. Obrigada pelos ensinamentos que vão além da bancada, pela paciência, pelas oportunidades e por estar comigo. Torço por você!

À professora Ana Luiza Maia pela oportunidade de iniciar no laboratório do Grupo de Tireoide em 2016 como iniciação científica. Obrigada por me proporcionar um *background* com diferentes experiências que me fizeram crescer como pessoa.

À Mirian Romitti, Rafael Scheffel e Taís Assmann, pela contribuição no desenvolvimento do trabalho, além da troca de conhecimento.

À Carla Vaz, parceira e colega que esteve comigo nesses anos, desde a iniciação científica, assim como na conclusão deste trabalho. Agradeço pelo apoio, carinho e amizade.

Ao pessoal do Grupo de Tireoide, Serviço de Endocrinologia e a todos que me de alguma forma me ensinaram muito ao longo dos anos e contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho.

E por fim, aos órgãos de fomento, essenciais para a realização desse trabalho, CNPq, CAPES e FIPE-HCPA.

Esta dissertação de mestrado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, apresentada na forma de uma breve introdução geral sobre o assunto da dissertação e na sequência o artigo original, seguido das considerações finais.

Artigo original: The Role of miR-21-3p and miR-146b-5p on Papillary Thyroid Cancer Pathogenesis

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	25
4 REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO 2 - ARTIGO ORIGINAL:.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

Referencial teórico

AGO - Argonauta
AJCC - *American Joint Committee on Cancer*
ATA - *American Thyroid Association*
CDT - Carcinoma diferenciado de tireoide
CFT - Carcinoma folicular de tireoide
CMT - Carcinoma medular de tireoide
CPT - Carcinoma papilar de tireoide
INCA - Instituto Nacional do Câncer
ITQs - Inibidores tirosino-quinase
MAPK - *mitogen-associated protein kinase*
miRNA - microRNA
miRISC - *miRNA-induced silencing complex*
OMS - Organização mundial da saúde
RAI - Radioiodo
TG - Tireoglobulina
TNM - *Tumor, Node, Metastasis*
TSH - Hormônio estimulante da tireoide
XPO5 - Exportina 5

Artigo original

BCL2 - B-cell lymphoma 2
CDC25A - Cell division cycle 25A
CT - Computed tomography
DTC - Differentiated thyroid cancer
HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre
MIQE - Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR

Experiments

miRNAs - MicroRNAs

PCR - Polymerase chain reaction *PDCD4* - Programmed cell death 4

PTEN - phosphatase and tensin homolog

PTC - Papillary thyroid carcinoma

RAI - Radioactive iodine

SD - Standard deviation

sTg - Stimulated TSH

THRB - Thyroid hormone receptor beta

Tg - Thyroglobulin

TgAb - Antithyroglobulin antibody

TNM - *Tumor, Node, Metastasis*

TSH - Stimulated thyrotropin

TT - total thyroidectomy

US - Ultrasound

WBS - Whole-body scan

RESUMO

O carcinoma papilífero de tireoide (CPT) é a neoplasia endócrina mais comum, responsável por 80-85% de todos os cânceres de tireoide e 1% de todas as neoplasias malignas humanas. Prever a evolução do CPT é um desafio atual para o manejo desse tipo de câncer. Embora o CPT geralmente tenha um bom prognóstico, uma fração dos pacientes apresentará comportamento agressivo com prognóstico ruim. Determinar o risco de um paciente desenvolver uma doença agressiva é útil para a adoção de estratégias de redução de risco de forma individualizada e personalizada. Recentemente, vários biomarcadores têm sido usados para determinar o risco de um indivíduo desenvolver câncer.

MicroRNAs (miRNAs) podem regular muitas funções biológicas, como desenvolvimento celular, proliferação e transdução de sinais. Alterações na expressão de miRNAs são descritas em muitas doenças humanas, incluindo câncer. A expressão de miRNA é comumente desregulada no câncer e tornou-se um marco para o diagnóstico e prognóstico desta doença. No carcinoma de tireoide, estudos têm demonstrado que o perfil de expressão de miRNAs pode contribuir para prever a evolução e o desfecho da doença.

Neste estudo, realizamos algumas análises de bioinformática e *ex vivo* para explorar o papel de miR-21-3p e miR-146b-5p no contexto do CPT. Nossos dados apontam as vias associadas ao câncer MAPK, PI3K-AKT, Wnt, Notch, RAS e mTOR como alvos para miR-21-3p e miR-146b-5p e observamos uma correlação positiva entre a expressão desses miRNA em amostras de CPT. Além disso, demonstramos expressão aumentada do miR-146b-5p em CPT e associação do miR-21-3p com características clínicas e oncológicas da doença. Esses fatos destacam a relevância de realizar uma análise prévia de possíveis interações por bioinformática, bem como investigar se os miRNAs podem impactar os desfechos clínicos de pacientes com CPT.

ABSTRACT

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common endocrine malignancy, responsible for 80-85% of all thyroid cancer and 1% of all human malignancies. Predicting the evolution of PTC is a current challenge for cancer management. Although PTC generally has a good prognosis, a fraction of patients will exhibit aggressive behavior with a poor prognosis. Determining a patient's risk of developing an aggressive disease is useful for adopting risk reduction strategies in an individualized and personalized way. Recently, several biomarkers have been used to determine the risk of an individual developing cancer.

MicroRNAs (miRNAs) can regulate many biological functions, such as cell development, proliferation, and signal transductions. Changes in miRNA expressions are described in many human diseases, including cancer. The miRNA expression is commonly deregulated in cancer and became hallmarks for the diagnosis and prognosis of this disease. In thyroid carcinoma, studies have demonstrated that the expression profile of miRNAs can contribute to predicting the disease evolution and outcome.

In this study, we performed some bioinformatics and ex vivo analysis to explore the role of miR-21-3p and miR-146b-5p in the context of PTC. Our data point out the cancer-associated pathways MAPK, PI3K-Akt, Wnt, Notch, Ras, and mTOR as targets for miR-21-3p and miR-146b-5p and we observed a positive correlation between these miRNA expressions in PTC samples. Additionally, we demonstrated upregulation of miR-146b-5p in PTC tumors and the association of the miR-21-3p with clinical and oncological features of the disease. These facts highlight the relevance of carrying out a prior analysis of possible interactions by bioinformatics, as well to investigate if these miRNAs could impact the clinical outcomes of PTC patients.

CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do Carcinoma de Tireoide

O carcinoma de tireoide é a neoplasia maligna mais comum do sistema endócrino e a quinta neoplasia mais comum em mulheres, com uma crescente incidência nas últimas décadas (La Vecchia, Malvezzi et al. 2015; Bray, Ferlay et al. 2018). Para o ano de 2020, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), são esperados aproximadamente 590 mil casos de carcinoma de tireoide (WHO 2018). Para o triênio 2020-2022, no Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam uma incidência de 1.830 novos casos de câncer de tireoide em homens e 11.950 novos casos em mulheres, sendo que no sexo feminino é a quinta neoplasia mais prevalente (INCA 2019). Apesar do aumento significativo de novos casos, dados mundiais de mortalidade se mantém estáveis ao longo dos anos, provavelmente pelo diagnóstico precoce e detecção de pequenos tumores em estágios iniciais (Pellegriti, Frasca et al. 2013; Scheffel, Zanella et al. 2015).

Os carcinomas de tireoide apresentam um curso clínico variado, podendo ser tumores indolentes, na maioria dos casos, com baixas taxas de mortalidade, ou tumores mais agressivos, com rápida progressão (Cabanillas, McFadden et al. 2016) Nesse sentido, cabe citar o conceito de medicina de precisão, que afirma que cada tumor possui uma assinatura anatômica e molecular única, que juntamente a fatores fenotípicos e genotípicos do paciente, devem ser levadas em consideração na adoção de abordagens terapêuticas. Por isso, o uso de metodologias combinadas (técnicas de imagem, características citológicas, testes moleculares, modelos estatísticos computacionais) possibilitam definir com maior precisão o diagnóstico do paciente e orientar a prática médica (Zafon, Diez et al. 2017)

O carcinoma de tireoide é classificado de acordo com a sua histologia e acometimento celular em: carcinoma diferenciado de tireoide (CDT), incluindo o carcinoma papilar (CPT) e o folicular (CFT), carcinoma medular de tireoide (CMT) e carcinoma indiferenciado ou anaplásico.

1.2 O Carcinoma Diferenciado de Tireoide

O CDT apresenta uma maior frequência, ocorrendo em cerca de 95% dos casos das neoplasias malignas da glândula tireoide (Howlader N, Noone AM et al. 2016). São definidos por manterem características das células foliculares de tireoide, com positividade para marcadores específicos tireoidianos, síntese e secreção de tireoglobulina e captação de iodo, sendo esses últimos de grande aplicabilidade clínica.

1.2.1 O Carcinoma Papilar de Tireoide

O CPT é o subtipo do CDT com maior ocorrência, acometendo aproximadamente 88% dos pacientes diagnosticados com tumores malignos de tireoide (Mao and Xing 2016). Sua etiologia tem relação com fatores ambientais, como a radiação externa, hormonais e genéticos. Estão descritas diversas variantes histopatológicas do CPT, sendo que cada variante apresenta padrões específicos de crescimento, tipos celulares e alterações no estroma. Suas principais variantes histopatológicas são: variante clássica, folicular e de células altas, que ocorrem com maior frequência, no entanto outras variantes menos comuns incluem variantes de células colunares, Hobnail, cribiforme, entre outras (Lloyd, Buehler et al. 2011, Shi, Liu et al. 2016). Em termos gerais caracterizam-se por serem pouco agressivos, com um bom prognóstico após o tratamento em 85% dos pacientes. Cerca de 10-15% dos pacientes com CPT apresentam um comportamento mais agressivo, com recidivas locais e/ou à distância, requerendo intervenção cirúrgica diferenciada e o uso de terapias adjuvantes (Shah 2015).

1.2.2 Estratificação de risco e conduta clínica

A estratificação de risco e conduta clínica para os CPTs segue os escores recomendados para os CDTs. A escala mais utilizada é o *TNM* (do inglês *Tumor, Node, Metastasis*), estratificação preconizada pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) para neoplasias malignas. Conforme ilustrado na **Tabela 1**, essa estratificação baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em consideração as características do tumor primário, acometimento da cadeia linfonodal e presença/ausência de metástase à distância, com predição para mortalidade (Tuttle 2017).

Tabela 1 - Características para classificação dos pacientes com CDT de acordo com o **TNM**.

Categoria	Descrição
TX	O tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Sem evidência de tumor primário.
T1	Tumor ≤ 2 cm na maior dimensão limitado a tireoide.
1a	Tumor com tamanho ≤ 1 cm, limitado a tireoide.
1b	Tumor com tamanho < 1 cm e ≤ 2 cm, limitado a tireoide.
T2	Tumor com tamanho < 2 cm e ≤ 4 cm, limitado a tireoide.
T3	Tumor > 4 cm limitado à tireoide ou com extensão extratireodiana grosseira, invadindo apenas os músculos da cinta.
3a	Tumor com tamanho > 4 cm, limitado a tireoide.
3b	Tumor de qualquer tamanho com extensão extratireoidiana grosseira que invade os músculos (músculos esterno-hióideo, esternotireóideo ou omo-hióideo).

Categoria		Descrição
T4	4	Inclui extensão extratireoidiana bruta.
	4a	O tumor se estende para além da cápsula tireoidiana e invade qualquer um dos seguintes: tecidos moles subcutâneos, laringe, traqueia, esôfago, nervo laríngeo recorrente.
	4b	O tumor invade a fáscia pré-vertebral ou envolve a artéria carótida ou os vasos mediastinais de um tumor de qualquer tamanho.
NX		Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0		Sem metástase para linfonodos regionais.
	0a	Um ou mais linfonodos histologicamente ou citologicamente benignos confirmados.
	0b	Nenhuma evidência radiológica ou clínica de metástase linfonodal.
N1		Metástase para linfonodos regionais.
	1a	Metástases para linfonodos em níveis VI, VII
	1b	Metástases para linfonodos em níveis I, II, III, V e retrofaríngeos.
M	0	Sem metástase à distância.
	1	Metástase à distância.

Fonte: *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, (Tuttle 2017).

O uso do *TNM* não tem boa acurácia para avaliar o risco de recorrência tumoral do CDT, complicação mais frequente desses tumores. Assim, a *American Thyroid Association* propõe uma classificação inicial do risco de recorrência para os pacientes com CDT, que são categorizados de acordo com as características histopatológicas do tumor, presença e extensão

de metástase, genótipo, presença ou ausência de invasão vascular, envolvimento dos linfonodos e multifocalidade, sendo elencados conforme a **Tabela 2** (Haugen, Alexander et al. 2016).

Tabela 2 - Características para estratificação de risco dos pacientes com CDT de acordo com a *American Thyroid Association*.

Risco ATA	Descrição
Baixo	<ul style="list-style-type: none"> • Características histopatológicas pouco agressivas; • Tumor do tipo variante folicular encapsulado ou folicular bem diferenciado com invasão capsular/vascular mínima (<4 focos); • Ausência de metástese para linfonodos ou à distância; • Total ressecção macroscópica do tumor; • Ausência de invasão aos tecidos adjacentes; • Ausência de invasão vascular; • Ausência de focos metastáticos quando administrado I¹³¹; • TNM N0 ou ≤5 ou presença de micrometástases, (N1) (<0,2 cm na maior dimensão); • Microcarcinoma papilar, intratireodiano, uni/multifocal, incluindo pacientes com mutação <i>BRAF</i>^{V600E}.
Intermediário	<ul style="list-style-type: none"> • Histologia agressiva (variante de células altas, Hobnail, variante de células colunares); • Invasão microscópica para tecidos moles adjacentes; • Focos metastáticos ávidos à radioiodo na região cervical após tratamento inicial com I¹³¹; • Subtipo papilar com invasão vascular; • TNM N1 ou >5, com comprometimento de todos os linfonodos <3 cm na dimensão maior; • Microcarcinoma papilar multifocal com invasão extratireoide e mutação em <i>BRAF</i>^{V600E}.
Alto	<ul style="list-style-type: none"> • Invasão macroscópica de tecidos adjacentes; • Ressecção tumoral incompleta;

Risco ATA	Descrição
	<ul style="list-style-type: none"> • Metástase à distância; • Tireoglobulina pós-cirúrgica sugestiva de metástase à distância; • Metástases em linfonodos ≥ 3 cm na maior dimensão; • Carcinoma Folicular com invasão vascular extensa (>4 focos de invasão vascular).

Fonte: *American Thyroid Association* (Haugen, Alexander et al. 2016).

De acordo com o TNM e o risco inicial de recidiva, avalia-se a melhor conduta para cada paciente. Em geral, recomenda-se a realização de lobectomia para tumores unilaterais, menores do que quatro centímetros, que não apresentam metástase linfonodal ou extensão extratireoidiana, dispensando, em alguns casos, a terapia de reposição hormonal. Para pacientes com risco intermediário e alto de recidiva, a recomendação é a realização de tireoidectomia total, com ou sem ressecção de linfonodos cervicais de acordo com o tamanho tumoral e diagnóstico de doença linfonodal na avaliação pré e transoperatória. A conduta clínica após tireoidectomia total em casos selecionados de risco intermediário e nos casos de alto risco de recidiva inclui o uso de radioiodo (RAI) com o intuito de eliminar resíduos de tecido tireoidiano e supressão do hormônio estimulante da tireoide (TSH), devido a sua influência na proliferação celular (Cabanillas, McFadden et al. 2016; Haugen, Alexander et al. 2016). Outros tratamentos adjuvantes como radioterapia externa e/ou tratamentos sistêmicos com inibidores de tirosina quinase (*TKIs*) são restritos a pacientes selecionados com doença extensa e progressiva, localmente ou à distância (Haugen, Alexander et al. 2016).

A resposta ao tratamento é norteada por exames clínicos, de imagens e pela dosagem sérica de tireoglobulina (Tg). Os pacientes submetidos à tireoidectomia total e tratamento com radioiodo são categorizados conforme a **Tabela 3**, sendo que o tipo de resposta terá influência nas implicações clínicas e na conduta médica (Haugen, Alexander et al. 2016).

Tabela 3 - Categorização do status do tratamento e manejo dos pacientes tireoidectomizados e submetidos ao tratamento com radioiodo.

Tipo de resposta	Definição	Implicações clínicas
Excelente	Exames de imagem negativos e Tg $<0,2$ ng/mL ou Tg estimulada	1%-4% de recorrência $<1\%$ de morte específica

Tipo de resposta	Definição	Implicações clínicas
	por TSH <1 ng/mL	
Indeterminada	Exames de imagem inespecíficos, absorção leve na tireoide após rastreamento corporal, Tg não estimulada detectável (<1 ng/mL), Tg estimulada detectável (<10 ng/mL)	15-20% serão identificados com resposta estrutural durante o acompanhamento, com uma taxa de morte específica <1%.
Bioquímica incompleta	Exames de imagem negativos e Tg ≥ 1ng/mL ou Tg estimulada ≥ 10 ng/mL	Pelo menos 30% permanecem sem evidência de doença; 20% respondem após terapias adicionais; 20% evoluem para doença estrutural e <1% vão a óbito pela doença.
Estrutural incompleta	Evidência estrutural ou funcional da doença com qualquer nível de Tg.	50-85% apresentam doença persistente, mesmo com terapia adicional e as taxas de mortalidade específica são cerca de 10% na presença de metástase para linfonodos e 50% quando na presença de metástase à distância.

Tg= Tireoglobulina

Fonte: *American Thyroid Association* (Haugen, Alexander et al. 2016).

1.2.3 A genética do Carcinoma Papilar de Tireoide

As alterações genéticas na via MAPK (do inglês *mitogen-associated protein kinase*) são observadas em aproximadamente 70% dos casos de CPT. A ativação constitutiva dessa via está envolvida no aumento na proliferação tumoral, inibição da diferenciação e apoptose. As mutações mais comuns, principalmente nas variantes clássica e de células altas, estão associadas ao gene *BRAF*, presente em cerca de 45% dos casos (Romitti, Ceolin et al. 2013). Já foram descritas mais de 40 variações, sendo a do tipo T1799A a mais comum, em que ocorre a troca de uma timina por uma adenina na posição 1799 no éxon 15, no cromossomo 7, resultando na substituição de uma valina por um ácido glutâmico na posição 600 (*BRAF* V600E). Tal mutação induz e facilita um estado de instabilidade genômica, promovendo invasividade e dediferenciação tumoral (Tang and Lee 2010). Outras mutações incluem a família do gene *RAS* (*H-RAS*, *K-RAS* e *N-RAS*), encontradas em 10-43% dos CPT, rearranjos em *RET/PTC*, frequente em cerca de 13-43% dos casos e *NTRK1*, descritos em menos de 10% dos pacientes (Romitti, Ceolin et al. 2013).

Embora as alterações genéticas sejam prevalentes no CPT, alguns estudos questionam o seu valor para prever agressividade tumoral (Scheffel, Dora et al. 2022) dessa forma, o estudo de novos biomarcadores que demonstrem uma melhor correlação com o prognóstico da doença poderia auxiliar no manejo do paciente.

1.3 A biogênese dos microRNAs

Os microRNAs (miRNAs) pertencem a uma família de pequenos RNAs com um comprimento de cerca de 22 nucleotídeos (Ha and Kim 2014). Historicamente, o primeiro miRNA descrito na literatura foi o lin-4 expresso em *Caenorhabditis elegans*. Em 1993, pesquisadores verificaram que essa molécula representava uma classe de genes reguladores do desenvolvimento que codificava pequenos RNAs, levando a hipótese de que poderiam atuar na expressão de proteínas da família LIN-14 (Lee, Feinbaum et al. 1993). Apesar de representar um marco nos estudos científicos envolvendo a pesquisa dessas moléculas, foi a descoberta do let-7 que impulsionou o estudo de outros miRNAs em diferentes organismos, principalmente em humanos, uma vez que eles participam de diversos processos biológicos como desenvolvimento, proliferação, diferenciação e sinalização celular, atuando em diversos

processos patológicos. Atualmente sabe-se que o mecanismo de repressão gênica mediada pelos miRNAs ocorre através da ligação de sequências complementares à região 3' não traduzida (3' UTR) dos RNAs mensageiros (mRNAs), degradando-os e impedindo sua tradução (Wang, Yao et al. 2013).

A biogênese dos miRNAs pode ocorrer pelas vias canônicas e não canônicas. Conforme a **Figura 1**, na via canônica, que é a via de processamento dominante, as moléculas de miRNAs são transcritas no núcleo pela enzima RNA polimerase II, formando miRNAs primários (pri-miRNA), que possuem um tamanho de aproximadamente 1 kb. O processo de maturação é realizado pelo complexo microprocessador, formado pela enzima Drosha e seu cofator DGCR8. Nessa fase, o pri-miRNA é clivado em moléculas com formato de grampo, de aproximadamente 65 nucleotídeos, tornando-se, então, um pré-miRNA. O transporte para o citoplasma ocorre por intermédio da proteína exportina 5 (XPO5), onde a porção 3' do pré-miRNA se liga a enzima Dicer, que o cliva na porção terminal, liberando um duplex de miRNA maduro constituído pelas fitas 5p e 3p. O duplex se complexa com proteínas da família Argonauta (AGO) e uma das fitas (5p ou 3p) se une ao complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC) que possui a capacidade de se ligar a um mRNA por complementaridade. O reconhecimento dos miRNAs alvos ocorre em regiões terminais com aproximadamente 2-7 nucleotídeos. A degradação do mRNA pode ocorrer devido a atividade endonuclease de AGO ou remoção da cauda poli (A) pelo complexo CCR4-not (Ha and Kim 2014, Hammond 2015, O'Brien, Hayder et al. 2018).

Com relação a formação da fita 5p ou 3p, muitos autores acreditavam que o complexo miRISC selecionava a fita de pareamento de acordo com as características termodinâmicas e estruturais, dessa forma a fita 5p era gerada em maior quantidade, enquanto a 3p em pequenas proporções (Khvorova, Reynolds et al. 2003). No entanto, novos estudos questionam esse modelo e trazem que em um mesmo tecido ambas as fitas podem estar igualmente expressas, enquanto em outros a expressão do miRNA é exclusiva. Ou seja, a regulação da expressão é dependente do tecido (Ro, Park et al. 2007).

Existe, ainda, outra via de biogênese dos miRNAs, denominada via não canônica, onde não há a clivagem pela enzima Dicer e a formação ocorre por splicing e junção de íntrons (Rorbach, Unold et al. 2018).

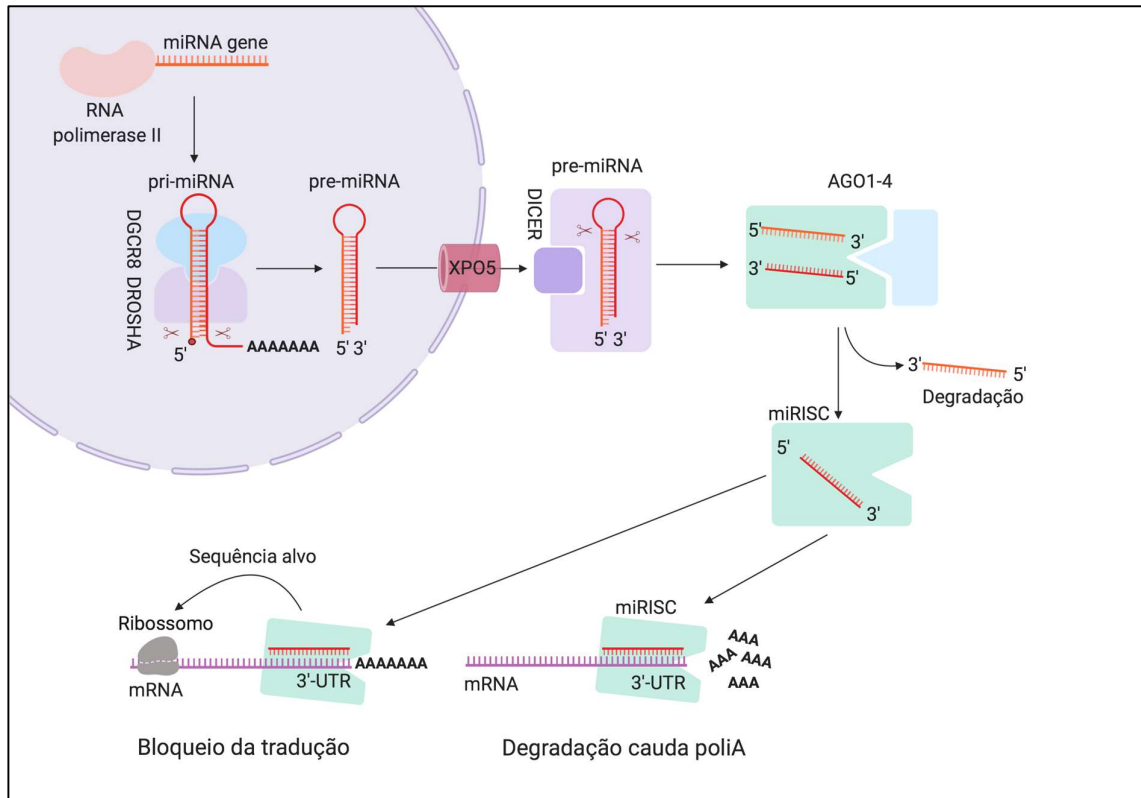


Figura 1 - Processo de maturação dos miRNAs. A sua transcrição inicia no núcleo por ação da enzima RNA polimerase II, gerando miRNAs primários (pri-miRNAs) que são clivados pela enzima DROSHA e seu cofator DGCR8, liberando pré-microRNAs (pre-miRNA). O transporte para o citoplasma é intermediado pela proteína exportina 5, onde o pre-miRNA será clivado pela enzima DICER, formando um duplex de miRNA constituído pelas fitas 5p e 3p. Uma das fitas se unirá com proteínas da família Argonauta (AGO) formando um complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC). O miRISC tem a capacidade de se ligar a mRNAs alvos por complementariedade à região 3' UTR, reprimindo sua tradução pela degradação do mRNA ou remoção da cauda poli A. Atualmente sabe-se que a seleção de quais fitas serão incorporadas pelo complexo miRISC depende de cada tecido. Elaborado pela autora.

1.3.1 MicroRNAs e Câncer

O primeiro relato da desregulação dos miRNAs em câncer foi feito em 2002, quando pesquisadores identificaram uma baixa expressão do miR-15 e miR-16 em amostras de sangue de pacientes com leucemia linfocítica crônica (Rorbach, Unold et al. 2018). Desde então os estudos correlacionando a expressão dos miRNAs com câncer vem aumentando, fazendo com que os miRNAs sejam caracterizados como um dos *hallmarks* do câncer em várias neoplasias como mama, cólon, pulmão, próstata e tireoide (Calin, Dumitru et al. 2002).

Atualmente sabe-se que cada tipo de tumor possui um padrão de expressão de miRNA distinto que os diferencia do tecido saudável, sendo que essa desregulação pode ocorrer devido a anormalidades cromossômicas (amplificação, deleção ou translocação em regiões codificantes de miRNA), alterações no controle transcricional, alterações epigenéticas e defeitos na maquinaria de biogênese dos miRNAs (Hayes, Peruzzi et al. 2014).

No câncer, os miRNAs desempenham um papel crítico, podendo exercer efeitos oncogênicos ou supressores tumorais, sob certas condições, atuando em características como proliferação, resistência à morte celular, invasão, metástase e angiogênese. Os miRNAs que normalmente têm como alvo um gene supressor de tumor são classificados como oncomiRs e geralmente são superexpressos em diferentes tipos de câncer. Por outro lado, miRNAs que regulam negativamente os oncogenes, são definidos como miRNAs supressores de tumor (Wang, Yao et al. 2013; Hammond 2015; Peng and Croce 2016). De acordo com o miRBase estão descritos cerca de 2654 miRNAs maduros em humanos, entretanto, não há um consenso na literatura quanto a classificação dos miRNAs em oncomiRs ou miRNAs supressores tumorais, uma vez que, um mesmo miRNA pode atuar tanto como oncomiR quanto miRNA supressor, dependendo do cenário da doença (Peng and Croce 2016).

1.3.2 MicroRNAs e o Carcinoma Papilar de Tireoide

O estabelecimento da expressão dos miRNAs em pacientes com carcinoma de tireoide foi primeiramente descrito por He e colaboradores em 2005, que verificaram um aumento significativo na expressão dos miRNAs -146, -221 e -222, com perda da transcrição do gene *KIT* em amostras de tecido provenientes de pacientes com CPT (He, Jazdzewski et al. 2005). Estudos indicam que, em tumores tireoidianos, 32% dos miRNAs estão superexpressos e 38% estão pouco expressos, sendo observado diferentes perfis de expressão de acordo com a classificação do tumor, independente da origem celular (Nikiforova, Chiosea et al. 2009). Recentemente, uma metanálise avaliou a expressão de miRNAs em amostras pareadas de tecido tireoidiano tumoral e saudável em diferentes tipos de carcinoma de tireoide e revelou 486 miRNAs desregulados (Hu, Wang et al. 2016). No CPT foram descritos 89 miRNAs

desregulados, destacando os miRs -146b-5p e -21-3p que encontravam-se superexpressos e os miRs -574-3p e -100-5p que estavam pouco expressos (Swierniak, Wojcicka et al. 2013).

Na literatura diversos estudos têm demonstrado o papel do miR-21-3p em diversos tipos de câncer, como por exemplo câncer de mama, pulmão e ovário (Jiang, Zhang et al. 2013, Fang, Zhu et al. 2018, Alharbi, Sharma et al. 2020). Aure e colaboradores verificaram que o miR-21-3p, assim como o miR-21-5p, desempenha um papel oncogênico importante no câncer de mama (Aure, Leivonen et al. 2013). E de forma interessante, no câncer de mama, o miR-21-3p estava associado com a regulação de genes relacionados as vias da MAPK, Notch e Wnt, que estão comumente desreguladas no CPT (Sastre-Perona and Santisteban 2012; Yamashita, Geraldo et al. 2013; Gao, Liu et al. 2019; Wu, Ding et al. 2020). Apesar disso, poucos estudos focaram no potencial papel do miR-21-3p na patogênese do carcinoma de tireoide, somente na sua fita complementar, o miR-21-5p que possui como alvo genes diferentes. Portanto, o papel do miR-21-3p no CPT carece de novos estudos.

Com relação ao miR-146b-5p, definido como um oncomiR *hallmark* do CPT, é crescente o número de estudos apontando seu potencial uso como biomarcador em pacientes com CPT (Chou, Liu et al. 2017; Jia, Shi et al. 2019). Níveis aumentados do miR-146b-5p foram associados com tamanhos tumorais maiores, presença de invasão extratireoidiana maciça, doença agressiva e, conseqüentemente, pior prognóstico (Wang, Yao et al. 2013; Chou, Liu et al. 2017). De forma bastante semelhante ao miR-21-3p, estudos de bioinformática revelaram que o miR-146b-5p regula genes das vias de sinalização da MAPK e Wnt, além de ter como alvo as vias PI3K-Akt e TGF- β (Geraldo, Yamashita et al. 2012; Yamashita, Geraldo et al. 2013; Deng, Wu et al. 2015; Ramirez-Moya, Wert-Lamas et al. 2018).

De forma interessante, Ramírez-Moya e colaboradores demonstraram recentemente que o miR-21-3p e miR-146b-5p tem como alvo DICER1, enzima que desempenha um papel central na biogênese dos microRNAs. DICER1 é regulada negativamente no câncer de tireoide através da regulação positiva de miRNAs direcionados, particularmente miR-146b-3p. A repressão de DICER1 leva à regulação negativa da rede de miRNA, possivelmente induzindo a progressão tumoral (Ramirez-Moya, Wert-Lamas et al. 2019).

2 JUSTIFICATIVA

Dados do INCA mostram o câncer de tireoide na quinta posição no ranking de neoplasias mais comuns em mulheres (INCA 2019). Tal dado corrobora com os achados do SEER que observaram um aumento progressivo no número de casos de neoplasias malignas da glândula tireoide em várias regiões do mundo (Howlader N, Noone AM et al. 2016). Apesar do diagnóstico favorável, alguns pacientes apresentam um curso clínico mais agressivo, com elevadas taxas de recidiva/persistência e morbidade (Mao and Xing 2016). A identificação de tais pacientes tem grande repercussão clínica, selecionando pacientes que devem receber acompanhamento e tratamento mais agressivo. Paralelamente às características clínicas e histopatológicas, a detecção de mutações ou outras alterações moleculares pode fornecer importantes informações do tumor e seu comportamento. Nesse contexto, a análise dos miRNAs como biomarcadores surge como uma nova ferramenta com grande potencial na avaliação prognóstica, visto que o mecanismo de repressão gênica mediada por eles pode levar a ativação de proto-oncogenes ou inativação de genes supressores tumorais (Wang, Yao et al. 2013; Hammond 2015; Peng and Croce 2016). Com base na carência de estudos sobre o papel do miR-21-3p no CPT e no fato de seu mecanismo oncogênico em outros tipos de câncer envolver vias de sinalização associadas ao CPT; bem como nos conhecimentos atuais sobre o papel do miR-146b-5p na progressão dessa doença, julgamos interessante avaliar a contribuição de ambos os miRNAs na patogênese do CPT. Os resultados provenientes desse estudo contribuirão na geração de conhecimento e futuramente poderão auxiliar na prática clínica, terapêutica e acompanhamento dos pacientes com essa neoplasia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o papel do hsa-miRNA-21-3p e hsa-miRNA-146b-5p na patogênese do carcinoma papilar de tireoide.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar possíveis genes alvos e vias de sinalização celular controladas pelo hsa-miRNA-21-3p e hsa-miRNA-146b-5p.
- Determinar os níveis de expressão de hsa-miRNA-21-3p e hsa-miRNA-146b-5p em amostras de pacientes com CPT e tecido tiroidiano normal adjacente.
- Verificar possíveis associações entre os níveis de expressão do hsa-miRNA-21-3p e hsa-miRNA-146b-5p e aspectos clínicos e oncológicos de pacientes com CPT.

REFERÊNCIAS

1. Alharbi, M., S. Sharma, D. Guanzon, A. Lai, F. Zuniga, M. J. A. Shiddiky, Y. Yamauchi, A. Salas-Burgos, Y. He, T. Pejovic, C. Winters, T. Morgan, L. Perrin, J. D. Hooper and C. Salomon (2020). "miRNA signature in small extracellular vesicles and their association with platinum resistance and cancer recurrence in ovarian cancer." Nanomedicine **28**: 102207.
2. Aure, M. R., S. K. Leivonen, T. Fleischer, Q. Zhu, J. Overgaard, J. Alsner, T. Tramm, R. Louhimo, G. I. Alnaes, M. Perala, F. Busato, N. Touleimat, J. Tost, A. L. Borresen-Dale, S. Hautaniemi, O. G. Troyanskaya, O. C. Lingjaerde, K. K. Sahlberg and V. N. Kristensen (2013). "Individual and combined effects of DNA methylation and copy number alterations on miRNA expression in breast tumors." Genome Biol **14**(11): R126.
3. Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre and A. Jemal (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.
4. Cabanillas, M. E., D. G. McFadden and C. Durante (2016). "Thyroid cancer." Lancet **388**(10061): 2783-2795.
5. Calin, G. A., C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich and C. M. Croce (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.
6. Chou, C. K., R. T. Liu and H. Y. Kang (2017). "MicroRNA-146b: A Novel Biomarker and Therapeutic Target for Human Papillary Thyroid Cancer." Int J Mol Sci **18**(3).
7. Deng, X., B. Wu, K. Xiao, J. Kang, J. Xie, X. Zhang and Y. Fan (2015). "MiR-146b-5p promotes metastasis and induces epithelial-mesenchymal transition in thyroid cancer by targeting ZNRF3." Cell Physiol Biochem **35**(1): 71-82.
8. Fang, R., Y. Zhu, L. Hu, V. S. Khadka, J. Ai, H. Zou, D. Ju, B. Jiang, Y. Deng and X. Hu (2018). "Plasma MicroRNA Pair Panels as Novel Biomarkers for Detection of Early Stage Breast Cancer." Front Physiol **9**: 1879.
9. Gao, Z., H. Liu, Y. Shi, L. Yin, Y. Zhu and R. Liu (2019). "Identification of Cancer Stem Cell Molecular Markers and Effects of hsa-miR-21-3p on Stemness in Esophageal Squamous Cell Carcinoma." Cancers (Basel) **11**(4).

10. Geraldo, M. V., A. S. Yamashita and E. T. Kimura (2012). "MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF-beta by repressing SMAD4 in thyroid cancer." *Oncogene* **31**(15): 1910-1922.
11. Ha, M. and V. N. Kim (2014). "Regulation of microRNA biogenesis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(8): 509-524.
12. Hammond, S. M. (2015). "An overview of microRNAs." *Adv Drug Deliv Rev* **87**: 3-14.
13. Haugen, B. R., E. K. Alexander, K. C. Bible, G. M. Doherty, S. J. Mandel, Y. E. Nikiforov, F. Pacini, G. W. Randolph, A. M. Sawka, M. Schlumberger, K. G. Schuff, S. I. Sherman, J. A. Sosa, D. L. Steward, R. M. Tuttle and L. Wartofsky (2016). "2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer." *Thyroid* **26**(1): 1-133.
14. Hayes, J., P. P. Peruzzi and S. Lawler (2014). "MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy." *Trends Mol Med* **20**(8): 460-469.
15. He, H., K. Jazdzewski, W. Li, S. Liyanarachchi, R. Nagy, S. Volinia, G. A. Calin, C. G. Liu, K. Franssila, S. Suster, R. T. Kloos, C. M. Croce and A. de la Chapelle (2005). "The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(52): 19075-19080.
16. Howlader N, Noone AM, M. D. Krapcho M, Bishop K, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ and C. KA. (2016). "SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute." Retrieved 12-Dez-2021, from https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2013/.
17. Hu, Y., H. Wang, E. Chen, Z. Xu, B. Chen and G. Lu (2016). "Candidate microRNAs as biomarkers of thyroid carcinoma: a systematic review, meta-analysis, and experimental validation." *Cancer Med* **5**(9): 2602-2614.
18. INCA (2019). "Estimativas 2020." Retrieved 17-Fev-2022, from <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>
19. Jia, M., Y. Shi, Z. Li, X. Lu and J. Wang (2019). "MicroRNA-146b-5p as an oncomiR promotes papillary thyroid carcinoma development by targeting CCDC6." *Cancer Lett* **443**: 145-156.
20. Jiang, M., P. Zhang, G. Hu, Z. Xiao, F. Xu, T. Zhong, F. Huang, H. Kuang and W. Zhang (2013). "Relative expressions of miR-205-5p, miR-205-3p, and miR-21 in tissues and serum of non-small cell lung cancer patients." *Mol Cell Biochem* **383**(1-2): 67-75.

21. Khvorova, A., A. Reynolds and S. D. Jayasena (2003). "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." Cell **115**(2): 209-216.
22. La Vecchia, C., M. Malvezzi, C. Bosetti, W. Garavello, P. Bertuccio, F. Levi and E. Negri (2015). "Thyroid cancer mortality and incidence: a global overview." Int J Cancer **136**(9): 2187-2195.
23. Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-854.
24. Lloyd, R. V., D. Buehler and E. Khanafshar (2011). "Papillary thyroid carcinoma variants." Head Neck Pathol **5**(1): 51-56.
25. Mao, Y. and M. Xing (2016). "Recent incidences and differential trends of thyroid cancer in the USA." Endocr Relat Cancer **23**(4): 313-322.
26. Nikiforova, M. N., S. I. Chiosea and Y. E. Nikiforov (2009). "MicroRNA expression profiles in thyroid tumors." Endocr Pathol **20**(2): 85-91.
27. O'Brien, J., H. Hayder, Y. Zayed and C. Peng (2018). "Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation." Front Endocrinol (Lausanne) **9**: 402.
28. Pellegriti, G., F. Frasca, C. Regalbuto, S. Squatrito and R. Vigneri (2013). "Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors." J Cancer Epidemiol **2013**: 965212.
29. Peng, Y. and C. M. Croce (2016). "The role of MicroRNAs in human cancer." Signal Transduct Target Ther **1**: 15004.
30. Ramirez-Moya, J., L. Wert-Lamas, G. Riesco-Eizaguirre and P. Santisteban (2019). "Impaired microRNA processing by DICER1 downregulation endows thyroid cancer with increased aggressiveness." Oncogene **38**(27): 5486-5499.
31. Ramirez-Moya, J., L. Wert-Lamas and P. Santisteban (2018). "MicroRNA-146b promotes PI3K/AKT pathway hyperactivation and thyroid cancer progression by targeting PTEN." Oncogene **37**(25): 3369-3383.
32. Ro, S., C. Park, D. Young, K. M. Sanders and W. Yan (2007). "Tissue-dependent paired expression of miRNAs." Nucleic Acids Res **35**(17): 5944-5953.
33. Romitti, M., L. Ceolin, D. R. Siqueira, C. V. Ferreira, S. M. Wajner and A. L. Maia (2013). "Signaling pathways in follicular cell-derived thyroid carcinomas (review)." Int J Oncol **42**(1): 19-28.
34. Rorbach, G., O. Unold and B. M. Konopka (2018). "Distinguishing mirtrons from canonical miRNAs with data exploration and machine learning methods." Sci Rep **8**(1): 7560.

35. Sastre-Perona, A. and P. Santisteban (2012). "Role of the wnt pathway in thyroid cancer." Front Endocrinol (Lausanne) **3**: 31.
36. Scheffel, R. S., J. M. Dora and A. L. Maia (2022). "BRAF mutations in thyroid cancer." Curr Opin Oncol **34**(1): 9-18.
37. Scheffel, R. S., A. B. Zanella, D. Antunes, J. M. Dora and A. L. Maia (2015). "Low Recurrence Rates in a Cohort of Differentiated Thyroid Carcinoma Patients: A Referral Center Experience." Thyroid **25**(8): 883-889.
38. Shah, J. P. (2015). "Thyroid carcinoma: epidemiology, histology, and diagnosis." Clin Adv Hematol Oncol **13**(4 Suppl 4): 3-6.
39. Shi, X., R. Liu, F. Basolo, R. Giannini, X. Shen, D. Teng, H. Guan, Z. Shan, W. Teng, T. J. Musholt, K. Al-Kuraya, L. Fugazzola, C. Colombo, E. Kebebew, B. Jarzab, A. Czarniecka, B. Bendlova, V. Sykorova, M. Sobrinho-Simoes, P. Soares, Y. K. Shong, T. Y. Kim, S. Cheng, S. L. Asa, D. Viola, R. Elisei, L. Yip, C. Mian, F. Vianello, Y. Wang, S. Zhao, G. Oler, J. M. Cerutti, E. Puxeddu, S. Qu, Q. Wei, H. Xu, C. J. O'Neill, M. S. Sywak, R. Clifton-Bligh, A. K. Lam, G. Riesco-Eizaguirre, P. Santisteban, H. Yu, G. Tallini, E. H. Holt, V. Vasko and M. Xing (2016). "Differential Clinicopathological Risk and Prognosis of Major Papillary Thyroid Cancer Variants." J Clin Endocrinol Metab **101**(1): 264-274.
40. Swierniak, M., A. Wojcicka, M. Czetwertynska, E. Stachlewska, M. Maciag, W. Wiechno, B. Gornicka, M. Bogdanska, L. Koperski, A. de la Chapelle and K. Jazdzewski (2013). "In-depth characterization of the microRNA transcriptome in normal thyroid and papillary thyroid carcinoma." J Clin Endocrinol Metab **98**(8): E1401-1409.
41. Tang, K. T. and C. H. Lee (2010). "BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications." J Chin Med Assoc **73**(3): 113-128.
42. Tuttle, R. M. (2017). Thyroid-Differentiated and Anaplastic Carcinoma (Chapter 73).
43. Wang, Z., H. Yao, S. Lin, X. Zhu, Z. Shen, G. Lu, W. S. Poon, D. Xie, M. C. Lin and H. F. Kung (2013). "Transcriptional and epigenetic regulation of human microRNAs." Cancer Lett **331**(1): 1-10.
44. WHO. (2018). "Cancer Tomorrow." Retrieved 17-Feb-2022, from <http://gco.iarc.fr/tomorrow/home>.
45. Wu, X., M. Ding and J. Lin (2020). "Three-microRNA expression signature predicts survival in triple-negative breast cancer." Oncol Lett **19**(1): 301-308.
46. Yamashita, A. S., M. V. Geraldo, C. S. Fuziwara, M. A. Kulcsar, C. U. Friguglietti, R. B. da Costa, G. S. Baia and E. T. Kimura (2013). "Notch pathway is activated by MAPK signaling and influences papillary thyroid cancer proliferation." Transl Oncol **6**(2): 197-205.

47. Zafon, C., J. J. Diez, J. C. Galofre and D. S. Cooper (2017). "Nodular Thyroid Disease and Thyroid Cancer in the Era of Precision Medicine." Eur Thyroid J **6**(2): 65-74.

CAPÍTULO 2 - ARTIGO ORIGINAL:

The Role of miR-21-3p and miR-146b-5p on Papillary Thyroid Cancer Pathogenesis