Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo
Copyright ® 2014 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo
Vol 51 • Nº 4

REVISIÓN

Desregulación de la expresión de microRNAs en el carcinoma papilar de tiroides

Deregulation of MicroRNAs Expression in Human Papillary Thyroid Carcinoma

Pallante P[1], *Battista S*[1], *Juvenal G*[2], *Fusco A*[1]

[1]*Istituto di Endocrinologia ed Oncologia Sperimentale del CNR c/o Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare, Facoltà di Medicina e Chirurgia di Napoli, Università degli Studi di Napoli "Federico II", via Pansini 5, 80131 Nápoles, Italia.* [2]*Comisión Nacional de Energía Atómica, Av. del Libertador 8250, 1429 CABA, Argentina*

RESUMEN

El descubrimiento de los microRNAs (miRNAs) ha demostrado que estos se comportan como una poderosa clase de reguladores de la expresión génica. Al actuar a nivel postranscripcional, los miRNAs son capaces de modular la expresión de al menos un tercio de los RNA mensajeros codificados por el genoma. Aquí resumimos las principales alteraciones en la expresión de los genes para miRNAs identificados en el carcinoma papilar de tiroides. Se discuten también los mecanismos por los cuales la desregulación de estos miRNAs podrían estar involucrados en la transformación de las células foliculares tiroideas. **Rev Argent Endocrinol Metab 51:205-212, 2014**

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Palabras clave: microRNA, tiroides, carcinoma

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) small (~22 nt) single-stranded RNA molecules that are not further translated into proteins. They can act as negative regulators of the protein-coding gene expression and may impact cell differentiation, proliferation and survival. They have been implicated in carcinogenesis. The purpose of this review is to summarize the main alterations of miRNA expression identified in thyroid papillary carcinomas, and discuss the mechanisms by which miRNA deregulation might be involved in thyroid cell transformation. **Rev Argent Endocrinol Metab 51:205-212, 2014**

No financial conflicts of interest exist.

Key words: microRNA, thyroid, carcinoma

INTRODUCCIÓN

Cuando el proyecto del genoma humano mapeó su primer cromosoma en 1999, se predijo que el genoma nuclear contendría más de 100.000 genes codificantes para proteínas. Sin embargo, solo alrededor de 20.000 fueron finalmente identificados (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Hoy en día, se sabe que solo el 2 % del genoma humano codifica para proteínas funcionales. El hecho que haya más proteínas que genes se debe al procesamiento diferencial del RNA para dar diferentes RNA mensajeros (mRNAs). Desde entonces, el advenimiento de herramien-

Recibido: 22-09-2014 Aceptado: 30-09-2014

Correspondencia: Alfredo Fusco - Istituto per l'Endocrinologia e l'Oncologia Sperimentale (IEOS) "G. Salvatore", Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), via Pansini 5, 80131 Napoli, Italia - alfusco@unina.it

tas bioinformáticas combinadas con estudios de microarreglos (microarrays) que examinan el transcriptoma (aquellas secuencias de ADN que se transcriben) ha revelado que muchas transcripciones son RNAs no codificantes de proteínas pero sí funcionales. Ellos incluyen: microRNAs (miRNAs), pseudogenes, RNAs largos no codificantes.

Los miRNAs son moléculas pequeñas de RNA no codificantes que contienen aproximadamente 22 nucleótidos, que se encuentran en las plantas, animales y algunos virus y funcionan en la regulación postranscripcional de la expresión génica[1] apareándose por complementaridad con los mRNAs que se traducirán en proteínas. Como consecuencia el mRNA es degradado o se impide la traducción y el resultado es una menor síntesis proteica. Un mismo miRNAs se puede aparear a diversos mRNAs.

El genoma humano codificaría para más de 1000 miRNAs, y podrían tener como blanco el 60 % de los genes. Los miRNAs de plantas pueden aparearse a los mRNAs blancos tanto en regiones codificantes así como en regiones no traducidas mientras que los miRNAs en animales son capaces de reconocer sus mRNA blancos a través de secuencias muy cortas, 6-8 nucleótidos, en el extremo 5´ de un miRNA. El silenciamiento del gen en animales puede ocurrir ya sea, a través de la degradación del mRNA si es que hay una complementación perfecta o la prevención de que el mRNA sea traducido cuando la complementación es parcial[2-5].

La regulación combinatoria es una característica de la regulación de los genes por parte de miRNAs. Un miRNA dado puede tener como blanco a mRNAs diferentes, y un mRNA dado puede igualmente ser el blanco de varios miRNAs. Al afectar la regulación génica, los miRNAs son propensos a estar involucrados en la mayoría de los procesos biológicos[6]. En los diferentes tipos de células y tejidos encontramos diferentes conjuntos de miRNAs expresados[7].

Está ampliamente aceptada que la desregulación de los miRNAs juega un papel crítico en la carcinogénesis. El primer cáncer humano que se supo que estaba asociado con la desregulación de un miRNA fue la leucemia linfocítica crónica y más tarde se ha encontrado que muchos miRNAs tienen vínculos con algunos tipos de cáncer y de ahí que se los denomina "oncomirs". Algunos miRNAs se pueden comportar como genes supresores de tumores[8].

El análisis del perfil de expresión de los miRNAs en neoplasias humanas ha revelado la presencia de perfiles de miRNAs para cada neoplasia indicando a los miRNAs como excelentes herramientas para el diagnóstico y pronóstico del cáncer[9].

CLASIFICACIÓN DE TUMORES DE TIROIDES Y FACTORES DE RIESGO

La glándula tiroides se compone principalmente de dos tipos de células: células foliculares responsables de la síntesis de la triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4) y parafoliculares productoras de calcitonina (células C). Las células foliculares son las que predominan y forman estructuras foliculares. Por el contrario, las células C representan solo el 1 % de todas las células de la tiroides y contribuyen a la regulación del metabolismo del calcio a través de la secreción de calcitonina. Sobre la base de una serie de factores histológicos y clínicos, los carcinomas que se originan en las células foliculares se subdividen en carcinomas bien diferenciados, poco diferenciados y no diferenciados o anaplásicos (ATCs)[10,11]. Los carcinomas tiroideos bien diferenciados consisten esencialmente en los subtipos papilar (PTC) y folicular (FTC).

Los carcinomas papilares de tiroides representan alrededor del 80 % de todos los carcinomas de tiroides, y son 2,6-6 veces mayor en mujeres que en hombres. Una de las principales características de los PTC es una arquitectura papilar convencional con células caracterizadas por rasgos morfológicos nucleares característicos (núcleos en vidrio esmerilado)[10]. Un factor de riesgo importante para el desarrollo de PTC es la exposición a la radiación ionizante como lo demuestra la alta incidencia de PTC entre los sobrevivientes de los bombardeos atómicos de Hiroshima y Nagasaki[12] y entre los niños que viven en Belarús y Ucrania luego del accidente de Chernóbil[13].

LESIONES GENÉTICAS EN LOS CARCINOMAS DE TIROIDES

Alrededor del 70 % de los PTC contienen mutaciones que afectan genes de la vía activada por la MAP quinasa (**M**itogen-**A**ctivated **P**rotein **K**inase, MAPK), a saber: *RET, TRK, RAS y BRAF*[14,15]. Alrededor del 30 % de los PTCs se caracterizan por la presencia del oncogén *RET*/*PTC*, que es un gen quimérico generado por el protooncogen *RET*

(codifica para un receptor de membrana para factores de crecimiento neurotrófico), el cual fusiona su dominio tirosina quinasa con la región 5‘ de diferentes genes[16]. Se han encontrado también reordenamientos que generan genes de fusión que implican *TRK* en 10 % de los PTCs[17].

Alrededor del 40 % de los PTC se caracterizan por la misma mutación *BRAF* específica. Esta mutación se genera por una transversión T> A en la posición 1799 que produce una sustitución valina>glutámico en el residuo 600 (V600E). Este cambio produce una activación constitutiva de la quinasa RAF, como se informó en melanoma[18]. Se ha encontrado también una inversión paracéntrica del brazo largo del cromosoma 7 el cual provoca un rearreglo entre el dominio quinasa en el gen *BRAF* y el gen *AKAP9* generando de este modo un gen de fusión que tiene propiedad oncogénica[19,20]. Esta reorganización ha sido informada en PTCs después del accidente nuclear de Chernobyl[19].

Las mutaciones del protooncogen *RAS* han sido estrechamente asociadas con la variante folicular de PTC y con FTC (aproximadamente 30 % y 45 % respectivamente)[21,22]. También son las principales lesiones moleculares descriptas en carcinomas pobremente diferenciados[23]. Los reordenamientos *PIK3CA* son más frecuentes en ATC que en PTC o FTC, y generalmente están asociados con las estadios tardíos de la carcinogénesis[24]. A la inversa, las mutaciones en genes efectores de MAPK se asocian con frecuencia con las estadios tempranos de carcinogénesis tiroidea. Curiosamente se han descripto mutaciones en *BRAF* conjuntamente con *AKT1*, pero no con *PIK3CA* en el carcinoma de tiroides pobremente diferenciado[25]. Las mutaciones que alteran la función de p53 son una característica del ATC[26,27].

MiRNAs

Desregulación de la expresión de miRNAs en PTC

A saber, un conjunto de miRNAs está sobreexpresado de manera significativa en PTCs[28-30]. Este conjunto se compone de miR-34b, miR-181, miR-181b, miR-181c, miR-213, miR-221, miR-222, miR-224, miR-31, miR-146, miR-155, miR 220 y miR-223. Entre ellos, miR-146, miR-221, miR-222 y miR-181b se han confirmado en casi todos los estudios y han mostrado la mayor sobreexpresión. A la inversa, no se han encontrado miRNAs que sean regulados por disminución en PTCs con un cambio de dos veces en comparación con los de tejido normal, aunque la disminución en la expresión de algunos miRNAs (let-7f, miR-142, miR-140, miR-199 y miR-151) fue significativa[29].

Un análisis de microarreglos comparando PTCs agresivos vs. no agresivos mostró una sobreexpresión de miR-146b, miR-221, miR-222, miR-155 y miR-31 y una disminución de miR-1, miR-34b, miR-130b y miR-138.

MiR-146

Dos loci codifican para miR-146a y miR-146b (cromosoma *5q33* y *10q24*, respectivamente). Se diferencian por solo dos nucleótidos[31]. La expresión de estos dos miRNAs depende del tipo celular y de factores exógenos[32]. Los encontramos sobreexpresados en las muestras de PTC, y en PTC-FV y en carcinomas no papilares, no obstante en un grado mucho menor[33]. En varias muestras, la sobreexpresión de miR-146b fue mayor que la expresión de miR-146a[28,34], y se asoció con un aumento de la agresividad de los tumores tiroideos.

Un polimorfismo G/C (rs2910164) en el gen *miR-146a* podría predisponer a PTC[34]. Este polimorfismo afecta el procesamiento de formas precursoras del miR-146a en la forma madura y conduce a una reducción de la forma madura de miR-146a en presencia del alelo C[34]. Este proceso altera la regulación de los mRNAs blanco, lo que predispone a PTC[34]. De hecho, en el estado heterocigota, miR-146a puede madurar en tres miRNAs correspondientes a miR-146, y por lo tanto, aumentar el número de mRNAs blanco[31]. NF-kB es uno de los blancos más importantes de miR-146[35] y, dado el vínculo entre la activación de NF-kB y las malignidades tiroideas[36], su regulación por miR-146 puede ser crítico en el proceso de carcinogénesis tiroidea.

El racimo miR-221/222

MiR-221 y miR-222 están arracimados en el cromosoma X, y es por eso que el patrón de expresión es muy similar ya que serían transcriptos como policistrones. Están sobreexpresados en una gran variedad de neoplasias malignas, tales como en, colon, pulmón, ovario, mama, células escamosas de la cavidad oral, hepatocelular, próstata. Sin embargo, la expresión del racimo de miR-221/222 está disminuida en los tumores de estroma gastrointestinal[37].

El mal pronóstico asociado con la sobreexpresión de miR-221/222 puede estar relacionado con su ca-

pacidad para inducir la quimio y radioresistencia en las células cancerosas y por tener como blanco a genes implicados en la transición epitelial-mesenquimal. De hecho, el racimo miR-221/222 está involucrado en la transición epitelio-mesenquimal en el cáncer de pulmón no microcítico *in vitro* e *in vivo*. Más aún, el miR-221 aumenta la sensibilidad de las células de glioma a la apoptosis inducida por la temozolomida, y transfección de células de cáncer de pulmón microcítico con anti-miR-221/222 transforman las células resistentes en sensibles a la apoptosis por TRAIL (**T**umor necrosis factor-**R**elated **A**poptosis **I**nducing **L**igand)[38].

El análisis bioinformático reveló también como blanco potencial de los miR-221/222 varios genes que codifican para proteínas que juegan un rol en el crecimiento y división celular (la regulación del ciclo celular, receptores de crecimiento y los protooncogenes, las proteínas apoptóticas, factores de transcripción, genes supresores de tumores). Entre los reguladores del ciclo celular, el gen *CDKN1B* ha sido identificado como un blanco de miR-221/222. *CDKN1B* codifica para el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1B ($p27^{Kip1}$), un inhibidor de la enzima que se une y previene la activación de la ciclina E-CDK2 y de los complejos de ciclina D-CDK4, y por lo tanto controla la progresión del ciclo celular en la fase G1.

Avalando estos resultados, la expresión forzada de miR-221 y miR-222 reduce los niveles de proteína $p27^{Kip1}$ en la línea de cáncer papilar TPC induciendo que las células pasen a la fase S del ciclo celular superando el bloqueo en G1 como consecuencia de incubar las células en condiciones libres de suero[39]. La proteína Pumilio-1 (PUM1) juega un papel crítico en la interacción entre miR-221/222 y la región 3'-UTR (**U**n **T**ranslated **R**egion 3´) del mRNA de p27. PUM1 es una proteína de unión al RNA la cual es sobre expresada y fosforilada para la inducción óptima de su actividad de unión en la 3´-UTR del mRNA de p27. Dicha unión induce un cambio local en la estructura del RNA que favorece la asociación con miR-221 y miR-222, causando la supresión de la expresión de p27 y la rápida entrada al ciclo celular.

El racimo miR-221/222 puede regular negativamente los niveles de proteína p27 teniendo como blanco a FOXO3 el cual bloquea la activación transcripcional de p27. Es probable que la regulación negativa de $p27^{Kip}$ por miR-221 y miR-222 también podría desempeñar un papel *in vivo* ya que se ha demostrado una correlación inversa entre las expresiones de miR-221 y miR-222 y la de los niveles de proteína $p27^{Kip}$ en muestras de PTC[39]. El papel de miR-221 y miR-222 como blanco de la proteína $p27^{Kip}$ ha sido validado también en otros tejidos además de la tiroides[40,41]. Otros estudios han demostrado que el miR-221 puede regular al inhibidor de quinasa dependiente de ciclina CDKN1C/p57 el cual es fundamental en el control del ciclo celular[41].

Un gen supresor de tumor importante que es blanco de miR-221/222 es la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) que además de catalizar la reacción de hidrólisis del grupo fosfato del carbono 3 del fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato, desfosforila las proteínas fosforiladas en los residuos tirosina, serina y treonina. PTEN regula negativamente la vía de señalización de Akt/PKB y se la encuentra disminuida con frecuencia en los carcinomas de tiroides humanos. Otro blanco de importancia del racimo miR-221/222 es c-KIT[42], también llamado CD117, una proteína que funciona como un receptor con actividad tirosina quinasa y que se expresa en las células madre hematopoyéticas, así como en otro tipo de células. El ligando para KIT se conoce como SCF(stem cell factor). En la mayoría de los PTCs se ha observado la pérdida de la proteína c-KIT[43] sin embargo, su papel en la carcinogénesis de la tiroides es aún desconocida. Cabe destacar, tal lo comentado, que la expresión del racimo miR-221/222 está disminuida drásticamente en los tumores del estroma gastrointestinal, cuyo desarrollo se asocia frecuentemente con la mutación del gen *c-Kit*.

MiR-181

Los componentes de la familia miR-181 (miR-181, miR-181-b y miR-181c) están sobreexpresados en varias neoplasias malignas distintas de la tiroideas[44,45]. En la mayoría de estos tumores malignos, la sobreexpresión de miR-181 se correlaciona con un mal pronóstico.

MiR-181b entre otros tiene como blanco a CBX7[46] el cual es un miembro de las proteínas del complejo represivo Polycomb 1 (PRC1)[47] y está drásticamente disminuido en los estadios tardíos de varias neoplasias malignas[48,49], promoviendo la progresión del ciclo celular que está, por el contrario, regulada negativamente por CBX7. Dado que CBX7 es capaz de regular negativamente la expresión de miR-181b, y puesto que las proteínas HMGA, están frecuentemente aumentadas en el cáncer y regulan negativamente a CBX7 y positi-

vamente a miR-181, se ha propuesto una nueva vía que involucra HMGA1, miR-181b y CBX7, en la progresión del cáncer. Esta vía es apoyada por el hallazgo de una correlación directa entre HMGA1 y la expresión de miR-181b que se traduce en la reducción drástica de la expresión génica de *CBX7* en carcinomas de mama humanos[46].

Mir-1

Mir-1 es uno de los miRNAs más que encontramos más frecuentemente disminuidos en PTC y varias neoplasias malignas[50-54]. También se encuentra disminuido en el bocio, FTA, FTC PTC y ATC independientemente del grado del fenotipo maligno.

Entre los blancos de miR-1 encontramos a los genes *CXCR4* y *SDF1 alfa*, que codifican para el receptor para quimioquina CXCR4 y su ligando CXCL12, respectivamente[50]. Consistente con un papel de la CXCR4 y las proteínas SDF alfa en la invasión celular y la metástasis, los estudios funcionales demostraron que miR-1 es capaz de inhibir la migración celular de carcinoma de tiroides. Estos resultados indican que la disminución de miR-1 está implicada en la carcinogénesis puesto que CXCR4, el cual se sobreexpresa frecuentemente en PTCs, desempeña un papel importante en el mecanismo de la metástasis de tumores primarios de tiroides a ganglio linfático[55]. MiR-1 tiene también como blanco al receptor tirosina quinasa para el factor de crecimiento de hepatocitos, que está codificada por el oncogen MET. Este oncogen promueve un complejo programa biológico llamado "crecimiento invasivo" que resulta como consecuencia de la estimulación de la motilidad celular, la invasión y protección de la apoptosis, y está sobreexpresado en la mayoría de los PTC[51,53].

Otro de los blancos de miR-1 es el gen *CCND2*[50] que codifica para la proteína ciclina D2 la cual favorece la transición G1/S. Esto probablemente explica que la sobreexpresión de miR-1 es capaz de inhibir la proliferación normal y de células cancerosas mediante la detención de las células en la fase G1 del ciclo celular. Por lo tanto, se postula que una baja en miR-1 podría estar involucrada en el desarrollo del bocio y de adenomas foliculares. La disminución de miR-1 también está involucrado en el control de la proliferación de células de la tiroides. De hecho, es uno de los cinco miRNAs (miR-1, miR-28-A, miR-290-5p, miR-296-3p y miR-297a) que se encuentran disminuidos en las células tiroideas normales por la acción de la TSH a través de la inducción de la actividad de la adenilato ciclasa. Uno de los blancos del miR-1 es el CREB1, un factor de transcripción activado por la TSH, que, mediante la unión a las regiones reguladoras de miR-1, regula negativamente su expresión, lo que indica que se requiere un sinergismo que implica TSH, CREB1 y miR-1 para que ocurra la proliferación de células tiroideas[56].

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En base a la evidencia disponible, la desregulación de los miRNAs parece ser un acontecimiento crucial en la carcinogénesis tiroidea. Estudios que impliquen la generación de ratones transgénicos que sobreexpresen estos miRNAs en la tiroides así como ratones *knock out* ratones con deficiencia tiroidea de los miRNAs que encontramos disminuidos en la carcinogénesis tiroideas nos aportarán nuevos conocimientos. Por otra parte, la cruza de estos modelos con ratones transgénicos que expresan los oncogenes activados con mayor frecuencia (RET/PTC3, TRK-T1, N-RAS) en PTCs, serían concluyentes para definir el rol de los miRNAs en la carcinogénesis tiroidea.

Es interesante hacer notar, que el estudio de siete miRNAs sobreexpresados (miR-187, -221, -222, -146b, -155, -224, -197) es capaz de discriminar con alta precisión tumores tiroideos frente a nódulos hiperplásicos, ya sea en el tejido quirúrgico o en aspiración con aguja fina[57]. En consecuencia, este grupo distintivo de miRNAs puede proporcionar una herramienta de diagnóstico adicional especialmente si se asocia con el análisis de los genes, alteraciones más frecuentes identificadas en los carcinomas de tiroides. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para fundamentar de manera inequívoca la evaluación de la expresión de miRNA en el diagnóstico de los tumores de tiroides.

La posibilidad de usar una terapia de miRNA para pacientes con PTC que tienen recurrencias, así como el bloqueo en la síntesis de determinados miRNA resulta prometedor. Sin embargo, su eficacia en la terapéutica dependerá por un lado, de la especificidad de la inhibición del gen blanco y por el otro la canalización del miRNA o anti-MIR hacia el tejido específico, tema este que todavía presenta grandes obstáculos y que deben ser superados para hacer una terapia de miRNA aplicable en la práctica clínica.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Juvenal G.J.** Epigenética: vieja palabra, nuevos conceptos. Rev Argent Endocrinol Metab 51:66-74, 2014
2. **Ambros V.** The functions of animal microRNAs. Nature 431:350-5, 2004
3. **Bartel DP.** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116:281-97, 2004
4. **Bartel DP.** MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 136, 215-233, 2009
5. **Rajewsky N.** microRNA target predictions in animals. Nat Genet Suppl:S8-13, 2006
6. **Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N.** Combinatorial microRNA target predictions. Nat Genet 37:495-500, 2005
7. **Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T**. New microRNAs from mouse and human. RNA 9:175-9, 2003
8. **Calin, G.A, Croce CM.** MicroRNA signatures in human cancers. Nat. Rev. Cancer 6:857-866 2006.
9. **Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM.** A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc. Natl Acad. Sci. USA 103:2257-2261, 2006
10. **DeLellis R A, Lloyd R V, Heitz PU, Eng C.** in World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs 51-56 (IARC press, Lyon, 2004
11. **Kondo T, Ezzat S, Asa SL.** Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. Nature Rev. Cancer 6:292-306, 2006
12. **Hayashi Y, Lagarde F, Tsuda N, Funamoto S, Preston DL, Koyama K, Mabuchi K, Ron E, Kodama K, Tokuoka S.** Papillary microcarcinoma of the thyroid among atomic bomb survivors: tumor characteristics and radiation risk. Cancer 116:1646-55, 2010
13. **Williams D.** Cancer after nuclear fallout: lessons from the Chernobyl accident. Nat. Rev. Cancer 2:543-549, 2002
14. **Frattini M, Ferrario C, Bressan P, Balestra D, De Cecco L, Mondellini P, Bongarzone I, Collini P, Gariboldi M, Pilotti S, Pierotti MA, Greco A.** Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. Oncogene 23:7436-40, 2004
15. **Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA.** High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. Cancer Res 63:1454-7, 2003
16. **Santoro M, Carlomagno F, Melillo RM, Fusco A.** Dysfunction of the RET receptor in human cancer. Cell. Mol. Life Sci 61:2954-2964, 2004
17. **Pierotti MA, Bongarzone I, Borrello MG, Mariani C, Miranda C, Sozzi G, Greco A.** Rearrangements of TRK proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas. J Endocrinol Invest 18:130-3, 1995
18. **Dhillon AS, Kolch W.** Oncogenic B-Raf mutations: crystal clear at last. Cancer Cell 5:303-4, 2004
19. **Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, Gandhi M, Zhu Z, Nikiforova MN, Rabes HM, Fagin JA, Nikiforov YE.** Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. J Clin Invest 115:94-101, 2005
20. **Fusco A, Viglietto G, Santoro M.** A new mechanism of BRAF activation in human thyroid papillary carcinomas. J. Clin. Invest 115:20-23, 2005
21. **Motoi N, Sakamoto A, Yamochi T, Horiuchi H, Motoi T, Machinami R.** Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin. Pathol Res Pract 196:1-7, 2000
22. **Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW 2nd, Tallini G, Kroll TG, Nikiforov YE.** RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 88:2318-26, 2003
23. **Volante M, Rapa I, Gandhi M, Bussolati G, Giachino D, Papotti M, Nikiforov YE.** RAS mutations are the predominant molecular alteration in poorly differentiated thyroid carcinomas and bear prognostic impact. J Clin Endocrinol Metab. 94:4735-41, 2009
24. **Paes JE, Ringel MD.** Dysregulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in thyroid neoplasia. Endocrinol. Metab. Clin. North Am 37:375-387, viii-ix 2008
25. **Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M, Janakiraman M, Solit D, Knauf JA, Tuttle RM, Ghossein RA, Fagin JA.** Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. Cancer Res 69:4885-93, 2009
26. **Donghi R, Longoni A, Pilotti S, Michieli P, Della Porta G, Pierotti MA.** Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. J Clin Invest 91:1753-60, 1993
27. **Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP.** High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. J Clin Invest 91:179-84, 1993
28. **He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Fransila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A.** The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 102:19075-80, 2005
29. **Pallante P, Visone R, Ferracin M, Ferraro A, Berlingieri MT, Troncone G, Chiappetta G, Liu CG, Santoro M, Negrini M, Croce CM, Fusco A.** MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. Endocr Relat Cancer 13:497-508, 2006

30. **Yip L, Kelly L, Shuai Y, Armstrong MJ, Nikiforov YE, Carty SE, Nikiforova MN.** MicroRNA signature distinguishes the degree of aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. Ann Surg Oncol 18:2035-41, 2011
31. **Jazdzewski K, Liyanarachchi S, Swierniak M, Pachucki J, Ringel MD, Jarzab B, de la Chapelle A.** Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 106:1502-5, 2009
32. **Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, Benz CC, Vaidya KS, Welch DR.** Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. Cancer Res 69:1279-83, 2009
33. **Chen YT, Kitabayashi N, Zhou XK, Fahey TJ 3rd, Scognamiglio T.** MicroRNA analysis as a potential diagnostic tool for papillary thyroid carcinoma. Mod. Pathol. 21:1139-1146, 2008
34. **Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la Chapelle A.** Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 105:7269-74, 2008
35. **Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J, Benz CC.** Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. Oncogene 27:5643-7, 2008
36. **McCall KD, Harii N, Lewis CJ, Malgor R, Kim WB, Saji M, Kohn AD, Moon RT, Kohn LD.** High basal levels of functional toll-like receptor 3 (TLR3. and noncanonical Wnt5a are expressed in papillary thyroid cancer and are coordinately decreased by phenylmethimazole together with cell proliferation and migration. Endocrinology 148:4226-37, 2007
37. **Pallante P, Battista S, Pierantoni GM, Fusco A**. Deregulation of microRNA expression in thyroid neoplasias. Nat Rev Endocrinol 10:88-101, 2014
38. **Garofalo M, Quintavalle C, Di Leva G, Zanca C, Romano G, Taccioli C, Liu CG, Croce CM, Condorelli G.** MicroRNA signatures of TRAIL resistance in human non-small cell lung cancer. Oncogene 27:3845-55, 2008
39. **Visone R, Russo L, Pallante P, De Martino I, Ferraro A, Leone V, Borbone E, Petrocca F, Alder H, Croce CM, Fusco A.** MicroRNAs (miR.-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. Endocr Relat Cancer 14:791-8, 2007
40. **Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, Massalini S, Frajese GV, Ciafrè SA, Farace MG.** MiR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. J Biol Chem. 282:23716-24, 2007
41. **Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, Veronese A, Sabbioni S, Calin GA, Grazi GL, Giovannini C, Croce CM, Bolondi L, Negrini M.** MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. Oncogene 27:5651-61, 2008
42. **Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, Liuzzi F, Lulli V, Morsilli O, Santoro S, Valtieri M, Calin GA, Liu CG, Sorrentino A, Croce CM, Peschle C.** MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. Proc Natl Acad Sci USA 102:18081-6, 2005
43. **Natali PG, Berlingieri MT, Nicotra MR, Fusco A, Santoro E, Bigotti A, Vecchio G.** Transformation of thyroid epithelium is associated with loss of c-kit receptor. Cancer Res 55:1787-91, 1995.
44. **Meng F, Glaser SS, Francis H, DeMorrow S, Han Y, Passarini JD, Stokes A, Cleary JP, Liu X, Venter J, Kumar P, Priester S, Hubble L, Staloch D, Sharma J, Liu CG, Alpini G.** Functional analysis of microRNAs in human hepatocellular cancer stem cells. J Cell Mol Med 16:160-73, 2012
45. **Taylor MA, Sossey-Alaoui K, Thompson CL, Danielpour D, Schiemann WP.** TGF-β upregulates miR-181a expression to promote breast cancer metastasis. J. Clin. Invest. 123:150-163 2013
46. **Mansueto G, Forzati F, Ferraro A, Pallante P, Bianco M, Esposito F, Iaccarino A, Troncone G, Fusco A.** Identification of a New Pathway for Tumor Progression: MicroRNA-181b Up-Regulation and CBX7 Down-Regulation by HMGA1 Protein. Genes Cancer 1:210-24, 2010
47. **Wu JI, Lessard J, Crabtree GR.** Understanding the words of chromatin regulation. Cell 136:200-6, 2009
48. **Karamitopoulou E, Pallante P, Zlobec I, Tornillo L, Carafa V, Schaffner T, Borner M, Diamantis I, Esposito F, Brunner T, Zimmermann A, Federico A, Terracciano L, Fusco A.** Loss of the CBX7 protein expression correlates with a more aggressive phenotype in pancreatic cancer. Eur J Cancer 46:1438-44, 2010
49. **Pallante P, Federico A, Berlingieri MT, Bianco M, Ferraro A, Forzati F, Iaccarino A, Russo M, Pierantoni GM, Leone V, Sacchetti S, Troncone G, Santoro M, Fusco A.** Loss of the CBX7 gene expression correlates with a highly malignant phenotype in thyroid cancer. Cancer Res 68:6770-8, 2008
50. **Leone V, D'Angelo D, Rubio I, de Freitas PM, Federico A, Colamaio M, Pallante P, Medeiros-Neto G, Fusco A.** MiR-1 is a tumor suppressor in thyroid carcinogenesis targeting CCND2, CXCR4, and SDF-1alpha. J Clin Endocrinol Metab 96:E1388-98, 2011
51. **Migliore C, Martin V, Leoni VP, Restivo A, Atzori L, Petrelli A, Isella C, Zorcolo L, Sarotto I, Casula G, Comoglio PM, Columbano A, Giordano S.** MiR-1 downregulation cooperates with MACC1 in promoting MET overexpression in human colon cancer. Clin Cancer Res 18:737-47, 2012
52. **Pignot G, Cizeron-Clairac G, Vacher S, Susini A, Tozlu S, Vieillefond A, Zerbib M, Lidereau R, Debre B, Amsellem-Ouazana D, Bieche I.** MicroRNA expression profile in a large series of bladder tumors: identification of a 3-miRNA signature

associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer. Int J Cancer 132:2479-91, 2013

53. **Yan D, Dong Xda E, Chen X, Wang L, Lu C, Wang J, Qu J, Tu L.** MicroRNA-1/206 targets c-Met and inhibits rhabdomyosarcoma development. J Biol Chem 284:29596-604, 2009
54. **Yoshino H, Enokida H, Chiyomaru T, Tatarano S, Hidaka H, Yamasaki T, Gotannda T, Tachiwada T, Nohata N, Yamane T, Seki N, Nakagawa M.** Tumor suppressive microRNA-1 mediated novel apoptosis pathways through direct inhibition of splicing factor serine/arginine-rich 9 (SRSF9/SRp30c. in bladder cancer. Biochem Biophys Res Commun 417:588-93, 2012
55. **Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Carlomagno F, Basolo F, Faviana P, Kruhoffer M, Orntoft T, Russell JP, Rothstein JL, Fusco A, Santoro M, Melillo RM.** Functional expression of the CXCR4 chemokine receptor is induced by RET/PTC oncogenes and is a common event in human papillary thyroid carcinomas. Oncogene 23:5958-67, 2004
56. **Leone V, D'Angelo D, Ferraro A, Pallante P, Rubio I, Santoro M, Croce CM, Fusco A.** A TSH-CREB1-microRNA loop is required for thyroid cell growth. Mol Endocrinol 25:1819-30, 2011
57. **Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE.** MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. J Clin Endocrinol Metab 93:1600-8, 2008