

**PERFIL GLOBAL DE METILAÇÃO  
DO GENOMA NA SÍNDROME DO  
MELANOMA FAMILIAL**

**ÉRICA SARA SOUZA DE ARAÚJO**

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente  
para a obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Ana Cristina Victorino Krepischi**

**São Paulo**

**2015**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

**Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente**

Araújo, Érica Sara Souza

**Perfil global de metilação do genoma na síndrome do melanoma familiar /**  
Érica Sara Souza de Araújo - São Paulo; 2015.

163p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Ana Cristina Victorino Krepischi

Descritores: 1. MELANOMA. 2. METILAÇÃO DE DNA. 3. LEUCÓCITOS.  
4. ANÁLISE EM MICROSSÉRIES. 5. NEOPLASIAS CUTÂNEAS.  
6. HEREDITARIEDADE.

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) concedido à aluna Érica Sara Souza de Araújo (2012/13963-9).

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Ana C. V. Krepischi, pela oportunidade de trabalhar com epigenética e também pelo apoio e presença constante.

Ao pessoal do Núcleo de Câncer de Pele do A. C. Camargo Câncer Center, em especial o Dr. João Duprat e a enfermeira de pesquisa Luciana Moredo, fundamentais para o desenvolvimento deste estudo.

À Dra. Maria Isabel Achatz, pelo auxílio com a história familiar de câncer nos pacientes de melanoma e pelas discussões para estabelecer o critério de melanoma hereditário.

À Dra. Vilma Martins, pela disponibilização das amostras de pacientes afetados por melanoma esporádico.

Ao Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center, pelo fornecimento das amostras utilizadas neste estudo.

À Dra. Helena Brentani, que nos apoiou na descoberta da plataforma HM450K e proporcionou ótimas reuniões.

Ao pessoal da Deoxi, que me receberam tão bem em Araçatuba para os experimentos de *microarray*.

Ao Henrique Vieira e a Dra. Tatiane Rodrigues, pelas análises iniciais com a plataforma HM450K.

À Dra. Hellen Kuasne, pelo auxílio com o experimento de pirosequenciamento.

Ao Laboratório de Patologia Molecular Diagnóstica do A.C. Camargo Cancer Center, pelo apoio com a análise de mutações em *CDKN2A* nos pacientes afetados por melanoma esporádico.

Ao Dr. Fabio Marchi, pelo apoio com a análise dos dados obtidos em pacientes portadores de mutação em *CDKN2A*.

Ao Dr. Gustavo R. Fernandes, pelo auxílio com o *R*.

Ao Dr. André Kashiwabara e ao Dr. Rodrigo Ramalho, pela paciência e por várias análises de bioinformática.

À Dra. Jordana Bell e sua aluna de doutorado Leonie Ross, que prontamente aceitaram nos auxiliar com análises da plataforma HM450K.

À Dra. Dirce Carraro, pelas sugestões ao estudo e pelo fornecimento de reagentes.

À Dra. Carla Rosenberg, pelas sugestões e por dedicar parte do seu tempo a este estudo.

Aos colegas de laboratório Dimitrius Pramio, Felipe Fidalgo e Talita Aguiar, por compartilhar experiências.

A todos do CIPE que contribuíram com meu doutoramento, desde com sorrisos até reagentes.

Ao pessoal da Pós-graduação e Biblioteca.

À Fapesp, pelo apoio financeiro indispensável.

Às minhas amigas Ana Maria Fraga, Joana C. M. de Mello, Rafaella M. P. Nascimento e Raquel Stabellini, pelas sugestões e pelo apoio desde minha iniciação científica.

Ao meu querido Enéas, pela inabalável e incansável companhia.

## RESUMO

Araújo ESS. **Perfil global de metilação do genoma na síndrome do melanoma familiar**. São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O melanoma é um câncer de pele agressivo com incidência crescente em todo o mundo. A maioria dos casos é esporádica, mas o risco de desenvolver melanoma aumenta significativamente em pessoas com histórico familiar deste tipo de câncer. Cerca de 40% dos casos de melanoma familiar se devem a mutações germinativas em *CDKN2A* e 1% dos demais casos ocorrem devido a alterações em outros genes, de maneira que parte da etiologia do melanoma hereditário ainda não está esclarecida. Neste estudo, propusemos investigar a contribuição de alterações epigenéticas, especificamente da metilação do DNA, na ocorrência de melanoma cutâneo. Para tanto, investigamos os níveis de metilação global e de *loci* específicos, através de *microarray* e pirosequenciamento, em amostras de sangue periférico de 69 pacientes de melanoma (esporádico ou hereditário) e de 63 indivíduos sem histórico de câncer (controles). Na investigação de *loci* específicos, detectamos hipermetilação de *LINE-1* em pacientes afetados por melanoma, com um sítio específico deste elemento associado à ocorrência de metástase. Ainda, pacientes portadores de mutação em *CDKN2A* apresentaram hipermetilação também em outros elementos repetitivos em relação aos demais pacientes. Os níveis de metilação nos genes *BAP1*, *MGMT*, *MITF*, *PALB2* e *POT1*, descritos como *loci* de risco ao melanoma cutâneo, foram associados a variáveis clínicas dos pacientes, como status de mutação em *CDKN2A*, número de melanomas e índice de Breslow. Um subgrupo de pacientes apresentou diferença de metilação maior que 40% na região promotora de genes anteriormente não associados ao risco de melanoma cutâneo: *DPYSL4*, *NLGN2*, *NPFFR2*, *TCEB3B*, *ADCY10P1*, *OR2L13* e *VTRNA2-1*. Na análise de metilação global do genoma, pacientes portadores de mutação em *CDKN2A* apresentaram uma assinatura epigenética composta por 90 sítios CpG associados a variantes genéticas, incluindo polimorfismos em genes já associados ao melanoma cutâneo. Adicionalmente, detectamos hipometilação global em pacientes afetados por melanoma esporádico,

possivelmente relacionada a diferenças na composição de células sanguíneas entre as amostras estudadas. Corrigindo a heterogeneidade da população sanguínea, pacientes afetados por melanoma esporádico apresentam metilação diferencial em três sítios CpG, mapeados nos genes *MCPHI*, *TMCO3* e *C7orf65*. Pacientes de melanoma hereditário sem mutações em *CDKN2A* apresentam metilação diferencial no mesmo sítio mapeado em *C7orf65*, cuja função ainda é desconhecida. Nossos dados indicam que os níveis de metilação de algumas regiões genômicas são associados à ocorrência de melanoma e também a algumas variáveis clínicas de pacientes de melanoma, abrindo possibilidades de novos estudos para elucidar o papel da metilação diferencial nestas regiões no desenvolvimento do melanoma cutâneo.

## SUMMARY

Araújo ESS. [Genome-wide methylation profile in familial melanoma syndrome]. São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Cutaneous melanoma is an aggressive cancer with increasing incidence rate worldwide. The majority of melanoma cases are sporadic, but the risk of melanoma development is higher in individuals with familial history of the disease. Approximately 40% of hereditary melanoma cases are caused by *CDKN2A* mutations and 1% occurs due to genetic alterations in additional genes; therefore, the genetic etiology of familial melanoma has not been fully elucidated yet. In this work, we investigated the role of epigenetic alterations, particularly DNA methylation, in the occurrence of skin melanoma. We examined the DNA methylation profile, using genomic microarray and pyrosequencing, in peripheral blood samples of 69 melanoma patients (familial and sporadic patients) and 63 individuals without personal cancer history (controls). Melanoma patients exhibited *LINE-1* hypermethylation and the DNA methylation level at one specific *LINE-1* CpG correlated with the occurrence of metastasis. Moreover, hereditary melanoma patients carrying *CDKN2A* mutations showed a hypermethylated pattern of overall repetitive DNA elements compared to other patients. The melanoma risk genes *BAP1*, *MGMT*, *MITF*, *PALB2* and *POT1* presented statistical association between blood DNA methylation levels and either *CDKN2A*-mutation status, number of lesions or Breslow thickness. In a subgroup of melanoma patient, we also detected 40% of DNA methylation differences at promoter regions of seven genes not previously associated with skin melanoma (*DPYSL4*, *NLGN2*, *NPFFR2*, *TCEB3B*, *ADCY10P1*, *OR2L13* and *VTRNA2-1*). The genome-wide methylation analysis revealed a panel of 90 CpG sites differentially methylated in *CDKN2A*-mutated patients; however, this epigenetic signature was related to underlying SNPs, including polymorphisms at genes already associated to skin melanoma. Furthermore, a pattern of DNA hypomethylation associated to blood cell composition was detected in sporadic melanoma patients. After adjusting for blood



cells heterogeneity, sporadic melanoma patients exhibited hypermethylation at three CpGs sites, mapped in the sequences of *MCPH1*, *TMCO3* and *C7orf65* genes. Hereditary melanoma patients without *CDKN2A* mutations showed hypermethylation at the same CpG site mapped in *C7orf65*, whose function is currently unknown. In conclusion, our data suggest that the methylation level of some genomic regions can be associated with both skin melanoma occurrence and clinical characteristics of melanoma patients, open new opportunities to study the role of DNA methylation changes in skin melanoma development.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Fisiologia dos melanócitos na pele.....	2
<b>Figura 2</b>	Modelo de desenvolvimento do melanoma cutâneo.....	5
<b>Figura 3</b>	Mapa genômico dos genes de risco ao melanoma cutâneo.....	14
<b>Figura 4</b>	Perfil de metilação do DNA em células normais e tumorais.....	18
<b>Figura 5</b>	Esquema ilustrativo da comparação do nível de metilação de promotor gênico entre um paciente de melanoma e grupo controle....	33
<b>Figura 6</b>	Fluxograma representativo do desenho experimental desta tese de doutoramento.....	45
<b>Figura 7</b>	Níveis de metilação do gene <i>CDKN2A</i> na região codificadora de p16 em leucócitos de diferentes grupos de pacientes de melanoma cutâneo.....	48
<b>Figura 8</b>	Distribuição no genoma dos sítios CpG analisados na plataforma HM450K (Illumina).....	49
<b>Figura 9</b>	Tipos de sondas presentes na plataforma HM450K (Illumina).....	50
<b>Figura 10</b>	Espectro de detecção de valores de metilação de acordo com os dois diferentes tipos de sondas da plataforma HM450K (Illumina).....	51
<b>Figura 11</b>	Níveis de metilação global e sítio-específica de <i>LINE-1</i> em pacientes de melanoma cutâneo e indivíduos sem histórico de câncer (controles).....	55

<b>Figura 12</b>	Níveis de metilação global e sítio-específica de <i>LINE-1</i> em pacientes de melanoma cutâneo.....	56
<b>Figura 13</b>	Níveis de metilação em elementos repetitivos de DNA em pacientes de melanoma cutâneo e indivíduos sem histórico de câncer (controles).....	59
<b>Figura 14</b>	Análise <i>in silico</i> de genes com níveis alterados de metilação na região promotora em pacientes de melanoma cutâneo comparados aos controles.....	80
<b>Figura 15</b>	Níveis de metilação em sítios CpG do gene <i>VTRNA2-1</i> em indivíduos controle.....	82
<b>Figura 16</b>	Níveis de metilação em sítios CpG de <i>ADCY10P1</i> e <i>OR2L13</i> em indivíduos controle.....	83
<b>Figura 17</b>	Níveis de metilação em sítios CpG do pseudogene <i>ADCY10P1</i> em diferentes tecidos periféricos.....	85
<b>Figura 18</b>	Níveis de metilação em sítios CpG do pseudogene <i>ADCY10P1</i> em diferentes tecidos periféricos do mesmo indivíduo.....	85
<b>Figura 19</b>	Padrão de metilação em sítios CpG do gene <i>VTRNA2-1</i> .....	88
<b>Figura 20</b>	Esquema da sequência de DNA amplificada para análise de metilação de sítios CpG do gene <i>VTRNA2-1</i> por pirosequenciamento	89
<b>Figura 21</b>	<i>Cluster</i> hierárquico não supervisionado construído a partir de CpGs detectados como diferencialmente metilados entre grupos de pacientes de melanoma cutâneo e controles.....	98

<b>Figura 22</b>	Redes biológicas geradas pela análise IPA com base nas interações de 110 genes diferencialmente metilados entre pacientes de melanoma cutâneo com e sem mutações em <i>CDKN2A</i> e controles.....	101
<b>Figura 23</b>	Esquema da região de DNA amplificada para análise de metilação do sitio CpG cg00631877 (gene <i>PLXNC1</i> ) por pirosequenciamento.	102
<b>Figura 24</b>	Correlação entre os níveis de metilação em um sitio CpG do gene <i>PLXNC1</i> obtidos pelo <i>microarray</i> HM450K (Illumina) e por pirosequenciamento.....	103
<b>Figura 25</b>	<i>Cluster</i> hierárquico não supervisionado construído a partir de CpGs detectados como hipometilados em pacientes de melanoma cutâneo portadores de mutação em <i>CDKN2A</i> em relação aos controles.....	104
<b>Figura 26</b>	Redes biológicas geradas pela análise IPA com base nas interações de 58 genes diferencialmente metilados entre pacientes de melanoma cutâneo portadores mutação em <i>CDKN2A</i> e controles.....	106
<b>Figura 27</b>	Eletroferogramas dos genes detectados como diferencialmente metilados entre pacientes de melanoma cutâneo portadores de mutação em <i>CDKN2A</i> e indivíduos sem histórico de câncer.....	108
<b>Figura 28</b>	<i>Heatmap</i> de 65 SNPs na casuística analisada por <i>microarray</i> HM450K (Illumina).....	112
<b>Figura 29</b>	Boxplot dos níveis de metilação detectados pelo <i>microarray</i> HM450K (Illumina) para cada amostra da casuística.....	113
<b>Figura 30</b>	Distribuição dos níveis de metilação em regiões de <i>imprinting</i> genômico na casuística analisada por <i>microarray</i> HM450K (Illumina).....	114

<b>Figura 31</b>	Estimativa da porcentagem de diferentes populações de células sanguíneas em dois grupos estudados de pacientes de melanoma cutâneo e no controle.....	115
<b>Figura 32</b>	Proporção da variância explicada total para cada principal componente.....	117
<b>Figura 33</b>	Correlação entre os diferentes tipos celulares presentes no sangue periférico.....	118
<b>Figura 34</b>	Gráficos QQ-plot obtidos a partir de dados antes e após a correção de covariáveis.....	119
<b>Figura 35</b>	Esquema representando informações sobre a região genômica em torno de um sítio CpG diferencialmente metilado em pacientes de melanoma cutâneo hereditário e esporádico.....	122
<b>Figura 36</b>	<i>Cluster</i> hierárquico não supervisionado utilizando CpGs detectados como diferencialmente metilados entre pacientes de melanoma cutâneo e controles.....	123
<b>Figura 37</b>	Análise <i>in silico</i> dos três genes detectados como diferencialmente metilados em pacientes de melanoma cutâneo hereditário e esporádico.....	124
<b>Figura 38</b>	Fluxograma representativo dos resultados desta tese de doutoramento.....	127

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Dados clínicos dos pacientes de melanoma hereditário portadores de mutação patogênica no gene <i>CDKN2A</i> .....	25
<b>Quadro 2</b>	Dados clínicos dos pacientes de melanoma hereditário negativos quanto a mutações nos genes <i>CDKN2A</i> e <i>CDK4</i> analisados por HM450K.....	26
<b>Quadro 3</b>	Dados clínicos dos pacientes afetados por melanoma esporádico analisados por HM450K.....	27
<b>Quadro 4</b>	Dados dos indivíduos sem histórico de câncer analisados por HM450K.....	27
<b>Quadro 5</b>	<i>Primers</i> desenhados para análise de metilação por pirosequenciamento e genotipagem de SNPs.....	43
<b>Quadro 6</b>	Informações sobre os genes diferencialmente metilados em ilha CpG localizada em região promotora nos pacientes de melanoma cutâneo.....	78
<b>Quadro 7</b>	Genotipagem de SNPs presentes em sítios CpG diferencialmente metilados entre pacientes de melanoma cutâneo portadores de mutação em <i>CDKN2A</i> e indivíduos controle.....	109
<b>Quadro 8</b>	Informações sobre genes associados aos sítios CpG diferencialmente metilados entre pacientes de melanoma cutâneo hereditário ou esporádico e indivíduos sem histórico de câncer.....	121

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Dados gerais de pacientes afetados por melanoma cutâneo e indivíduos sem histórico de câncer (controles) analisados quanto aos níveis de metilação em <i>LINE-1</i> .....	54
<b>Tabela 2</b>	Status de metilação global e sítio-específica de <i>LINE-1</i> em pacientes de melanoma cutâneo e indivíduos sem histórico de câncer (controles).....	57
<b>Tabela 3</b>	Níveis de metilação global e sítio específico no elemento <i>LINE-1</i> e associação com características clínicas dos pacientes de melanoma cutâneo.....	58
<b>Tabela 4</b>	Nível de metilação em genes de risco ao melanoma cutâneo em diferentes grupos de pacientes de melanoma e indivíduos controle.....	63
<b>Tabela 5</b>	Associação dos níveis de metilação em genes de risco ao melanoma cutâneo com características clínicas dos pacientes de melanoma.....	64
<b>Tabela 6</b>	Nível de metilação em genes associados ao melanoma cutâneo em melanomas primários e culturas primárias de melanócitos.....	66
<b>Tabela 7</b>	Nível de metilação em genes associados ao melanoma cutâneo nos subtipos de melanoma.....	67
<b>Tabela 8</b>	Nível de metilação em genes associados ao melanoma cutâneo em tumores que desenvolveram ou não metástase.....	68

<b>Tabela 9</b>	Nível de metilação em genes associados ao melanoma cutâneo em tumores primários e metástases pareadas.....	69
<b>Tabela 10</b>	Genes diferencialmente metilados em ilha CpG localizada na região promotora em pacientes de melanoma cutâneo.....	75
<b>Tabela 11</b>	Metilação no gene <i>VTRNA2-1</i> e dados gerais dos indivíduos analisados.....	90
<b>Tabela 12</b>	Níveis de metilação em <i>VTRNA2-1</i> e características clínicas de pacientes de melanoma cutâneo.....	91
<b>Tabela 13</b>	Análise SAM comparando os níveis de metilação de 1% de sondas com maior variabilidade entre pacientes de melanoma cutâneo portadores ou não de mutação em <i>CDKN2A</i> e indivíduos sem histórico de câncer.....	95
<b>Tabela 14</b>	Sítios CpG diferencialmente metilados entre pacientes de melanoma cutâneo portadores de mutação em <i>CDKN2A</i> e indivíduos sem histórico de câncer.....	104
<b>Tabela 15</b>	Associação entre covariáveis relacionadas aos dados do <i>microarray</i> HM450K (Illumina) e principais componentes.....	116
<b>Tabela 16</b>	Sítios CpG diferencialmente metilados entre pacientes de melanoma cutâneo hereditário ou esporádico e indivíduos sem histórico de câncer.....	121



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>1<sup>st</sup> exon</b>	Primeiro éxon
<b>Beta</b>	Nível de metilação medido pelo <i>microarray</i>
<b>CNV</b>	<i>Copy Number Variation</i> (cópias de segmentos genômicos)
<b>CpG</b>	Citosina que precede uma guanina (5'-CG-3')
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>DGV</b>	<i>Database of Genomic Variants</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
<b>ENCODE</b>	<i>Encyclopedia of DNA Elements</i>
<b>FDR</b>	<i>False Discovery Rate</i>
<b>HM450K</b>	Plataforma Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina)
<b>IPA</b>	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
<b>K-mers</b>	Sequência de K nucleotídeos
<b>ng</b>	Nanograma
<b>mm</b>	Milímetro(s)
<b>pb</b>	Par(es) de base(s)
<b>PC</b>	<i>Principal Component</i> (componente principal)
<b>PCA</b>	<i>Principal Component Analysis</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>RefSeq</b>	<i>Reference Sequence</i>
<b>RP</b>	<i>Rank Products</i>
<b>s</b>	Segundo(s)
<b>SAM</b>	<i>Significance Analysis of Microarrays</i>
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polimorphism</i> (polimorfismo de uma única base)
<b>TBE</b>	Tampão Tris-borato-EDTA
<b>TCGA</b>	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
<b>TSS200</b>	À 200 pb do sítio de início de transcrição
<b>TSS1500</b>	À 1500 pb do sítio de início de transcrição
<b>UCSC</b>	<i>University of California Santa Cruz</i>
<b>UV</b>	Ultravioleta

<b>V</b>	Volt(s)
<b>μl</b>	Microlitro(s)
<b>μM</b>	Micromolar(es)

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1	Melanoma cutâneo .....	1
1.1.1	Melanoma familiar .....	8
1.2	Epigenética- metilação do DNA .....	14
1.2.1	Metilação do DNA no câncer.....	17
1.2.2	Metilação do DNA no melanoma .....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	21
2.1	Objetivo Principal .....	21
2.1	Objetivos Específicos.....	21
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
3.1	Casuística .....	23
3.1.1	Pacientes afetados por melanoma e indivíduos sem histórico de câncer.....	23
3.1.2	Melanomas cutâneos e culturas primárias de melanócitos .....	28
3.2	<i>Microarray</i> de metilação do DNA- plataforma Infinium Human Methylation450 BeadChip (HM450K).....	29
3.3	Análise dos dados gerados com a plataforma HM450K.....	30
3.3.1	Análise de metilação do DNA em <i>loci</i> específicos.....	30
3.3.1.1	Elementos repetitivos do DNA .....	31
3.3.1.2	Genes associados ao melanoma cutâneo .....	32
3.3.1.3	Ilhas CpG mapeadas em promotores gênicos .....	32
3.3.2	Análise de metilação global do genoma em pacientes afetados por melanoma hereditário.....	34
3.3.2.1	Pacientes portadores de mutações em <i>CDKN2A</i> .....	34
3.3.2.2	Pacientes sem mutações nos genes <i>CDKN2A</i> e <i>CDK4</i> .....	36
3.3.3	Anotação de genes identificados como diferencialmente metilados .....	39
3.4	Pirosequenciamento .....	40
3.4.1	Análise estatística.....	41

3.5	Outros procedimentos .....	42
3.5.1	Desenho de <i>primers</i> .....	42
3.5.2	Genotipagem do DNA genômico.....	43
3.6	Resumo do desenho experimental.....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
4.1	Metilação no gene <i>CDKN2A</i> em pacientes de melanoma.....	46
4.2	Considerações sobre a plataforma HM450K .....	48
4.3	Metilação em elementos repetitivos de DNA e associação com variáveis clínicas em pacientes de melanoma .....	52
4.4	Investigação dos níveis de metilação em genes de risco ao melanoma cutâneo e associação com variáveis clínicas em pacientes de melanoma .....	61
4.5	Perfil de metilação em ilhas CpG mapeadas em promotores gênicos de pacientes de melanoma .....	73
4.6	Níveis de metilação no gene <i>VTRNA2-1</i> e associação com variáveis clínicas em pacientes de melanoma cutâneo .....	86
4.7	Perfil de metilação global do genoma no melanoma hereditário.....	93
4.7.1	Pacientes portadores de mutação em <i>CDKN2A</i> .....	93
4.7.2	Pacientes negativos quanto a mutações em <i>CDKN2A</i> e <i>CDK4</i> .....	110
4.8	Considerações finais .....	126
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>132</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>135</b>

## ANEXOS

**Anexo 1** Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do A.C. Camargo  
Cancer Center.

**Anexo 2** Identificação de algumas amostras da casuística no banco de dados  
Gene Expression Omnibus.

**Anexo 3** Artigo: DNA methylation levels of melanoma risk genes are  
associated with clinical characteristics of melanoma patients.

- Anexo 4** Artigo: *LINE-1* hypermethylation in peripheral blood of cutaneous melanoma patients is associated with metastasis.
- Anexo 5** Variação estrutural nos genes detectados com padrão aberrante de metilação em ilhas CpG mapeadas em regiões promotoras de pacientes de melanoma cutâneo.
- Anexo 6** Análise *in silico* da frequência de alterações genéticas em diferentes tipos tumorais utilizando listas aleatórias de genes.
- Anexo 7** Artigo: Genome-wide DNA methylation profile of leukocytes from melanoma patients with and without *CDKN2A* mutations.

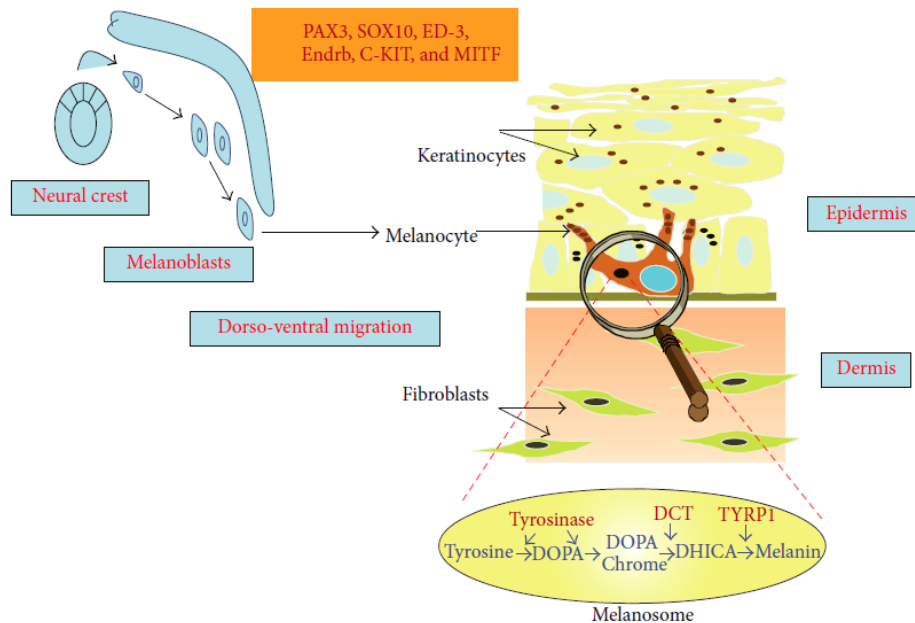
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MELANOMA CUTÂNEO

O registro mais antigo sobre melanoma é encontrado nos escritos de Hipócrates, datados do século V a.C.; e a evidência física mais remota desta doença foi encontrada nos ossos de múmias Incas, com idade aproximada de 2.400 anos (URTEAGA e PACK 1966). O termo melanoma (do grego *melas*= negro e *oma*= tumor) foi utilizado pela primeira vez apenas no início do século XIX, quando Rene Laennec reconheceu que lesões melanóticas eram distintas de grânulos negros associados à tuberculose ou depósitos de carbono, encontrados frequentemente em pulmões durante autópsia (ROGUIN 2006). Ao longo da história, a palavra melanina foi utilizada para nomear diferentes tons de preto e marrom presentes em plantas, insetos, mamíferos e compostos obtidos artificialmente; mas somente por volta da década de 1940 a melanogênese começou a ser esclarecida (LERNER e FITZPATRICK 1950). Simultaneamente, técnicas de cultura de tecido permitiram visualizar que melanomas humanos apresentavam melanócitos, células especializadas na formação de melanina (COBB e WALKER 1960); a partir de então, a transformação maligna dos melanócitos na formação do melanoma começou a ser pesquisada.

Durante o desenvolvimento embrionário, células multipotentes derivadas da crista neural migram para diversos sítios anatômicos e sob adequada sinalização molecular originam os melanócitos (UONG e ZON 2010). Na pele, os melanócitos

estão presentes na camada basal da epiderme (**Figura 1**), produzindo melanina em organelas especializadas denominadas melanossomos, que posteriormente serão transportados para os queratinócitos e proporcionarão pigmentação à pele (MARKS e SEABRA 2001).



**Fonte:** Figura e legenda adaptadas de BERTOLOTTO (2013).

**Figura 1** - Fisiologia dos melanócitos na pele. Os melanócitos são derivados de células multipotentes da crista neural. Durante o desenvolvimento embrionário, células da crista neural migram para várias regiões (como olhos e ouvido interno), dentre elas a camada basal da epiderme, na qual sob a ação de alguns fatores moleculares (retângulo laranja) os melanoblastos se diferenciam em melanócitos. Os melanócitos produzem melanina a partir da oxidação do aminoácido tirosina no interior dos melanossomos, os quais são transportados para os queratinócitos, conferindo pigmentação e proteção aos raios UV.

A melanina é produzida a partir da oxidação do aminoácido tirosina (**Figura 1**), que sob presença ou ausência de compostos sulfidril originará dois tipos de pigmento: eumelanina, de coloração marrom-negra, e feomelanina, amarelo-vermelha, respectivamente (HEARING 2011). A principal função da melanina é a

absorção dos raios UV, com conseqüente proteção do DNA, papel que é melhor desempenhado pela eumelanina (BRENNER e HEARING 2008; PARK et al. 2009).

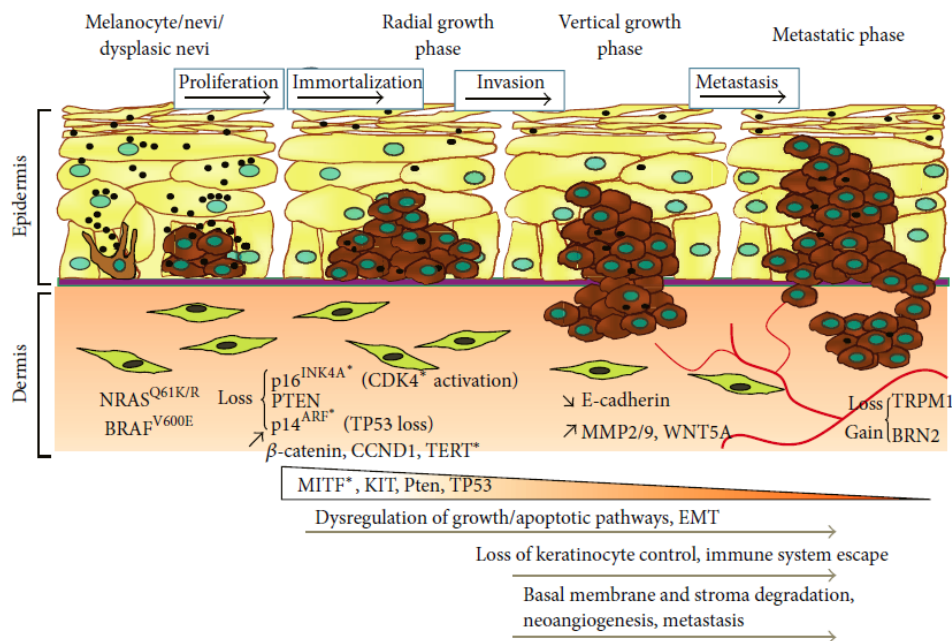
Sob exposição aos raios UV, células da epiderme produzem hormônio estimulante de melanócitos, conhecido como MSH (CHAKRABORTY et al. 1996), que ativam os receptores MC1R presentes na membrana do melanócitos (MOUNTJOY et al. 1992; CHHAJLANI e WIKBERG 1996). Quando ativados, os receptores MC1R elevam os níveis intracelulares de AMPc (ABDEL-MALEK et al. 1995), que por sua vez ativam a expressão de *MITF* (BERTOLOTTI et al. 1998), um fator de transcrição que controla a melanogênese e a proliferação dos melanócitos (HODGKINSON et al. 1993; HUGHES et al. 1994; CHELI et al. 2010).

O melanoma decorre da proliferação descontrolada dos melanócitos, e os principais fatores de risco ao melanoma cutâneo são: exposição aos raios UV, elevado número de nevos, presença de nevos displásicos, pele clara e com incapacidade de se bronzear, cabelos ruivos e história familiar da doença (RIGEL 2010). A importância dos raios UV no melanoma cutâneo é evidenciada por: (a) indivíduos que vivem em regiões próximas ao equador ou em altas latitudes apresentam maior risco de desenvolver melanoma, (b) sítios anatômicos mais expostos aos raios e queimaduras solares são comuns entre as regiões do corpo com melanoma e (c) há um aumento no risco da doença em usuários de bronzeamento artificial (RUSSAK e RIGEL 2012). A cor da pele e cabelos e, conseqüentemente, a proteção aos raios UV, são influenciados por alelos do gene *MC1R*; variantes que ocasionam pele clara e cabelos ruivos são mais comuns entre pacientes de melanoma do que na população geral (VALVERDE et al. 1996) e o risco de desenvolver melanoma aumenta cinco vezes para portadores de duas variantes de *MC1R*



associadas a cabelo ruivo (CUST et al. 2012). O risco de melanoma também aumenta de acordo com o número de nevos, e a presença de nevos displásicos é um fator de risco independente que confere um aumento de até 10 vezes no risco de desenvolver melanoma (RUSSAK e RIGEL 2012); uma meta-análise mostra que indivíduos com ao menos 25 nevos e/ou ao menos um nevo displásico apresentam alto risco de desenvolver melanoma (OLSEN et al. 2010b).

Historicamente, os nevos foram associados com a ocorrência de melanoma em descrições de famílias com recorrência desta doença (ELDER et al. 1980; CLARK et al. 1978; LYNCH et al. 1978). De acordo com o clássico modelo proposto por CLARK et al. (1984), alguns nevos comuns resultam em lesões pré-malignas que podem gradualmente acumular alterações e progredir para melanoma e metástase. No entanto, estudos posteriores mostraram que a frequência de melanomas derivados de lesões pré-malignas ou nevos comuns é baixa (CRUCIOLI e STILWELL 1982; GRUBER et al. 1989; MARKS et al. 1990; TSAO et al. 2003), sendo mais comumente encontrado em melanomas localizados no tronco e em indivíduos jovens (RIVERS et al. 1989; BEVONA et al. 2003). Contudo, esse modelo clássico de Clark ainda é utilizado para ilustrar o desenvolvimento tumoral, sendo que vários fatores moleculares já foram associados aos diferentes passos desta progressão (**Figura 2**).



**Fonte:** Figura e legenda adaptadas de BERTOLOTTO (2013).

**Figura 2** - Modelo de desenvolvimento do melanoma cutâneo. A figura mostra um modelo de progressão tumoral e alguns fatores moleculares importantes ao longo do processo. O asterisco indica genes já descritos com mutação germinativa em melanoma familiar. EMT= transição epitélio-mesênquima.

De modo geral, os melanomas cutâneos apresentam maior número de mutações quando comparados a outros tumores sólidos (BERGER et al. 2012), principalmente alterações C>T (mudança de citosina para timina), assinatura mutacional característica de exposição à radiação UVB (HODIS et al. 2012). No entanto, grande parte dessas alterações são mutações chamadas de *passengers*, sem impacto detectável na tumorigênese. As mutações direcionadoras do melanoma cutâneo (mutações *drivers*) afetam principalmente as vias biológicas p16-pRB, MAPK e PI 3-quinase, as quais estão envolvidas com proliferação e/ou sobrevivência celular (BOGENRIEDER e HERLYN 2010). *CDKN2A* e *CDK4* são os genes da via p16-pRB mais importantes no desenvolvimento do melanoma

(WALKER et al. 1998; LI et al. 2006), com frequente inativação de *CDKN2A* (REED et al. 1995; TALVE et al. 1997) e ativação de *CDK4* (CURTIN et al. 2005; WALKER et al. 1998). Os genes *BRAF* (POLLOCK et al. 2003) e *NRAS* (LEE JH et al. 2011), da via MAPK, são frequentemente ativados em melanoma cutâneo, sendo a mutação *BRAF*<sup>V600E</sup> (substituição do aminoácido valina por ácido glutâmico no códon 600 da proteína BRAF) encontrada em até 60% dos melanomas cutâneos (DAVIES et al. 2002) e alvo do inibidor vemurafenib, já aprovado para uso clínico (LEONG et al. 2012). *PTEN*, um gene da via PI 3-quinase, está deletado ou inativado em 10-30% dos melanoma cutâneos (AGUISSA-TOURÉ e LI 2012), e a perda de função de *PTEN* junto com *BRAF*<sup>V600E</sup> promove metástase (SILVA et al. 2014). E por fim, destacam-se mutações no gene *KIT*, as quais podem ativar as vias MAPK e PI 3-quinase (LENNARTSSON et al. 2005) e são comuns em melanomas originados em áreas de exposição intermitente e crônica aos raios solares (CURTIN et al. 2006; HANDOLIAS et al. 2010); enquanto tumores em áreas sem exposição crônica aos raios UV apresentam mais comumente mutação no gene *BRAF* (CURTIN et al. 2005; CANDIDO et al. 2014).

Além de mutações ativadoras do processo de tumorigênese nos melanócitos, alterações na homeostase da pele também contribuem para este processo. Há uma interação dinâmica entre melanócitos e queratinócitos, de maneira que existam na proporção de 1:5, respectivamente, com cada melanócito enviando melanosomos para cerca de 35 queratinócitos (HAASS e HERLYN 2005). As E-caderinas são importantes moléculas de adesão entre melanócitos e queratinócitos, muitas linhagens de melanoma apresentam expressão de N-caderina e perda de expressão de E-caderina, levando os queratinócitos a se associarem preferencialmente a

fibroblastos e células endoteliais (HSU et al. 1996). Os fibroblastos também atuam na homeostase da pele, alterações na produção de fatores de crescimento, como HGF, por exemplo, podem provocar o desenvolvimento de melanoma e metástase (OTSUKA et al. 1998).

Os melanomas cutâneos apresentam diversos subtipos e os mais comuns e melhor estudados são: extensivo superficial, nodular, lentigo maligno e acral (COCKERELL 2012). O melanoma extensivo superficial é o mais comum, apresenta disseminação horizontal e pode originar-se de um nevo preexistente. O melanoma nodular apresenta-se na forma de um nódulo e tem contribuição da derme. O melanoma lentigo maligno é comum em idosos com pele danificada pela exposição solar. O melanoma acral é encontrado na palma das mãos, solas dos pés e sob as unhas, sendo o tipo mais comum entre indivíduos não caucasianos, como negros e hispânicos (STUBBLEFIELD e KELLY 2014).

O estadiamento do melanoma é realizado com base no grau de invasão do tumor na pele, considerando-se a taxa mitótica e presença ou não de ulceração, e na ocorrência de metástase regional e/ou à distância (ELDER 2014). Um importante fator no estadiamento do melanoma é o índice de Breslow, proposto em 1970 para avaliar a espessura do tumor desde o topo até as células tumorais mais profundas na pele (BRESLOW 1970). Os índices de Breslow de 1, 2 e 4 mm têm sido definidos pelo *American Joint Committee on Cancer-AJCC* para uso no estadiamento tumoral (DICKSON e GERSHENWALD 2011).

A taxa de detecção de melanoma cutâneo vem crescendo em todo o mundo (USHER-SMITH et al. 2014). Embora o melanoma cutâneo represente apenas cerca de 4% dos casos de câncer de pele, é o tipo mais letal, sendo responsável por

aproximadamente 75% das mortes ocasionadas por câncer de pele de acordo com a *American Cancer Society-ACS* (2015). No Brasil, a estimativa de novos casos de melanoma cutâneo para o biênio 2014/2015 é de 5.890 casos (Ministério da Saúde 2014).

A maioria dos casos de melanoma cutâneo é esporádica, mas 5-10% dos casos ocorrem em um contexto familiar (GOLDSTEIN e TUCKER 1995; FLORELL 2005). Apesar da baixa incidência de melanoma familiar, seu estudo carrega o potencial de ampliar o entendimento de aspectos moleculares envolvidos no desenvolvimento de melanoma, visto que genes de predisposição a câncer são também fundamentais na tumorigênese de câncer esporádico (RAHMAN 2014).

### **1.1.1 Melanoma familiar**

Estimativas realizadas no fim da década de 1990 já indicavam que o risco relativo de desenvolver melanoma em indivíduos com história familiar da doença varia de acordo com o grau de parentesco e o número de indivíduos afetados: a presença de melanoma em parentes de primeiro grau foi associada a um aumento de risco de 2-3 vezes, enquanto em famílias com vários afetados, a chance de apresentar melanoma aumentaria de 30 a 70 vezes (KEFFORD et al. 1999). Uma recente meta-análise relata que o risco relativo de desenvolver melanoma em indivíduos com história familiar da doença seria de 2,06; no entanto, há grande heterogeneidade dependendo da região geográfica, com o risco relativo variando de 1,21 em Israel até 13,27 na Europa Meridional (OLSEN et al. 2010a). Embora seja possível que fatores ambientais influenciem o risco relativo de melanoma no contexto familiar, estudos

indicam que a contribuição genética seria importante, variando de 21 a 55% (CZENE et al. 2002; SHEKAR et al. 2009).

A primeira evidência de hereditariedade do melanoma cutâneo foi relatada por Willian Norris em 1820, que descreveu a ocorrência de melanoma em duas gerações e verificou a formação do tumor a partir de um nevo comum (REBECCA et al. 2012). Somente mais de um século depois a hereditariedade do melanoma seria retomada, com descrições de famílias com recorrência desta doença; contudo, nenhum gene de suscetibilidade foi encontrado ao longo de muitos anos (CAWLEY et al. 1952; SMITH et al. 1966; ANDERSON 1967; ANDREWS 1968).

Entre os anos de 1970 e 1980, dados obtidos com linhagens celulares murinas e humanas apontavam a importância do cromossomo 9, mais especificamente da região de 9p, no melanoma cutâneo (PIEPKORN 1994). Através do uso de estudos de ligação, CANNON-ALBRIGHT et al. (1992) delimitaram uma região em 9p21 como *locus* de suscetibilidade ao melanoma. Dois grupos independentes mostraram que a região 9p21 contém o gene *CDKN2A*, cuja proteína p16 atua no controle de ciclo celular (KAMB et al. 1994a; NOBORI et al. 1994). Contudo, a taxa de detecção de mutações em *CDKN2A* em famílias afetadas por melanoma foi menor do que a esperada (HUSSUSSIAN et al. 1994; KAMB et al. 1994b; HAYWARD 1996). Buscou-se então mutações em genes que interagissem com *CDKN2A*, levando à identificação de algumas poucas famílias com melanoma portadoras de mutações no gene *CDK4* (WÖLFEL et al. 1995; ZUO et al. 1996; SOUFIR et al. 1998).

O gene *CDKN2A* codifica dois transcritos, p14 e p16, os quais diferem em relação ao primeiro éxon (éxon 1 $\alpha$  e éxon 1 $\beta$  para p16 e p14, respectivamente) como resultado de *splicing* alternativo e mudança no quadro de leitura (DURO et al. 1995;

STONE et al. 1995). Tanto p14 quanto p16 atuam como supressores tumorais na fase G1 do ciclo celular: p16 inibe CDK4, o que prejudica a fosforilação de pRB e resulta na parada do ciclo celular (LUKAS et al. 1995); p14 inibe MDM2, levando à estabilização de p53 o que também resulta em parada do ciclo celular (ZHANG et al. 1998). As mutações em *CDKN2A* associadas ao melanoma têm sido detectadas mais frequentemente nos éxons 1 $\alpha$  e 2 (MARZUKA-ALCALÁ et al. 2014). Tumores de sistema nervoso central (PETTY et al. 1993; BAHUAU et al. 1997) e pâncreas (GOLDSTEIN et al. 1995; DE SNOO et al. 2008) também estão associados à presença de mutações germinativas em *CDKN2A*.

Durante 17 anos, apenas *CDKN2A* e *CDK4* foram considerados genes de alto risco de desenvolver melanoma cutâneo, correspondendo a pouco mais de 40% dos casos de melanoma familiar (AOUDE et al. 2015). Também é bastante reconhecida a contribuição de variantes no gene *MC1R*, que conferem baixo risco de desenvolver melanoma (WILLIAMS et al. 2011) e também podem influenciar a penetrância de mutações em *CDKN2A* (FARGNOLI et al. 2010) e *CDK4* (PUNTERVOLL et al. 2013). Recentemente, o avanço das técnicas de sequenciamento genômico permitiu a identificação de outros genes de suscetibilidade ao melanoma cutâneo. Dentre estes novos genes, destacam-se na literatura científica *MITF*, *BAP1*, *POT1* e *TERT*.

Em humanos, mutações germinativas de perda de função no gene *MITF* ocasionam a Síndrome de Waardenburg Tipo 2, caracterizada por anormalidades de pigmentação na pele, cabelos e olhos, perda de cabelos e defeitos em estruturas desenvolvidas a partir da crista neural (TASSABEHJI et al. 1994). Em melanomas cutâneos, *MITF* é encontrado amplificado frequentemente (GARRAWAY et al. 2005; CRONIN et al. 2009). Em 2011, dois grupos independentes identificaram uma

mesma variante rara, rs149617956 (E318K, substituição do aminoácido ácido glutâmico por lisina no códon 318), que aumenta a atividade de MITF e predispõe ao desenvolvimento de melanoma cutâneo e câncer renal (BERTOLOTTI et al. 2011; YOKOYAMA et al. 2011). O estudo de MITF<sup>E318K</sup> em várias populações, incluindo um trabalho de nosso grupo em colaboração com o Núcleo de Câncer de Pele do A.C. Camargo Cancer Center, mostrou que esta variante rara confere risco baixo a intermediário de desenvolver melanoma (GHIORZO et al. 2013; BERWICK et al. 2014; GROMOWSKI et al. 2014; PRAMIO et al. 2014).

Os genes *POT1* e *TERT* fazem parte da maquinaria de manutenção dos telômeros, estruturas que mantêm a integridade dos cromossomos a cada divisão celular; de um modo geral, o aumento do comprimento dos telômeros é associado à imortalização da célula (ROBLES-ESPINOZA et al. 2014a). Recentemente, uma mutação localizada a -57 pb do sítio de início de transcrição de *TERT* foi identificada em quatro indivíduos afetados por melanoma em uma mesma família (HORN et al. 2013). Concomitantemente a esta descoberta, foi revelado que mutações que aumentam os níveis transcricionais de *TERT* são comuns no melanoma cutâneo (HUANG et al. 2013) e, posteriormente, mutações em *TERT* também foram encontradas em outros tipos de câncer (VINAGRE et al. 2013). Nos últimos anos, estudos têm mostrado que variantes em *TERT* modificam o risco de desenvolver vários tipos de câncer, algumas com efeito protetor em melanoma (LAW et al. 2011) e outras com aumento de risco em câncer de pulmão (GAO et al. 2014), pâncreas (CAMPA et al. 2015) e próstata (SHADRINA et al. 2015). Reforçando a importância de genes de regulação dos telômeros no melanoma cutâneo, dois grupos independentes reportaram um total de nove mutações germinativas raras em *POT1*



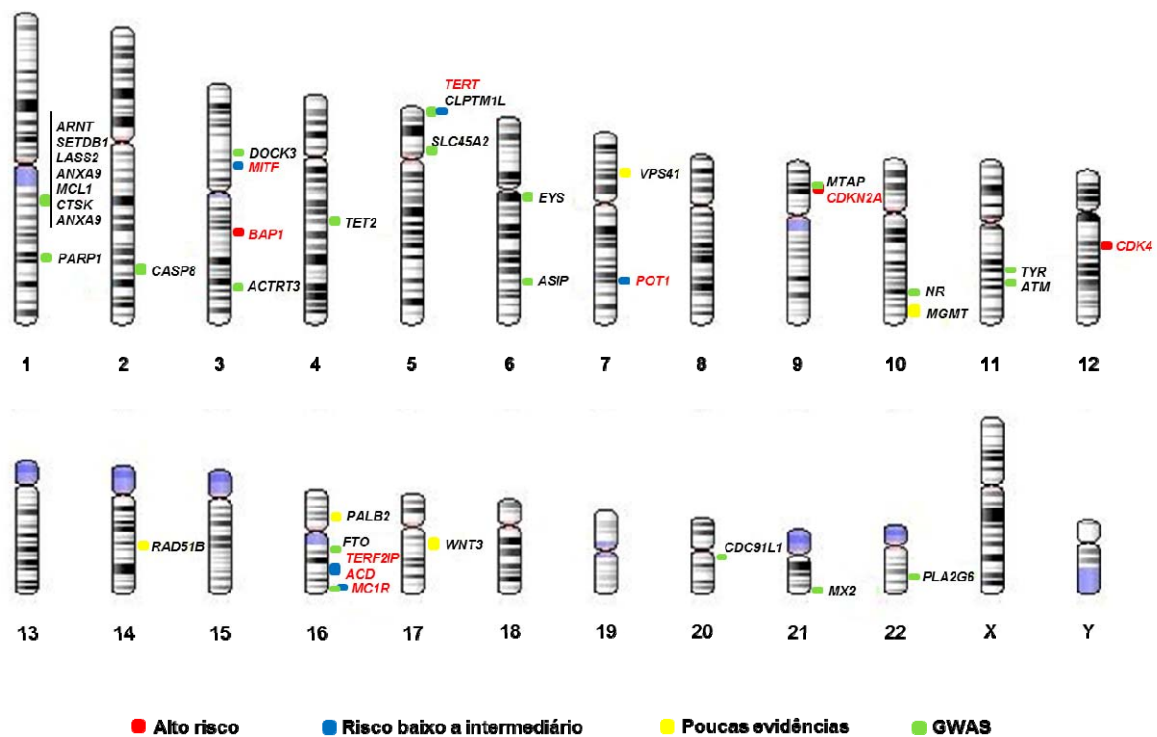
em 13 famílias com melanoma cutâneo; a maior parte destas mutações está localizada no domínio responsável pela interação de POT1 com os telômeros, e para alguns portadores de mutação foi confirmado aumento do comprimento dos telômeros (ROBLES-ESPINOZA et al. 2014b; SHI et al. 2014).

*BAP1* é um supressor tumoral cuja proteína atua como deubiquitinase em vários alvos (WHITE e HARPER 2012), dentre eles BRCA1 (JENSEN et al. 1998), controlando ciclo celular (ELETR e WILKINSON 2011) e resposta a danos no DNA (YU et al. 2013). Três grupos independentes identificaram mutações em *BAP1* em uma síndrome de câncer hereditário caracterizada pela ocorrência de diferentes tumores, dentre eles melanoma ocular e cutâneo (ABDEL-RAHMAN et al. 2011; TESTA et al. 2011; WIESNER et al. 2011). Cerca de 15% dos portadores de mutação em *BAP1* apresentam melanoma cutâneo (CARBONE et al. 2013) e a frequência de mutação é maior em indivíduos afetados por melanoma ocular e cutâneo (NJAUW et al. 2012).

Até o presente, foram realizados oito estudos de associação genômica utilizando SNPs (conhecidos como *Genome-Wide Association Study*-GWAS) em melanoma, resultando na identificação de 28 SNPs associados a 27 genes. Os SNPs com resultados mais relevantes estão relacionados a controle do ciclo celular, melanogênese e reparo de danos ao DNA (BISHOP et al. 2009; AMOS et al. 2011; BARRETT et al. 2011; MACGREGOR et al. 2011; LAW et al. 2012; TEERLINK et al. 2012; ILES et al. 2013; SONG et al. 2014). Entretanto, para a maioria dos SNPs, o risco relativo conferido é baixo e não há estudos posteriores que comprovem sua associação com melanoma cutâneo. Uma abordagem interessante foi realizada por um estudo que explorou os dados obtidos em GWAs analisando 11 SNPs presentes

em 11 genes (*ARNT*, *ALS2CR12*, *LOC402359*, *LOC100418*, *MTAP*, *TYR*, *ATM*, *HERC2*, *CDK10*, *ASIP* e *PLA2G6*); a análise verificou que este conjunto de SNPs é mais eficaz em identificar indivíduos de alto risco para o desenvolvimento de melanoma cutâneo do que fatores tradicionais, como cor da pele e número de nevos (FANG et al. 2013).

Embora os avanços nas técnicas de biologia molecular tenham permitido análise ampla do genoma em grande número de indivíduos, poucos genes foram acrescentados à lista de *loci* de risco ao melanoma cutâneo (**Figura 3**), representando pouco mais de 1% dos casos de melanoma familiar; o gene *CDKN2A* ainda figura como mais importante, com mutações germinativas detectáveis em cerca de 40% dos casos de melanoma familiar (AOUDE et al. 2015). A ausência de outras alterações genéticas detectáveis que expliquem totalmente a etiologia do melanoma familiar torna o estudo do epigenoma um campo promissor na elucidação deste câncer hereditário.



**Figura 3** - Mapa genômico dos genes de risco ao melanoma cutâneo. Os genes são indicados em suas respectivas localizações cromossômicas e foram caracterizados de acordo com a legenda abaixo da imagem. Genes em vermelho são reconhecidos como *loci* de predisposição ao melanoma, genes em preto são *loci* candidatos. Ideograma baseado no Genome Decoration Page (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp>; GRCh37/ resolução: 850). Figura e legenda adaptadas de capítulo de livro em processo de finalização, cuja autoria é de nosso grupo.

## 1.2 EPIGENÉTICA- METILAÇÃO DO DNA

O termo epigenoma abrange modificações químicas herdáveis do genoma que modulam e controlam a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA; entre estas modificações, a metilação do DNA é a marca epigenética mais estudada (RICHARDS 2006). A metilação do DNA consiste na adição covalente de um grupo metil (CH<sub>3</sub>) às bases adenina ou citosina (EHRlich et al. 1985). A metilação da adenina ocorre no nitrogênio de posição 4 ou 6, sendo comum em bactérias e com

poucas evidências em eucariotos (RATEL et al. 2006). A metilação em citosinas (C) pode ocorrer nos contextos CG, CHG e CHH (onde G= guanina e H= citosina, timina ou adenina), sendo a metilação em CG a forma mais comum e herdável em vertebrados (SCHÜBELER 2015; HOLLIDAY e PUGH 1975). No genoma de vertebrados, os dinucleotídeos CpG (5'-CG-3') ocorrem em uma proporção menor que a esperada (considerando a frequência de citosinas e guaninas separadamente) e de uma maneira não uniforme, concentrados em regiões ricas em CpG denominadas ilhas CpG; ao longo da evolução, estas regiões teriam resistido ao processo natural de deaminação de citosinas metiladas que dá origem a timinas (GARDINER-GARDEN e FROMMER 1987). Tradicionalmente, ilha CpG é definida como uma região maior que 200 pb, com conteúdo de citosinas e guaninas maior que 50% e a razão de CpGs observados em relação ao esperado maior que 0,6 (GARDINER-GARDEN e FROMMER 1987); variações neste critério têm sido propostas em vários estudos (WU et al. 2010) e, em geral, ilhas CpG abrangem 1% do genoma humano, em regiões de aproximadamente 1000 pb com aproximadamente 1 CpG a cada 10 pb (ILLINGWORTH et al. 2010).

Desde 1975, quando a metilação foi sugerida como uma marca epigenética em mamíferos (HOLLIDAY e PUGH 1975; RIGGS 1975), ela foi associada à repressão gênica. Em humanos, cerca de 70% dos genes apresentam ilha CpG em sua região promotora (SAXONOV et al. 2006); de uma maneira geral, genes inativos, principalmente aqueles de silenciamento estável, apresentam hipermetilação na ilha CpG (JONES 2012), enquanto genes ativos apresentam ilhas CpG hipometiladas (COOPER e KRAWCZAK 1989). Em linhas gerais, os modelos de silenciamento transcricional pela metilação postulam que a marca afeta a ligação de fatores de

transcrição e/ou recrutam proteínas capazes de reconhecer o grupo metil, as quais então sinalizam a repressão gênica (BAUBEC e SCHÜBELER 2014; SPRUIJT e VERMEULEN 2014). Entretanto, estudos têm mostrado cada vez mais a complexidade desta marca no controle da expressão gênica, sendo que a metilação do DNA pode ocorrer em regiões próximas a ilhas CpG (conhecidas como *shelf* e *shore*), em outros elementos regulatórios (reforçadores e silenciadores) ou no corpo do gene, e pouco sabemos sobre a metilação nestas regiões (JONES 2012). A complexidade é ainda aumentada pela interação com outras marcas epigenéticas, como modificações pós-traducionais em histonas e variantes de histonas (WINTER e FISCHLE 2010).

Ao longo da vida do indivíduo, o perfil de metilação do DNA é dinâmico. Duas ondas de desmetilação, que apagam marcas da geração anterior, seguidas de remetilação global ocorrem: uma durante a gametogênese, a qual estabelece o *imprinting* parental de acordo com o sexo, e a outra no início do desenvolvimento embrionário, relacionada à diferenciação e determinação do tipo celular (HACKETT e SURANI 2013). No indivíduo adulto, há regiões diferencialmente metiladas de acordo com o tecido, onde hipometilação é encontrada em genes de função específica do tecido (SCHULTZ et al. 2015). Sabe-se ainda que o ambiente desempenha papel importante na aquisição de metilação diferencial, o cuidado materno (UNTERNAEHRER et al. 2015) e uso de álcool (FINEGERSH et al. 2015), por exemplo, alteram o padrão de metilação em alguns genes.

A deposição e a manutenção da metilação do DNA são realizadas por enzimas DNA-metiltransferases (DNMTs) na presença de um doador do grupo metil, o S-adenosilmetionina. Originalmente, foi verificado que em mamíferos a deposição

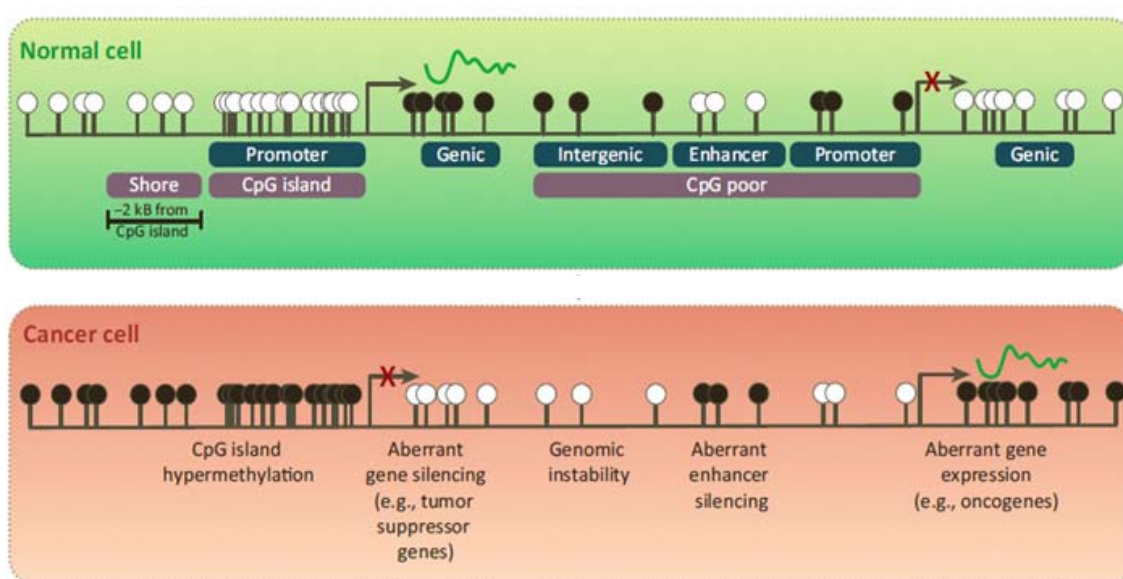
da metilação em CpGs seria realizada pelas DNMT3A e 3B (OKANO et al. 1999), enquanto a manutenção da marca seria garantida pela DNMT1 (BESTOR et al. 1988; BESTOR 1992). Atualmente, é reconhecido que as enzimas DNMT3A e 3B também atuam na manutenção da metilação (JONES e LIANG 2009). A desmetilação pode ocorrer de maneira passiva, por meio da perda de manutenção da metilação ao longo de sucessivas divisões celulares, ou de maneira ativa, com o envolvimento de enzimas de reparo de DNA e/ou remodelamento da metil-citosina (PICCOLO e FISHER 2014).

### 1.2.1 Metilação do DNA no câncer

No câncer, é bem estabelecido a existência de um perfil aberrante de metilação do DNA quando comparado ao tecido normal de origem (**Figura 4**). A hipometilação global do DNA foi a primeira anormalidade epigenética identificada em câncer (FEINBERG e VOGELSTEIN 1983a). De maneira geral, esta hipometilação está relacionada com a ocorrência de instabilidade genômica através da ativação de elementos retrovirais endógenos (EDEN et al. 2003; HOWARD et al. 2008). Além disso, a hipometilação de ilhas CpG localizadas em promotores de oncogenes pode levar à ativação destes genes, promovendo a proliferação celular. Este mecanismo foi descrito, por exemplo, para os oncogenes *HRAS* (FEINBERG e VOGELSTEIN 1983b) e *Maspin* (KHALKHALI-ELLIS 2006). Por outro lado, a hipermetilação de *loci* específicos em câncer está relacionada ao silenciamento transcricional de muitos genes supressores de tumor. Desde a descoberta da hipermetilação da região promotora do gene *RB* em retinoblastoma (GREGER et al. 1989), outros supressores de tumor têm sido descritos como hipermetilados, sendo

exemplos: *VHL* em câncer renal (HERMAN et al. 1994) e *BRCA1* em câncer de mama e ovário (DOBROVIC e SIMPFENDORFER 1997; ESTELLER et al. 2000).

Como descrito acima, o perfil aberrante de metilação do DNA exerce um papel fundamental na tumorigênese; conseqüentemente, a metilação do DNA pode ser um alvo na terapia contra o câncer (KRISTENSEN et al. 2009) e também um marcador para detecção e prognóstico de tumores malignos (LAIRD 2003).



**Fonte:** Figura e legenda adaptadas de STIRZAKER et al. (2014).

**Figura 4** - Perfil de metilação do DNA em células normais e tumorais. São mostrados os sítios CpG (pirulitos) e seus status de metilação em diferentes regiões do genoma em células normais (acima) e de câncer (abaixo). A consequência do perfil aberrante de metilação no câncer também é descrita na parte de baixo do painel. Círculos brancos representam sítio CpG não metilado, círculos negros, metilado.

### 1.2.2 Metilação do DNA no melanoma

As alterações epigenéticas desempenham importante papel durante o processo de transformação dos melanócitos (MOLOGNONI et al. 2011). As enzimas DNMT3A e DNMT3B são significativamente mais expressas durante a progressão

do melanoma (NGUYEN et al. 2011), evento provavelmente relacionado ao silenciamento de genes supressores de tumor através da metilação do DNA em suas regiões promotoras. De fato, mais de 70 genes foram descritos como hipermetilados em melanomas (SCHINKE et al. 2010), como *CDKN2A* (STRAUME et al. 2002) e *MGMT* (HOON et al. 2004), por exemplo. A hipometilação em regiões promotoras também é detectada no melanoma cutâneo, porém é menos documentada, destacando-se a hipometilação de genes da família *MAGE* (ZENDMAN et al. 2001; KARPF et al. 2004; LORIOT et al. 2006).

Vários estudos têm indicado o potencial da utilização de níveis de metilação de *loci* específicos como biomarcadores no melanoma cutâneo. Como exemplo, pode-se citar a metilação em *PTEN*, *TSLC1* e *LINE-1* em amostras tumorais, todas associadas a pior prognóstico (LAHTZ et al. 2010; YOU et al. 2010; SIGALOTTI et al. 2011). Na busca de biomarcadores, vários estudos utilizam outros tecidos que não o tumoral, como uma forma menos invasiva de obtenção de amostra do paciente e também pelo potencial de detecção precoce (MIKESKA e CRAIG 2014). Dentre estes estudos, a análise dos níveis de metilação do DNA em sangue periférico vem crescendo, possibilitando detectar não apenas biomarcadores tumorais, mas também alterações germinativas, denominadas epimutações (MARSIT e CHRISTENSEN 2013). Em melanoma, a investigação do perfil de metilação do DNA em sangue periférico está apenas no início. A presença de epimutação germinativa em *CDKN2A* no melanoma familiar foi investigada em algumas coortes, com resultados negativos (ERLANDSON et al. 2008; VAN DOORN et al. 2009). O status de metilação em *LINE-1* também foi examinado, sem alterações detectáveis (HYLAND et al. 2013);



no entanto, os níveis de metilação em *TNF* e *TNFRSF10C* foram associados ao risco de desenvolver melanoma cutâneo (HYLAND et al. 2014; PERGOLI et al. 2014).

Diante da relevância da metilação do DNA no desenvolvimento do melanoma cutâneo e da falta de fatores genéticos que expliquem totalmente a etiologia dos casos de melanoma familiar, propusemos explorar o papel da metilação de DNA no desenvolvimento de melanomas cutâneos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

O objetivo central deste projeto foi investigar o perfil global de metilação do genoma de pacientes que preenchem critérios para melanoma hereditário ou afetados por melanoma esporádico, visando avaliar a existência de sítios CpG com padrão diferencial de metilação em relação a indivíduos sem histórico de câncer (controles).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Os objetivos específicos foram:

- 1 Obter em amostras de DNA genômico de sangue periférico o perfil de metilação de sítios CpG distribuídos pelo genoma de indivíduos pertencentes a diferentes grupos: melanoma hereditário, melanoma esporádico e controles sem histórico de câncer; utilizando técnica de *microarray* em plataforma HM450K (Illumina).
- 2 Identificar sítios CpG ou regiões genômicas com metilação diferencial significativa entre os grupos ou indivíduos estudados.
- 3 Analisar *in silico* os principais genes identificados na análise de metilação diferencial, para investigação das vias biológicas relacionadas e sua eventual relevância no melanoma cutâneo.

- 4 Determinar os níveis de metilação do DNA em (a) elementos repetitivos do DNA, (b) genes associados ao melanoma cutâneo e (c) no RNA não codificante *VTRNA2-1* por meio da análise dos dados da plataforma HM450K e pirosequenciamento.
- 5 Estudar a associação de características clínicas dos pacientes com os níveis de metilação (a) do elemento repetitivo *LINE-1*, (b) de genes associados ao melanoma cutâneo e (c) do RNA não codificante *VTRNA2-1*.
- 6 Obter os níveis de metilação de genes associados ao melanoma cutâneo e do RNA não-codificante *VTRNA2-1* em culturas primárias de melanócitos normais e em amostras de melanomas cutâneos, com respectivas associações com variáveis clínicas dos tumores.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Este foi um estudo retrospectivo realizado no A.C. Camargo Cancer Center (São Paulo, Brasil), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) desta instituição sob o protocolo número 1695/12 (Anexo 1).

#### **3.1 CASUÍSTICA**

##### **3.1.1 Pacientes afetados por melanoma e indivíduos sem histórico de câncer**

A coleta de sangue periférico para extração de DNA genômico foi realizada previamente, após assinatura do termo de consentimento. Amostras de DNA de pacientes e controles foram solicitadas ao Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center, sendo analisadas quanto à concentração, pureza e integridade através de quantificações no Nanodrop (Thermo Scientific), Qubit (Invitrogen) e eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen).

O grupo controle estudado foi constituído por 63 amostras de sangue periférico de indivíduos sem histórico pessoal de câncer.

O grupo de pacientes afetados por melanoma cutâneo foi constituído por 69 indivíduos sem parentesco. Os pacientes afetados por melanoma foram examinados no Núcleo de Câncer de Pele do A.C. Camargo Cancer Center. Foram coletadas informações clínicas como: gênero, idade no momento da coleta de sangue periférico, número de melanomas, índice de Breslow e ocorrência de metástase. A maioria dos pacientes foi classificada como estadios I (58,0%). A história familiar de

melanomas e outros cânceres foi averiguada pelo Departamento de Oncogenética do A.C. Camargo Cancer Center. As amostras de sangue periférico foram coletadas sem quimioterapia prévia.

Os pacientes foram classificados em três grupos: pacientes afetados por melanoma hereditário, portadores (n=8) ou não (n=20) de mutação no gene *CDKN2A*, e pacientes afetados por melanoma esporádico (diagnóstico de apenas um melanoma e sem histórico familiar da doença; n=41).

Os pacientes de melanoma hereditário negativos quanto a mutação em *CDKN2A* preenchem ao menos um dos seguintes critérios: mínimo de três melanomas primários no mesmo indivíduo (subgrupo melanomas múltiplos; n=8); mínimo de dois melanomas primários no mesmo indivíduo, sendo um deles antes dos 35 anos (subgrupo idade precoce de acometimento; n=3); mínimo de três casos de melanomas em duas gerações consecutivas, um deles antes dos 50 anos (subgrupo melanoma familiar; n=9). A presença de mutação nos genes *CDKN2A* e *CDK4* neste grupo de pacientes foi investigada em estudo prévio desenvolvido no A.C. Camargo Cancer Center (DE ÁVILA et al. 2014). Adicionalmente, duas outras mutações de ponto associadas à predisposição ao melanoma cutâneo foram investigadas nos pacientes de melanoma hereditários sem mutações nos genes *CDKN2A* e *CDK4*: c.G1075A, no gene *MITF*, e c.T-57G, no promotor do gene *TERT*; com exceção do paciente Mel.H7, que não foi genotipado, todos os demais são negativos quanto a estas mutações (PRAMIO et al. 2014).

As análises feitas por meio da técnica de pirosequenciamento foram realizadas em um número maior de indivíduos, totalizando 120: 8 pacientes portadores de mutação em *CDKN2A*, 20 pacientes de melanoma hereditário sem

mutações em *CDKN2A* e *CDK4*, 41 pacientes de melanoma esporádico e 51 indivíduos controle. A análise do perfil global de metilação utilizando a plataforma HM450K foi realizada em 51 indivíduos: 8 pacientes portadores de mutação em *CDKN2A* (**Quadro 1**), 19 pacientes de melanoma hereditário negativos quanto a mutações nos genes *CDKN2A* e *CDK4* (**Quadro 2**), 13 pacientes afetados por melanoma esporádico (**Quadro 3**) e 12 indivíduos do grupo controle (**Quadro 4**), sendo este último independente do analisado por pirosequenciamento. Os pacientes de melanoma esporádico analisados na HM450K foram testados para mutações no gene *CDKN2A* pelo procedimento padrão realizado no Laboratório de Patologia Molecular Diagnóstica do A.C. Camargo Cancer Center, sendo todos negativos.

**Quadro 1** - Dados clínicos dos pacientes de melanoma hereditário portadores de mutação patogênica no gene *CDKN2A*.

Paciente	Gênero	Idade*	Número de melanomas	Tipo histológico <sup>§</sup>	Índice de Breslow (mm) <sup>§</sup>	Sobrevida livre de doença* (anos)	Variantes em <i>CDKN2A</i> <sup>#</sup>
Mel.M1	F	67	2	extensivo superficial	0,9	14	c.301G>T, c.442G>A
Mel.M2	M	52	2	não informado	1,2	3	c.142C>A
Mel.M3 <sup>†</sup>	M	70	4	extensivo superficial	4	1	c.-34G>T /
Mel.M4	F	41	2	não informado	1,2	10	c.-34G>T
Mel.M5	F	55	4	não informado	0,6	8	c.142C>A
Mel.M6	F	76	1	não informado	0,7	17	c.-34G>T
Mel.M7	F	61	1	não informado	1,6	25	c.IVS-105G>A
Mel.M8	F	59	1	não informado	0,8	20	c.142C>A

\*Em anos, no momento da coleta da amostra de sangue periférico; <sup>§</sup>referente ao melanoma de maior estadiamento; <sup>#</sup>DE ÁVILA et al. 2014; <sup>†</sup>radioterapia em 1972.

**Quadro 2** - Dados clínicos dos pacientes de melanoma hereditário negativos quanto a mutações nos genes *CDKN2A* e *CDK4* analisados por HM450K.

Paciente	Gênero	Idade*	Número de melanomas	Tipo histológico <sup>§</sup>	Índice de Breslow (mm) <sup>§</sup>	Sobrevida livre de doença*	Critério de inclusão <sup>#</sup>
Mel.H1	F	63	3	extensivo superficial	0,8	2 anos	1
Mel.H2	F	59	1	extensivo superficial	1,2	9 anos	2
Mel.H3	M	36	2	extensivo superficial	0,97	3 anos	3
Mel.H4	F	56	1	extensivo superficial	0,5	7 anos	2
Mel.H5	F	38	2	extensivo superficial	2,4	7 anos	1
Mel.H6	M	23	2	extensivo superficial	0,96	6 anos	1
Mel.H7	M	41	2	extensivo superficial	1,3	2 anos	2
Mel.H8	M	35	2	extensivo superficial	3,5	2 anos	3
Mel.H9	F	51	1	não informado	não informado	21 anos	2
Mel.H10	F	56	1	não informado	0,8	4 anos	2
Mel.H11	M	72	4	extensivo superficial	3,45	3 anos	1
Mel.H12	F	79	4	extensivo superficial	1	4 anos	1
Mel.H13	M	67	4	nodular	4,7	3 anos	1
Mel.H14	F	44	1	extensivo superficial	0,62	9 meses	2
Mel.H15	F	32	2	extensivo superficial	0,36	3 meses	3
Mel.H16	F	40	6	não informado	0,6	4 anos	1
Mel.H17	M	39	1	extensivo superficial	1,12	3 meses	2
Mel.H18	M	44	1	extensivo superficial	0,55	9 meses	2
Mel.H19	F	22	3	extensivo superficial	0,57	2 anos	1

\*no momento da coleta do sangue periférico; <sup>§</sup>referente ao melanoma de maior estadiamento; <sup>#</sup>critérios de inclusão: MM - melanomas múltiplos; MF- melanoma familiar; IP- idade precoce de acometimento.

**Quadro 3** - Dados clínicos dos pacientes afetados por melanoma esporádico analisados por HM450K.

Paciente	Gênero	Idade*	Tipo histológico	Índice de Breslow (mm)	Sobrevida livre de doença*
Mel.1	F	48	extensivo superficial	0,33	10 meses
Mel.2	F	63	extensivo superficial	0,27	0 <sup>&amp;</sup>
Mel.3 <sup>†</sup>	F	25	não informado	0,57	2 meses
Mel.4	F	43	extensivo superficial	0,25	2 meses
Mel.5	F	56	extensivo superficial	0,83	1 ano
Mel.6	F	37	extensivo superficial	1,2	0 <sup>&amp;</sup>
Mel.7	M	55	extensivo superficial	0,95	23 dias
Mel.8	M	34	extensivo superficial	0,27	2 dias
Mel.9	M	72	extensivo superficial	1,2	0 <sup>&amp;</sup>
Mel.10	M	46	não informado	<i>in situ</i>	0 <sup>#</sup>
Mel.11	M	68	extensivo superficial	não informado	2 meses
Mel.12	M	38	extensivo superficial	<i>in situ</i>	0 <sup>#</sup>
Mel.13	M	31	melanocitoma epitelióide pigmentado	4,3	2 anos

§mutação em *CDKN2A* foi testada em todos os pacientes, sendo todos negativos; \*no momento da coleta do sangue periférico; <sup>&</sup>paciente com margens cirúrgicas comprometidas no momento da coleta de sangue; <sup>#</sup> paciente com tumor primário no momento da coleta de sangue; <sup>†</sup>esta amostra foi utilizada apenas na análise de perfil global de metilação do DNA em pacientes portadores de mutação em *CDKN2A* (itens 3.3.2.1 e 4.7.1).

**Quadro 4** - Dados dos indivíduos sem histórico de câncer analisados por HM450K.

Controle	Sexo	Idade
C1	F	67
C2	M	52
C3	M	70
C4	F	41
C5	F	55
C6	F	76
C7	F	63
C8	F	59
C9	M	36
C10	F	33
C11	M	26
C12	M	70



### **3.1.2 Melanomas cutâneos e culturas primárias de melanócitos**

Dados de metilação do DNA em melanomas cutâneos e culturas de melanócitos derivadas de indivíduos saudáveis foram obtidos a partir de trabalho prévio de nosso grupo desenvolvido no A.C. Camargo Cancer Center (PRAMIO 2015).

Amostras de DNA genômico de melanomas cutâneos primários, provenientes de um grupo independente de pacientes de melanoma, foram disponibilizadas pelo Banco de DNA e RNA do A.C. Camargo Cancer Center (CAMPOS et al. 2012). Este grupo foi constituído por cinco melanomas do subtipo acral e treze melanomas não acrais; sete tumores apresentavam amostras de metástase pareada. A maioria destes tumores foi classificada como estadio III (66,7%); contudo, informação a respeito do estadiamento não estava disponível para o restante das amostras.

Três culturas primárias de melanócitos foram cedidas pela Dra. Silvy S. Maria-Engler e sua aluna de doutorado Paula C. Penacchi (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo). Estas culturas de células foram derivadas de amostras de prepúcio provenientes de três diferentes doadores saudáveis (BROHEM et al. 2012), sob aprovação do Comitê de Ética da Universidade de São Paulo (CEP HU/USP 943/09).

### **3.2 MICROARRAY DE METILAÇÃO DO DNA- PLATAFORMA INFINIUM HUMANMETHYLATION450 BEADCHIP (HM450K)**

O procedimento de obtenção dos dados dos *microarrays* HM450K foi realizado no laboratório Deoxi Biotecnologia ([www.deoxi.com.br](http://www.deoxi.com.br)), com participação da aluna. Brevemente, 500 a 1000 ng de DNA genômico foram convertidas por bissulfito de sódio com o kit EZ DNA Methylation-Gold Ki (Zymo). Neste processo, as citosinas não metiladas são convertidas em uracila, enquanto citosinas metiladas permanecem sem modificação. Em seguida, iniciou-se o procedimento de *microarray* com a plataforma HM450K, de acordo com as especificações do fabricante (Illumina). Brevemente, as amostras de DNA genômico convertido passaram por um processo de amplificação, no qual as posições com uracilas foram convertidas em timinas. Após fragmentação, as amostras de DNA foram hibridizadas em *BeadChips*, onde se anelaram covalentemente com sondas específicas de 50-*mers* por complementaridade de sequência. Foi realizada posteriormente uma lavagem para retirada de fragmentos não anelados e o *chip* foi preparado para extensão de fragmentos de DNA dentro de capilares; o DNA hibridizado foi usado como fitamolde para extensão de bases alelo-específicas, incorporando nucleotídeos marcados. Posteriormente, o *chip* é transformado em imagem pelo iScan (Illumina), sendo que a informação presente nesta imagem permite a identificação da base incorporada às réplicas de cada sonda presente na plataforma (cada CpG interrogado tem em média 10 sondas como réplicas). O sistema iScan fornece os dados brutos do *microarray*, ou seja, a intensidade do sinal obtido para cada sonda, os quais podem ser utilizados em diversos programas para análise de metilação do DNA.

Os dados brutos dos *microarrays* foram depositados no banco público do NCBI, Gene Expression Omnibus, sob o número de acesso GSE54939 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE54939>, ver Anexo 2).

### **3.3 ANÁLISE DOS DADOS GERADOS COM A PLATAFORMA HM450K**

Foram utilizadas diferentes abordagens para análise dos dados do *microarray*, considerando tanto os níveis de metilação global quanto *loci* específicos. Nestas diferentes abordagens, foram utilizados os valores de metilação obtidos com os *softwares* GenomeStudio (Illumina) ou RnBeads (ASSENOV et al. 2014). Valores de metilação extraídos com o *software* GenomeStudio foram utilizados nos estudos descritos nos itens 3.3.1 e 3.3.2.1. Para o estudo detalhado no item 3.3.2.2, foi utilizado RnBeads.

Os valores de metilação são mostrados como valores de beta, que variam de 0 a 1 (representando não metilado e totalmente metilado, respectivamente) e são calculados da seguinte forma:  $\text{beta} = \frac{\text{intensidade do alelo metilado (M)}}{\text{intensidade do alelo não metilado (U)} + \text{intensidade de M} + 100}$ .

A seguir, são detalhadas as diferentes abordagens dos dados obtidos com o *microarray* HM450K e os respectivos contextos em que foram aplicadas.

#### **3.3.1 Análise de metilação do DNA em *loci* específicos**

Foram utilizados dados de pacientes de melanoma (n=39) e controles (n=12) para os quais experimentos na plataforma HM450K foram conduzidos. Com auxílio

do pacote IMA (WANG et al. 2012), foram removidas das análises posteriores sondas: sem valores de beta para qualquer amostra, contendo SNPs, mapeadas em cromossomos sexuais, com  $p$ -valor de detecção  $>0,01$  (critério utilizado nos estudos (a) “genes associados ao melanoma cutâneo” e (b) “ilhas CpG mapeadas em promotores gênicos”) ou  $>1e-05$  (critério utilizado no estudo “elementos repetitivos de DNA”). A correção relacionada ao desvio da distribuição dos valores de metilação detectados pelas sondas Infinium tipos I/II foi realizada através de BMIQ utilizando o pacote ChAMP (MORRIS et al. 2014). Todos estes procedimentos de bioinformática foram realizados com auxílio do Dr. André Kashiwabara (Universidade Tecnológica Federal do Paraná). Após esta etapa de pré-processamento dos dados do *microarray*, seguiu-se a análise de metilação nos *loci* especificados abaixo.

### **3.3.1.1 Elementos repetitivos do DNA**

Foram selecionadas as sondas da HM450K que apresentam sobreposição total (50-*mers*) à sequências repetitivas do genoma (*LINE*, *SINE*, *LTR* e outros), de acordo com os dados disponibilizados no banco público Gene Expression Omnibus sob o número GSE42409 (PRICE et al. 2013). Posteriormente, os valores de beta obtidos para estas sondas foram recuperados e diferenças nos níveis de metilação entre pacientes e controles, ou entre os diferentes grupos de pacientes de melanoma foram testadas quanto à significância utilizando teste de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis com teste de comparações múltiplas de Dunn, respectivamente. Os testes estatísticos foram realizados com auxílio do GraphPad PRISM (versão 5).

### 3.3.1.2 Genes associados ao melanoma cutâneo

Foram recuperados os valores de beta de todos os CpGs associados aos seguintes genes: *BAP1*, *CDK4*, *CDKN2A*, *KIT*, *MC1R*, *MGMT*, *MITF*, *PALB2*, *POT1*, *TERT*, *TNF* e *TNFRSF10C*. Posteriormente, estes CpGs foram agrupados em duas categorias, promotor ou corpo gênico, de acordo com o transcrito gênico associado, informação fornecida pela Illumina, baseada em dados do Genome Browser UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>). A categoria “promotor” inclui CpGs mapeados a partir de 1500 pb do sítio de início de transcrição até o primeiro éxon (TSS1500, TSS200, 5’UTR ou 1<sup>st</sup> *exon*). A categoria “corpo gênico” compreende as sondas restantes associadas ao gene em questão (demais éxons e introns, 3’UTR foi excluído). Para cada gene, o nível de metilação de cada categoria foi obtido pela média dos valores de beta de todos os CpGs pertencentes àquela. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise estatística a fim de comparar o nível de metilação de cada categoria dos genes citados acima entre os grupos estudados (pacientes de melanoma, indivíduos controle, melanomas primários e melanócitos), bem como verificar associação com variáveis clínicas (índice de Breslow, número de melanomas, subtipo de melanoma e metástase). Foram utilizados os testes Mann-Whitney, Kruskal-Wallis com teste de comparações múltiplas de Dunn, ou teste t pareado, de acordo com o apropriado. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa GraphPad PRISM (versão 5).

### 3.3.1.3 Ilhas CpG mapeadas em promotores gênicos

Pacientes de melanoma analisados com a plataforma HM450K (n=39) tiveram o perfil de metilação de ilhas CpG mapeadas em promotores gênicos

investigado de maneira individual, comparando-se com os dados do grupo controle (n=12). Foram selecionadas apenas sondas mapeadas em ilha CpG localizada em seqüências de promotor gênico (TSS1500, TSS200, 5'UTR ou 1<sup>st</sup> exon), de acordo com informação fornecida pela Illumina (baseado no Genome Browser UCSC). Para cada paciente, o valor de beta de cada um desses CpGs selecionados foi comparado com a mediana do valor de beta do mesmo CpG no grupo controle. Em cada paciente, foram selecionados genes que apresentassem mínimo de três CpGs com  $\geq 20\%$  de diferença de metilação em cada sítio em relação ao controle. Para um gene ser considerado como tendo padrão de metilação aberrante, a mediana de cada paciente, considerando-se todos os CpGs mapeados nos genes selecionados, deveria ter uma diferença mínima de 40% de metilação quando comparada com a mediana obtida para o grupo controle (**Figura 5**).

Sondas associadas ao gene 1	Valores de beta no paciente	Mediana dos valores de beta no grupo controle (n=12)	Diferença de metilação
CpG a	0,37	0,75	-0,38
CpG b	0,52	0,76	-0,24
CpG c	0,46	0,58	-0,12
CpG d	0,53	0,80	-0,27
mediana	0,52	0,75	-0,23

} mínimo de 3 CpGs com  $\geq 20\%$  de diferença de metilação  
 →  $\geq 40\%$  de diferença de metilação

**Figura 5** - Esquema ilustrativo da comparação do nível de metilação de promotor gênico entre um paciente de melanoma e grupo controle. Como exemplo, são mostrados dados hipotéticos de um gene 1 e sondas de sítios CpG a - CpG d mapeadas em ilha CpG localizada no promotor do gene 1. A análise é realizada comparando-se individualmente dados de cada paciente com os dados do grupo controle (n=12). O valor de beta (que corresponde ao nível de metilação) de cada sonda é comparado com a mediana obtida entre todos os indivíduos controle para a mesma sonda. No mínimo três sondas devem apresentar uma diferença de metilação  $\geq 20\%$  (destacadas em verde). Posteriormente, a diferença de metilação atribuída ao gene entre paciente e grupo controle é obtida comparando-se a mediana do paciente (correspondente a mediana dos valores de beta para as sondas CpG a - CpG d) com a mediana do grupo controle (correspondente a mediana das medianas entre todos os indivíduos para as sondas CpG a - CpG d). Para um gene ser selecionado, a diferença de metilação deve ser  $\geq 40\%$ . No exemplo, o gene 1 não seria selecionado, pois não preenche o segundo critério (destaque em vermelho).

Dentre os genes selecionados, aqueles com ocorrência de metilação aberrante em mais de um paciente de melanoma tiveram seus níveis de metilação investigados em um grupo controle independente formado por 36 amostras de sangue periférico (dados de HM450K obtidos como colaboração com a Dra. Helena Brentani do Instituto de Psiquiatria, Escola de Medicina da Universidade de São Paulo), assim como em diferentes tecidos de indivíduos saudáveis utilizando dados disponíveis no banco público Gene Expression Omnibus (GSE48472).

### **3.3.2 Análise de metilação global do genoma em pacientes afetados por melanoma hereditário**

#### **3.3.2.1 Pacientes portadores de mutações em *CDKN2A***

Os pacientes de melanoma hereditário portadores de mutação no gene *CDKN2A* (n=8, **Quadro 1**) tiveram seu perfil de metilação de DNA comparado aos respectivos perfis de pacientes de melanoma esporádico (n=8, pacientes com histórico de melanoma esporádico, sem tumor no momento da coleta de sangue, ver **Quadro 3**) e controles (n=8, C1 a C8 na **Quadro 4**). Para esta análise, os valores de beta foram pré-processados e normalizados utilizando o ambiente e linguagem R, com auxílio da Dra. Helena Brentani (Instituto de Psiquiatria, Escola de Medicina da Universidade de São Paulo), seu aluno de mestrado Henrique Vieira (Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo) e Dra. Tatiane Rodrigues (Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo). Foram excluídas sondas sem valor de beta para qualquer amostra, com *p*-valor de detecção >0,01 ou mapeadas nos cromossomos sexuais; a correção do desvio de distribuição dos valores de metilação detectados pelas sondas Infinium II em relação

às sondas Infinium I foi realizada de acordo com o proposto por TOULEIMAT e TOST (2012).

Para identificar possíveis diferenças de metilação entre controles, pacientes portadores de mutação em *CDKN2A* e pacientes de melanoma esporádico, foi utilizado o teste estatístico SAM (*Significance Analysis of Microarrays*). O teste SAM foi realizado utilizando os valores de beta das sondas com maior desvio padrão (top 1%) entre os três grupos analisados, de acordo com os seguintes parâmetros: teste multi-classes,  $\delta = 0.5$ , 100 permutações, percentil 90 do FDR = 0.49%. Este estudo foi em parte baseado no desenho experimental apresentado por GAO et al. (2013) em um estudo sobre meningioma.

Foi também comparado o perfil de metilação do grupo de pacientes portadores de mutação em *CDKN2A* com o perfil do grupo controle. Inicialmente, foi obtida a diferença de metilação (delta-beta) para cada CpG interrogado entre os dois grupos, subtraindo-se a média de metilação dos pacientes mutados da média de metilação dos controles. Foram então recuperados os valores de metilação para aqueles CpGs cujo delta-beta fosse  $\geq$  ou  $\leq$  20%, ou seja, apenas CpGs com no mínimo de 20% de diferença de metilação entre pacientes mutados e controles foram selecionados. Os valores de metilação dos CpGs selecionados foram submetidos à análise estatística através do *Rank Products* (RP). O RP foi realizado utilizando-se os seguintes parâmetros: teste de duas classes, com 100 permutações e FDR de 10%. A validação técnica de um dos CpGs identificados como diferencialmente metilados (cg00631877, mapeado no gene *PLXNC1*) foi realizada pela técnica de pirosequenciamento. Posteriormente, os níveis de metilação deste sítio detectados na



plataforma HM450K e no pirosequenciamento foram comparados utilizando o coeficiente de correlação de Spearman.

*Clusters* hierárquicos não supervisionados foram construídos utilizando os valores de beta dos CpGs identificados como diferencialmente metilados nas análises SAM e RP com os seguintes parâmetros: distância euclidiana e agrupamento pela média.

Informações sobre os CpGs diferencialmente metilados foram recuperadas dos dados disponíveis no banco público Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), sob o número GSE42409 (PRICE et al. 2013), o qual fornece SNPs e sequências repetitivas mapeados nas regiões de alinhamento das sondas da plataforma HM450K. A fim de considerar o efeito da heterogeneidade da população sanguínea nas diferenças dos níveis de metilação detectados, comparamos os CpGs candidatos com os dados de JAFFE e IRIZARRY (2014), que informam sondas cujo padrão de metilação pode refletir diferenças na proporção de células sanguíneas.

As análises SAM, RP, correlação de Spearman e a construção dos *clusters* hierárquicos foram realizadas com auxílio do programa MeV (MultiExperiment Viewer, versão 4.4.1).

### **3.3.2.2 Pacientes sem mutações nos genes *CDKN2A* e *CDK4***

O grupo de pacientes de melanoma hereditário negativos quanto a mutações nos genes *CDKN2A* e *CDK4* (n=19, **Quadro 2**) teve o perfil de metilação de DNA comparado ao respectivos perfis do grupo de melanoma esporádico (n=12, **Quadro 3**) e controles (n=12, **Quadro 4**).

Para esta análise, os dados brutos do *microarray* HM450K foram submetidos ao programa RnBeads (ASSENOV et al. 2014) e também analisados através de comandos empregados no *software* R desenvolvidos pela Dra. Jordana Bell e sua aluna de doutorado Leonie Ross (King's College, Londres). Todos os procedimentos de bioinformática foram realizados com auxílio do Dr. Rodrigo Ramalho (CIPE, A.C. Camargo Cancer Center).

No *software* RnBeads, os dados passaram por uma primeira análise de qualidade e pré-processamento, onde foram (a) confirmados os gêneros das amostras, (b) verificado se havia proximidade genética entre os indivíduos e (c) removidas as seguintes sondas: alinhadas em região com SNP, mapeadas em cromossomos sexuais, com *p*-valor de detecção  $\geq 0,05$ , ou com múltiplos alinhamentos no genoma humano (CHEN et al. 2013). Posteriormente, o RnBeads normalizou os dados utilizando o pacote methylumi para extração de ruído (TRICHE et al. 2013) e o método BMIQ para correção dos desvios relacionados às sondas Illumina tipo I e II (TESCHENDORFF et al. 2013). Na segunda etapa de controle de qualidade, foram aplicados comandos no *software* R, onde para cada amostra foram verificados (a) a distribuição dos valores de beta e (b) os níveis de metilação em regiões diferencialmente metiladas associadas a genes sujeitos ao *imprinting* genômico.

Com a finalidade de verificar a existência de covariáveis, foi realizada análise de componente principal (PCA- *Principal Component Analysis*) utilizando comandos no *software* R. Informações sobre *chip*, posição das amostras no *chip*, dia em que foi realizado o experimento, estimativa da proporção de células sanguíneas (obtida com o pacote FlowSorted.Blood.450k (JAFFE e IRIZARRY 2014)), idade, gênero e presença de melanoma no momento da coleta do sangue foram considerados nesta

análise. A análise de PCA foi realizada investigando-se até 10 principais componentes e aqueles associados às maiores porcentagens de variância explicada foram considerados para correção. Posteriormente, foi investigada a correlação entre as proporções dos diferentes tipos de células sanguíneas também utilizando comandos no *software* R.

Por fim, a correção das covariáveis e a análise de metilação diferencial para cada sítio CpG ou para regiões genômicas (gene, promotor, ilha CpG e regiões de 5 Kb) foram realizadas no RnBeads, utilizando modelo linear (limma). Nesta análise estatística, os valores de beta foram transformados em *M-value* [ $M = \log_2(\beta/1-\beta)$ ], pois este valor apresenta variância constante - o que é importante por ser uma premissa de vários testes estatísticos (DU et al. 2010). Além disso, a análise utilizando *M-value* é recomendada para grupos compostos por número pequeno de amostras (ZHUANG et al. 2012). O efeito da correção de covariáveis nos valores de *p* foi verificado através de QQ-plot, obtido com comandos no *software* R.

Os valores de metilação correspondentes aos sítios CpG diferencialmente metilados foram utilizados na construção de *cluster* hierárquico não supervisionado com o intuito de investigar se estes sítios poderiam ser classificadores dos grupos estudados. Esta análise foi realizada no *software* MeV (versão 4.4.1) utilizando-se os seguintes parâmetros: distância euclidiana, agrupamento pela média e *bootstrap* com 100 iterações (as cores indicam uma estimativa da confiança do agrupamento obtido - preto: 100%, cinza: 90-100%, azul: 80-90%, verde: 70-80%, amarelo: 60-70%, laranja: 50-60%, rosa escuro: 0-50%, rosa claro: sem suporte).

### 3.3.3 Anotação de genes identificados como diferencialmente metilados

A anotação funcional de genes candidatos oriundos da análise detalhada nos itens 3.3.2.1 e 4.7.1 foi realizada utilizando o *software* Ingenuity Pathway Analysis (IPA), o qual possibilita identificar funções biológicas, redes gênicas e vias canônicas significativamente enriquecidas entre os genes candidatos. A análise com IPA foi realizada com auxílio do Dr. Fabio Marchi (CIPE, A.C. Camargo Cancer Center). A anotação dos genes candidatos provenientes de outras análises foram realizadas (a) no UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>), utilizando dados do DGV (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) e ENCODE (<https://www.encodeproject.org/>), e (b) no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), com diferentes bancos de dados: Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>), UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene/>) e Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Dados referentes à frequência de alterações (mutação, variação no número de cópias e expressão gênica aberrante) afetando os genes identificados como diferencialmente metilados nas diferentes análises foram obtidos utilizando-se a ferramenta cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>); nesta análise *in silico* foram consultados os dados de 91 estudos de diferentes tipos de câncer e de 278 melanomas cutâneos disponibilizados pelo TCGA (*The Cancer Genome Atlas*, disponível em <http://cancergenome.nih.gov/>).

### 3.4 PIROSEQUENCIAMENTO

Um total de 40-60ng de DNA convertido com bissulfito de sódio (EZ DNA Methylation kit, Zymo Research) foi amplificado utilizando PyroMark PCR Kit (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante. Para estudo de metilação da sequência *LINE-1* e do promotor de *CDKN2A*, foram utilizados os *primers* comerciais PyroMark Q96 CpG LINE-1 (Qiagen) e PyroMark Q96 CpG p16 (Qiagen), respectivamente. Para os genes *PLXNC1* e *VTRNA2-1* foram desenhados *primers* manualmente (ver item 3.5.1). O produto amplificado foi ligado à sefarose-estreptavidina (Streptavidin Sepharose High Performance, GE) e preparado para pirosequenciamento na estação PyroMark Q96 Vacuum Workstation, na qual foi precipitado com etanol 70% (Merck), desnaturado com PyroMark Denaturation Solution (Qiagen) e lavado com PyroMark Washing Buffer (Qiagen). As amostras foram então aneladas ao *primer* de sequenciamento e submetidas ao pirosequenciamento no sistema PyroMark Q96 ID (Qiagen), utilizando-se os reagentes PyroMark Gold Q96 (Qiagen). O *software* PyroMark CpG (versão 1.0.11) foi utilizado durante o pirosequenciamento e também para posterior análise de porcentagem de metilação. O nível de metilação de cada CpG foi quantificado com base no SNP gerado na posição da citosina após conversão de bissulfito de sódio (citosinas metiladas permanecem como citosinas, enquanto citosinas não metiladas são convertidas em timina). Posteriormente, todos os CpGs analisados no fragmento foram utilizados para cálculo da média da porcentagem de metilação, que corresponde ao nível de metilação do *locus* analisado.

Os ensaios para *LINE-1* e *VTRNA2-1* foram realizados em duplicata e amostras com coeficiente de variação [coeficiente de variação = (desvio padrão/média)] maior que 10% para qualquer CpG investigado foram excluídas das análises estatísticas. Os níveis de metilação apresentados para estes dois *loci* correspondem à média dos dois experimentos.

### 3.4.1 Análise estatística

Diferenças nos níveis de metilação dos *loci* estudados e sua associação com variáveis clínicas foram testadas quanto à significância através dos testes Mann-Whitney, Kruskal-Wallis com teste de comparações múltiplas de Dunn, teste de Fisher, ou teste t pareado, de acordo com o apropriado. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa GraphPad PRISM (versão 5).

Os níveis de metilação do DNA em *LINE-1* e *VTRNA2-1* foram avaliados como variáveis contínuas e categóricas. Para *LINE-1*, a categorização foi feita com base na mediana do grupo controle: hipometilado para níveis de metilação menores que do grupo controle e hipermetilado para nível de metilação igual ou maior que controles (SIGALOTTI et al. 2011). Os níveis de metilação em *VTRNA2-1* foram categorizados com base no trabalho de TREPPENDAHL et al. (2012): hipometilado para níveis de metilação menores que 10%, e hipermetilado para níveis maiores que 10%.

## 3.5 OUTROS PROCEDIMENTOS

### 3.5.1 Desenho de *primers*

Foram desenhados *primers* para: (a) genotipagem de DNA genômico e (b) análise de metilação do DNA por pirosequenciamento (**Quadro 5**).

Para genotipagem do DNA genômico, as sequências que flanqueiam os SNPs de interesse (500 pb à 5'UTR e 3'UTR) foram obtidas no banco de dados do UCSC (GRCh37/hg19). Posteriormente, os *primers* foram desenhados com auxílio da ferramenta Primer-Blast do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) utilizando-se parâmetros padrão. A qualidade dos *primers* foi verificada usando a ferramenta OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>), e a especificidade foi testada *in silico* no UCSC (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>).

Para pirosequenciamento, as regiões que flanqueiam o CpG de interesse (400 pb à 5'UTR e 3'UTR) foram obtidas no banco de dados do UCSC (GRCh37/hg19) e posteriormente convertidas manualmente em sequências correspondentes ao pós-tratamento com bissulfito (todas as citosinas não seguidas por guaninas foram substituídas por timina). Conjuntos de *primers* foram desenhados manualmente, de acordo com os seguintes parâmetros sugeridos pela Dra. Hellen Kuasne (CIPE, A.C. Camargo Cancer Center): fragmento a ser amplificado <400 pb, *primers* F (*foward*) e R (*reverse*) com aproximadamente o mesmo conteúdo CG (em torno de 50-60%), ausência de  $\geq 3$  citosinas ou guaninas nos últimos cinco nucleotídeos das regiões 5' e 3' dos *primers* F e R, respectivamente. A qualidade dos

*primers* foi verificada usando a ferramenta OligoAnalyzer e a especificidade foi testada *in silico* utilizando a ferramenta BiSearch (<http://bisearch.enzim.hu/>).

**Quadro 5** - *Primers* desenhados para análise de metilação por pirosequenciamento e genotipagem de SNPs.

Procedimento	Gene	<i>Primers</i> (5'-3')	<i>Anneling</i> (°C)
Análise de metilação por pirosequenciamento	<i>PLXNC1</i>	F:[btn]AGGAGGTTGGTGGGTTAG	55
		R:CCACCAATTACCTCTTCC	
		Seq:TATACTCTAATATCA	-
	<i>VTRNA2-1</i>	F:TTAGTGGGTGGATTTTGTT	57
		R:[btn]ACCCCAACACAAAAATAAAC	
		Seq:AGTTTTTTTAGGATA	-
Genotipagem de SNP	<i>DFNA5</i>	F:AAGTCCATGGGAACAGAGCC	61
		R:TCTGTGGAATGCAGAGCTGG	
	<i>MIB2</i>	F:CAGAAGAGTGACCCAGAGCA	61
		R:TGGTTCTTGGTGTCCACCTG	
	<i>PLXNC1</i>	F:GCTGCTGAGGCAGTAGAGACAG	60
		R:GGTGTACAGAAGGACAGGCAG	
	<i>TGFBR3</i>	F:ACGGTGTCGGGACAAGATTC	61
		R:GGTTCAGCTGATGCCAAAGC	

F: *primer forward*; R: *primer reverse*; Seq: *primer* de sequenciamento; btn: biotina.

### 3.5.2 Genotipagem de DNA genômico

Cerca de 60ng de DNA foram submetidos à reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sob as seguintes condições: 1X GoTaq Green Master Mix 2X (Promega), 0,2µM de cada *primer* e água livre de nuclease em um volume final de reação de 25µl. As condições de ciclagem foram: 95°C por 2 minutos, 35X [95°C 30s, temperatura de *annealing* 30s, 72°C 30s] e 72°C por 5 minutos. Para verificar o sucesso da PCR, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese à 100V em solução 1X TBE (Invitrogen) por cerca de 20 minutos, utilizando gel de agarose



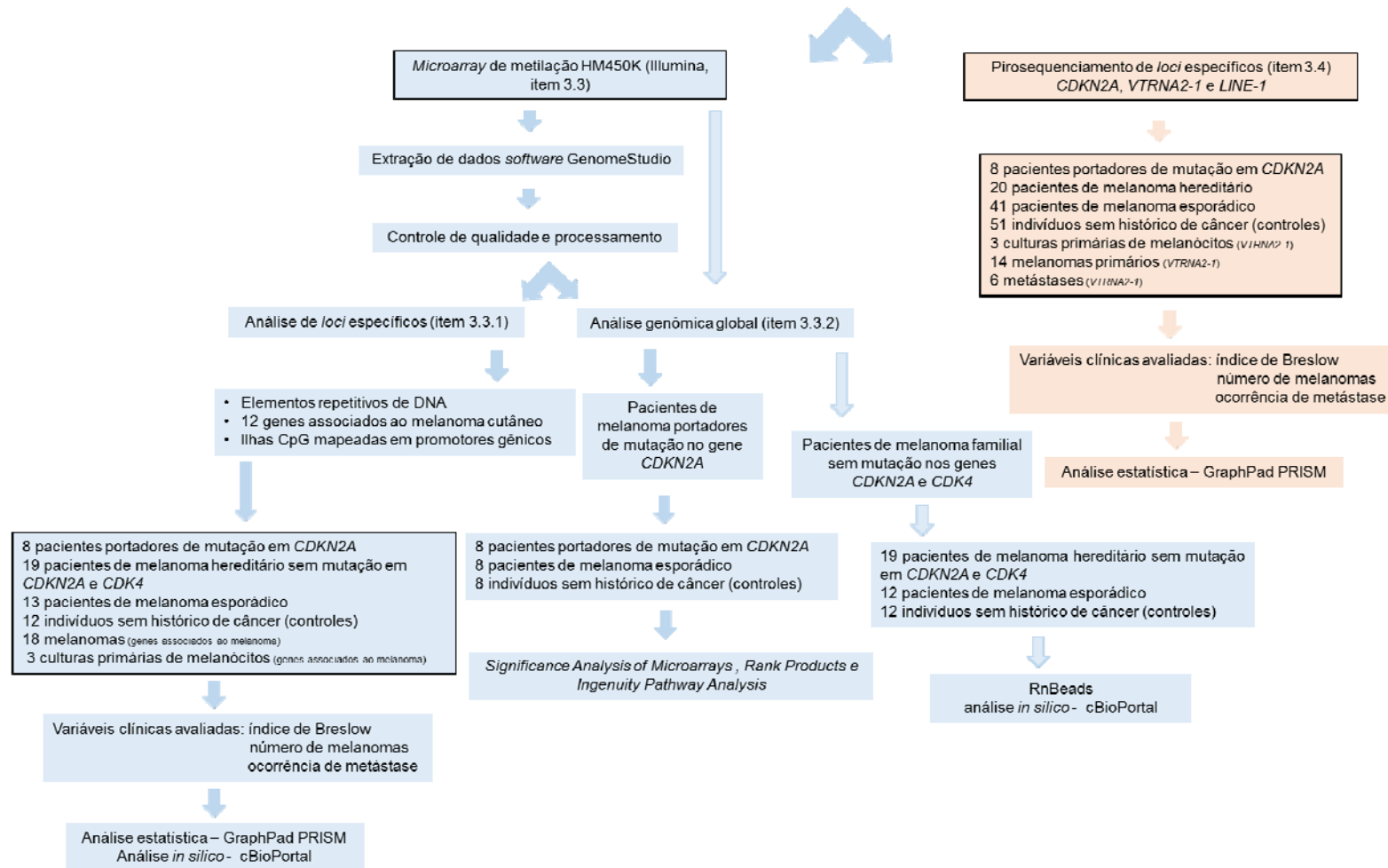
1% (Invitrogen) corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), sendo posteriormente observados sob luz ultravioleta.

Posteriormente, os produtos da PCR foram purificados utilizando a enzima Illustra ExoStar 1-step (GE) de acordo com as especificações do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada com 2-5 $\mu$ l do produto purificado e BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). A eletroforese em capilar foi realizada em sequenciador 3130xl Genetic Analyzer, de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems).

### **3.6 RESUMO DO DESENHO EXPERIMENTAL**

A **Figura 6** ilustra o resumo do desenho experimental desta tese de doutoramento.

**HIPÓTESE:** Pacientes de melanoma familiar e/ou esporádico têm alteração no perfil de metilação de DNA em comparação a indivíduos sem histórico de câncer



**Figura 6** - Fluxograma representativo do desenho experimental desta tese de doutoramento.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

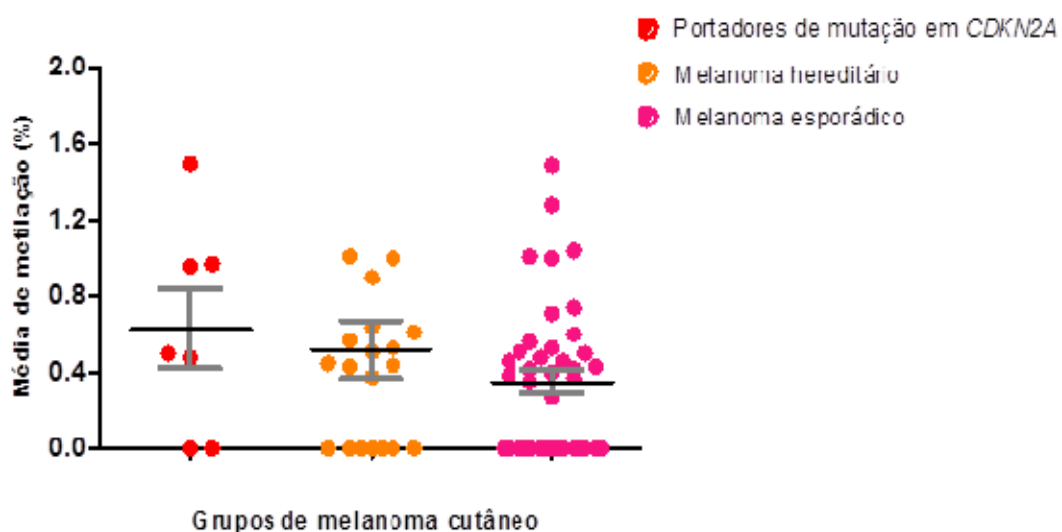
### 4.1 METILAÇÃO NO GENE *CDKN2A* EM PACIENTES DE MELANOMA

*CDKN2A* é considerado um importante gene no desenvolvimento do melanoma cutâneo, encontrando-se deletado ou metilado em sua região promotora em 40-50% (HODIS et al. 2012; YOUNG et al. 2014) e 4-25% (KOSTAKI et al. 2014; YOUNG et al. 2014) dos casos, respectivamente. Assim como ocorre em outras síndromes de câncer hereditário, nas quais os genes relevantes para determinado tipo tumoral são também associados à sua suscetibilidade (RAHMAN 2014), mutações germinativas afetando o gene *CDKN2A* (em geral, mutação pontual) são a principal causa genética de melanoma cutâneo no contexto familiar. Entretanto, cerca de 60% dos casos de melanoma familiar não apresentam mutação patogênica neste gene (AOUDE et al. 2015). Apenas dois trabalhos prévios investigaram a metilação na região promotora de *CDKN2A* como um mecanismo alternativo de inativação transcricional em famílias acometidas por melanoma cutâneo, mas a hipermetilação de *CDKN2A* não foi detectada (ERLANDSON et al. 2008; VAN DOORN et al. 2009). No presente estudo, investigamos a possibilidade deste evento em nossa casuística de pacientes de melanoma familiar, assim como em pacientes de melanoma esporádico.

Os níveis de metilação em *CDKN2A*, mais especificamente na região que codifica p16, foram verificados através da técnica de pirosequenciamento. A

porcentagem de metilação apresentada corresponde à média de metilação de sete sítios CpG localizados nas posições +148 a +174 (ENSG00000147889, identificação de *CDKN2A* no Ensembl- <http://www.ensembl.org/index.html>). Foram analisados 68 pacientes de melanoma (7 pacientes portadores de mutação em *CDKN2A*, 20 pacientes de melanoma familiar negativos para mutações em *CDKN2A* e 41 pacientes afetados por melanoma esporádico). Indivíduos da população geral, sem histórico de câncer (controles), não foram testados porque o padrão de metilação de *CDKN2A* é bem estabelecido, sendo o *locus* hipometilado (HYLAND et al. 2013).

Todos os pacientes analisados apresentam o *locus CDKN2A* hipometilado (**Figura 7**), semelhante ao descrito para indivíduos saudáveis (HYLAND et al. 2013). Entre os pacientes portadores de mutação em *CDKN2A*, a média de metilação foi de 0,63% (0% - 1,5%), para pacientes de melanoma hereditário a média foi de 0,52% (0% - 3%), e em pacientes de melanoma esporádico, 0,35% (0% - 1,5%). Estes dados mostram que nos pacientes analisados não há predisposição ao melanoma cutâneo relacionado à hipermetilação no principal gene de suscetibilidade descrito, *CDKN2A*, assim como relatado anteriormente (ERLANDSON et al. 2008; VAN DOORN et al. 2009). Estes dados foram publicados na revista científica BioMed Research International, 2015; 2015:376423 (Anexo 3).

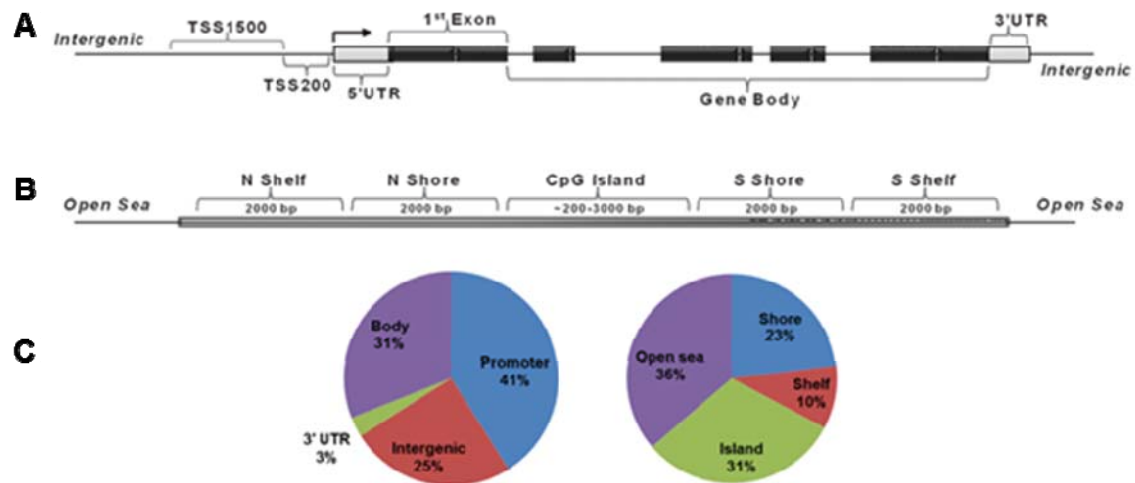


**Figura 7** - Níveis de metilação do gene *CDKN2A* na região codificadora de p16 em leucócitos de diferentes grupos de pacientes de melanoma cutâneo. O promotor do transcrito associado à proteína p16 foi analisado por pirosequenciamento em diferentes grupos de pacientes de melanoma (portadores de mutação em *CDKN2A*, n=7; pacientes de melanoma hereditário negativos para mutações em *CDKN2A*, n=20; pacientes de melanoma esporádico, n=41). O nível de metilação corresponde à média de sete sítios CpG investigados com PyroMark Q96 CpG 16 (Qiagen). Para cada grupo de pacientes de melanoma, são mostrados os níveis individuais de metilação (pontos coloridos), a média e o erro padrão da média (barras cinza).

## 4.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A PLATAFORMA HM450K

Para delinear o perfil global de metilação do DNA, utilizamos a plataforma HM450K, a qual possibilita a análise de >450.000 dinucleotídeos CpGs, cobrindo 99% das sequências gênicas RefSeq com uma média de 17 sondas por região gênica (SANDOVAL et al. 2011). No total, a plataforma contempla a investigação de 482.421 sítios CpG, que podem ser classificados em diferentes categorias funcionais, tanto com relação a sequências gênicas quanto a ilhas CpG (**Figura 8**). Além das sondas que interrogam o nível de metilação de sítios CpG, há 3.091 sondas que

examinam metilação em citosinas fora do contexto de dinucleotídeo CpG e 65 sondas para análise de SNP.

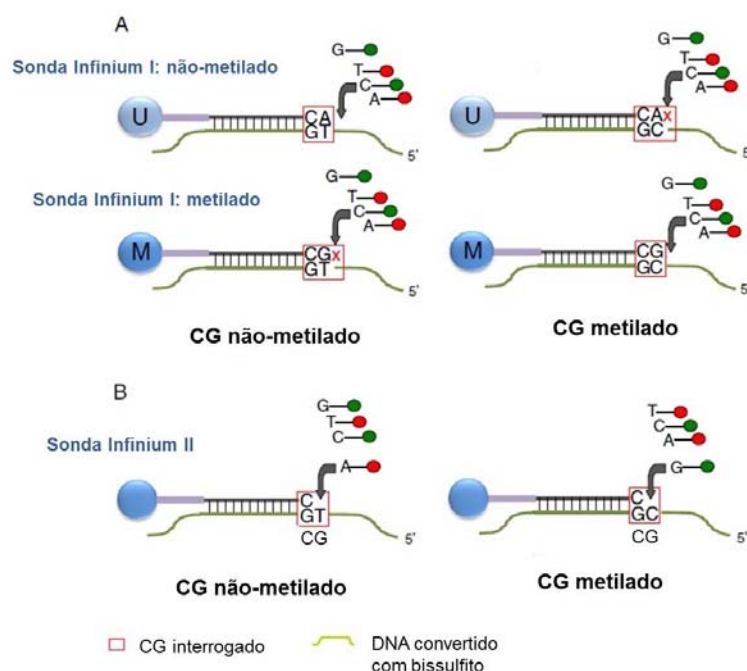


Fonte: Adaptado de RÖNN et al. (2013).

**Figura 8** - Distribuição no genoma dos sítios CpG analisados na plataforma HM450K (Illumina). **(A)** Os sítios CpG podem ser classificados em regiões funcionais de acordo com sua localização em relação a um determinado gene: TSS1500, TSS200, 5'UTR, 1<sup>st</sup> exon, *gene body*, 3'UTR e *intergenic*. **(B)** Outra possível classificação dos sítios CpG decorre do conteúdo de CpG e distância em relação a ilhas CpG: CpG *island*, *shore* e *shelf*. **(C)** Os gráficos mostram a porcentagem de sítios CpG da plataforma em cada uma das categorias descritas acima em **A** e **B**, sendo que a categoria *promoter* (região de promotor gênico) engloba: TSS1500, TSS200, 5'UTR e 1<sup>st</sup> Exon.

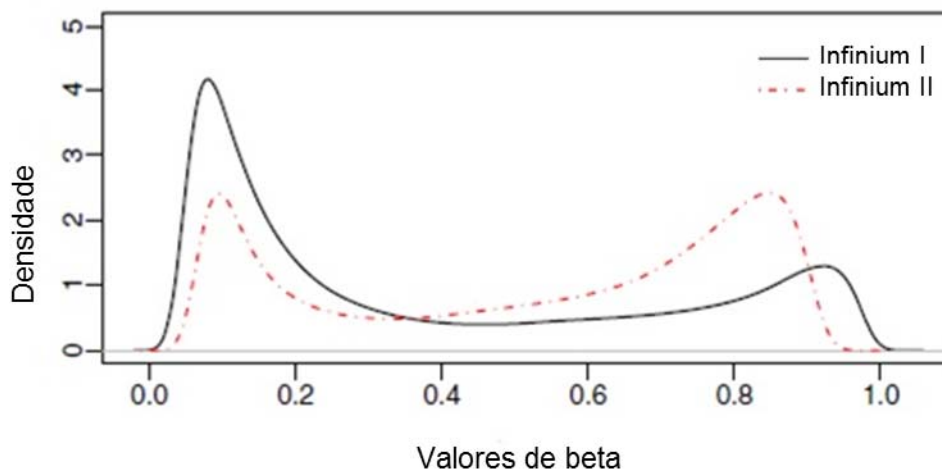
Dois tipos distintos de sondas compõem a plataforma HM450K, ambas com 50-mers: o tipo Infinium I, categoria em que cada posição CpG tem o nível de metilação avaliado por duas sondas diferentes, sendo uma sonda específica para CpG metilado e outra para CpG não metilado; e o tipo Infinium II, que apresenta apenas uma sonda para cada CpG, na qual o status de metilação do CpG é interrogado pela extensão da base subsequente (**Figura 9**). Cerca de 2/3 das sondas da plataforma HM450K são do tipo Infinium II. Dentro da sequência de 50-mers, é possível que

existam outros CpGs e o desenho da Infinium I parte do pressuposto de que CpGs próximos possuem níveis semelhantes de metilação (ECKHARDT et al. 2006); desta maneira há apenas um tipo de sonda para cada possibilidade na Infinium I: CpGs metilados ou CpGs não metilados. Já para a Infinium II, cada *bead* apresenta uma combinação de sondas, contemplando todas as combinações possíveis dos CpGs dentro da sequência de *50-mers*. Como decorrência das diferentes químicas utilizadas, as sondas do tipo Infinium II apresentam menor reprodutibilidade e são menos sensíveis em detectar valores extremos de metilação (**Figura 10**).



**Fonte:** Adaptado de BIBIKOVA et al. (2011).

**Figura 9** - Tipos de sondas presentes na plataforma HM450K (Illumina). (A) Sondas correspondentes à tecnologia Infinium I são de dois tipos: um específico para CpG não metilado e outro, para CpG metilado. Uma sonda específica para CpG não metilado não anela corretamente a uma sequência de CpG metilado e vice-versa; assim, a extensão do próximo nucleotídeo só ocorrerá quando o anelamento for correto, e então a hibridação poderá ser detectada. (B) Sondas da tecnologia Infinium II são desenhadas de maneira que a porção 3' da sonda interogue diretamente o status de metilação de um sítio CpG, por meio da incorporação de nucleotídeos marcados.



**Fonte:** Adaptado de PIDSLEY et al. (2013).

**Figura 10** - Espectro de detecção de valores de metilação de acordo com os dois diferentes tipos de sondas da plataforma HM450K (Illumina). Sondas do tipo Infinium II apresentam desvio na distribuição dos valores detectados de beta (níveis de metilação variando de 0 a 1: não metilado e metilado, respectivamente) quando comparadas às sondas Infinium I.

Informações sobre a qualidade dos dados gerados no *microarray* (como hibridização e extensão) podem ser obtidas por meio de sondas controle, utilizadas durante a normalização dos dados. Uma informação importante é disponibilizada pelas sondas de controle negativo, cujo sinal corresponde ao ruído do *microarray*. Para selecionar apenas sondas cujo sinal detectado é confiável, ou seja, encontra-se acima do *background*, este ruído é comparado ao sinal de cada CpG, de maneira a se obter um *p*-valor de detecção. Posteriormente, selecionam-se apenas sondas cujo *p*-valor de detecção esteja abaixo do limite escolhido. Em nossas análises, escolhemos diferentes limites para o *p*-valor de detecção; contudo, todas as amostras incluídas nas análises geraram dados que apresentam >98% de sondas com *p*-valor de detecção <0,001.



Não há um consenso na literatura científica acerca do melhor método para análise dos dados gerados pelo *microarray* HM450K e diversas metodologias já foram propostas (MORRIS e BECK 2015). Contudo, é fundamental que haja correção do desvio de distribuição dos valores de beta detectados entre as sondas Infinium I e Infinium II. Esta correção garante maior sensibilidade, permitindo detecção de pequenas diferenças nos níveis de metilação (PIDSLEY et al. 2013). No presente trabalho, foram utilizadas diferentes abordagens para análise dos dados obtidos com a plataforma HM450K, sempre realizando a correção Infinium I/II. De uma maneira geral, nossas análises acompanharam as questões que foram sendo relatadas na literatura científica ao longo do período de desenvolvimento de nosso projeto.

#### **4.3 METILAÇÃO EM ELEMENTOS REPETITIVOS DE DNA E ASSOCIAÇÃO COM VARIÁVEIS CLÍNICAS EM PACIENTES DE MELANOMA**

O elemento repetitivo *LINE-1* tem sido usado como biomarcador para análise de metilação global em vários estudos sobre câncer (BRENNAN e FLANAGAN 2012; WOO e KIM 2012). O padrão de metilação de *LINE-1* em sangue periférico tem sido associado com risco de câncer, porém o status de metilação neste *locus* varia em diferentes tipos de tumor. Hipometilação de *LINE-1* foi associada a hepatocarcinoma (DI et al. 2011), câncer gástrico (HOU et al. 2010) e de bexiga (CASH et al. 2012), enquanto hipermetilação foi descrita em câncer renal (LIAO et al. 2011) e colorretal (WALTERS et al. 2013). Em melanoma, há apenas um estudo,

o qual não detectou diferenças nos níveis de metilação de *LINE-1* entre pacientes de melanoma e controles (HYLAND et al. 2013).

Nós investigamos por pirosequenciamento quatro sítios CpG mapeados na sequência do elemento *LINE-1*, nas posições de 331 a 305 (GenBank X58075, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/X58075>), em 69 pacientes afetados por melanoma e 51 controles. Após exclusão de amostras com coeficiente de variação maior que 10% entre as duplicatas experimentais, restaram 48 pacientes de melanoma e 42 controles.

A maioria dos pacientes de melanoma são do sexo feminino e na faixa etária acima dos 40 anos de idade (**Tabela 1**). Trabalhos anteriores sugerem que os níveis de metilação em *LINE-1* seriam afetados pelo sexo, sendo mais elevados em homens (EL-MAARRI et al. 2011; HYLAND et al. 2013). Em nossas análises, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de metilação de *LINE-1* entre homens e mulheres (controles  $p= 0,06$ ; pacientes  $p = 0,17$ ; teste de Mann-Whitney) ou entre as categorias etárias estudadas ( $<40$  ou  $\geq 40$  anos; controles  $p= 0,99$ ; pacientes  $p= 0,17$ ; teste de Mann-Whitney). Estas duas características (gênero e idade) também não estão associadas aos níveis de metilação em *LINE-1* comparando-se pacientes e controles (gênero  $p= 1,00$ ; idade  $p= 0,38$ ; teste de Fisher).

**Tabela 1** - Dados gerais de pacientes afetados por melanoma cutâneo e indivíduos sem histórico de câncer (controles) analisados quanto aos níveis de metilação em *LINE-1*.

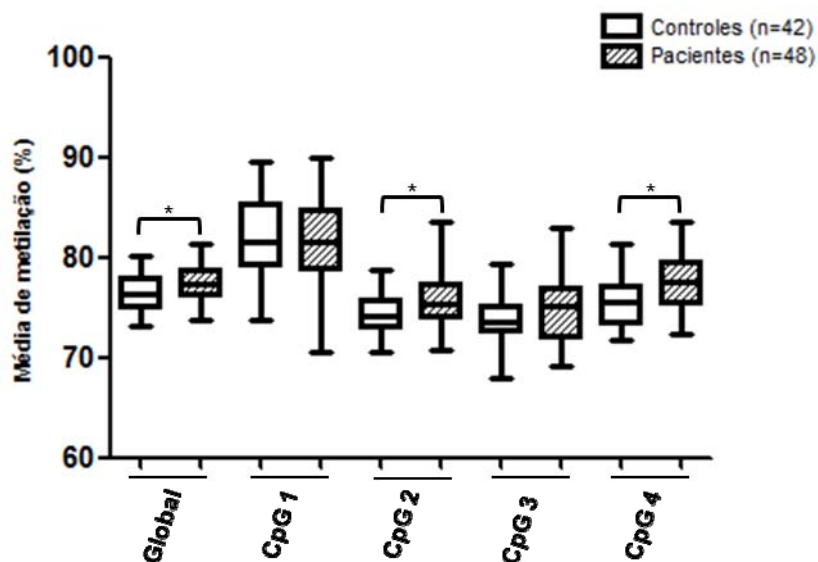
<b>Variáveis</b>	<b>Pacientes</b> N (%)	<b>Controles</b> N (%)
<b>Gênero</b>		
feminino	25 (52,0%)	21 (50,0%)
masculino	23 (47,9%)	21 (50,0%)
<b>Idade</b>		
< 40	14 (29,2%)	16 (38,0%)
≥ 40	34 (71,0%)	26 (61,9%)

N= número de indivíduos; %= porcentagem de indivíduos em relação ao total.

Os níveis de metilação em *LINE-1* foram variáveis para os quatro CpGs analisados, tanto em pacientes (75% a 81%;  $p < 0,01$ ; teste de Kruskal-Wallis) quanto em controles (74% a 82%;  $p < 0,01$ ; teste de Kruskal-Wallis), sendo que o CpG na posição 1 apresentou elevados níveis de metilação comparado aos outros três CpGs (**Figura 11**). Pacientes apresentaram maiores níveis de metilação global de *LINE-1* e também nas posições 2 e 4 de *LINE-1* (**Figura 11**) em relação ao grupo controle.

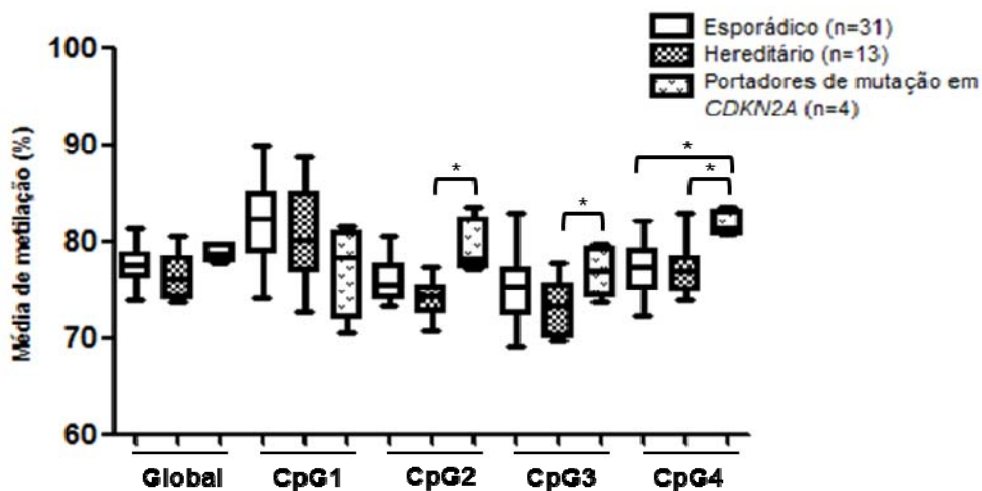
HYLAND et al. (2013) analisaram esta mesma região de *LINE-1*, porém não encontraram diferenças significativas entre pacientes e controles. Esta divergência pode ter ocorrido devido a diferenças nas casuísticas utilizadas em cada trabalho, visto que enquanto HYLAND et al. (2013) estudaram apenas famílias com suscetibilidade a melanoma cutâneo (critério de dois familiares de primeiro grau com melanoma), nossa casuística engloba diferentes grupos de melanoma cutâneo, inclusive casos de melanoma esporádico e critério diferente de melanoma familiar. Adicionalmente, diferenças na composição de células sanguíneas entre nossa casuística e a de HYLAND et al. (2013) podem ter impactado os níveis de metilação detectados (JAFPE e IRIZARRY 2014), contribuindo para esta divergência, o que

reforça a importância de se considerar a heterogeneidade sanguínea também neste tipo de análise e não somente em estudos globais de metilação do DNA.



**Figura 11** - Níveis de metilação global e sítio-específica de *LINE-1* em pacientes de melanoma cutâneo e indivíduos sem histórico de câncer (controles). Os níveis de metilação foram medidos por pirosequenciamento em quatro sítios CpGs de *LINE-1* (posições 331 a 305, GenBank X58075); a metilação global corresponde à média destes quatro CpGs. Os níveis globais e específicos de metilação foram comparados entre pacientes de melanoma cutâneo e controles (teste de Mann-Whitney); pacientes apresentaram elevados níveis de metilação global e nas posições 2 e 4 ( $*p<0,01$ ). As barras de erro padrão da média referem-se às duas réplicas experimentais.

Dentre os grupos de pacientes de melanoma, pacientes portadores de mutação em *CDKN2A* apresentaram diferença estatisticamente significativa nos níveis de metilação das posições 2, 3 e 4 de *LINE-1* (**Figura 12**). HYLAND et al. (2013) também investigaram o perfil de metilação em *LINE-1* em pacientes portadores de mutação em *CDKN2A*, porém não encontraram diferenças em relação aos demais pacientes de melanoma.



**Figura 12** - Níveis de metilação global e sítio-específica de *LINE-1* em pacientes de melanoma cutâneo. Os níveis de metilação foram medidos por pirosequenciamento em quatro sítios CpGs de *LINE-1* (posições 331 a 305, GenBank X58075). Pacientes de melanoma portadores de mutação em *CDKN2A* apresentam diferenças nos níveis de metilação nas posições 2, 3 e 4. Teste de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas de Dunn.  $*p < 0,05$ . As barras de erro padrão da média referem-se às duas réplicas experimentais.

Posteriormente, os níveis de metilação em *LINE-1* foram categorizados em hipermetilado ou hipometilado com base na mediana do grupo controle, como descrito no trabalho de SIGALOTTI et al. (2011). Na comparação entre pacientes e controles (**Tabela 2**), foi encontrada associação entre o status global de metilação em *LINE-1* e a ocorrência de melanoma, com número maior de amostras hipermetiladas entre os pacientes (72,9%).

**Tabela 2** - Status de metilação global e sítio-específica de *LINE-1* em pacientes de melanoma cutâneo e indivíduos sem histórico de câncer (controles).

Status de metilação	Pacientes N (%)	Controles N (%)
<b>Global</b>		
hipometilado	13 (27,1%)	21 (50,0%)
hipermetilado	35 (72,9%)	21 (50,0%)
<i>p-value</i>		<b>0,03</b>
<b>CpG1</b>		
hipometilado	24 (51,0%)	19 (50,0%)
hipermetilado	23 (49,0%)	19 (50,0%)
<i>p-value</i>		1
<b>CpG2</b>		
hipometilado	13 (27,6%)	19 (46,34%)
hipermetilado	34 (72,3%)	22(53,66%)
<i>p-value</i>		0,08
<b>CpG3</b>		
hipometilado	16 (34,0%)	18 (50,0%)
hipermetilado	31 (66,0%)	18 (50,0%)
<i>p-value</i>		0,18
<b>CpG4</b>		
hipometilado	13 (28,26%)	20 (48,78%)
hipermetilado	33 (71,74%)	21 (51,22%)
<i>p-value</i>		0,08

N= número de indivíduos; %= porcentagem do grupo em relação ao total; hipometilado: valor de metilação < mediana dos níveis de metilação de *LINE-1* nos controles; hipermetilado: valor de metilação  $\geq$  mediana dos controles (valores de mediana do grupo controle: metilação global= 76,26%; CpG 1= 81,50%; CpG 2= 74,20%; CpG 3= 73,49%; CpG 4= 75,59%); teste de Fisher, *p-value* <0,05 em negrito.

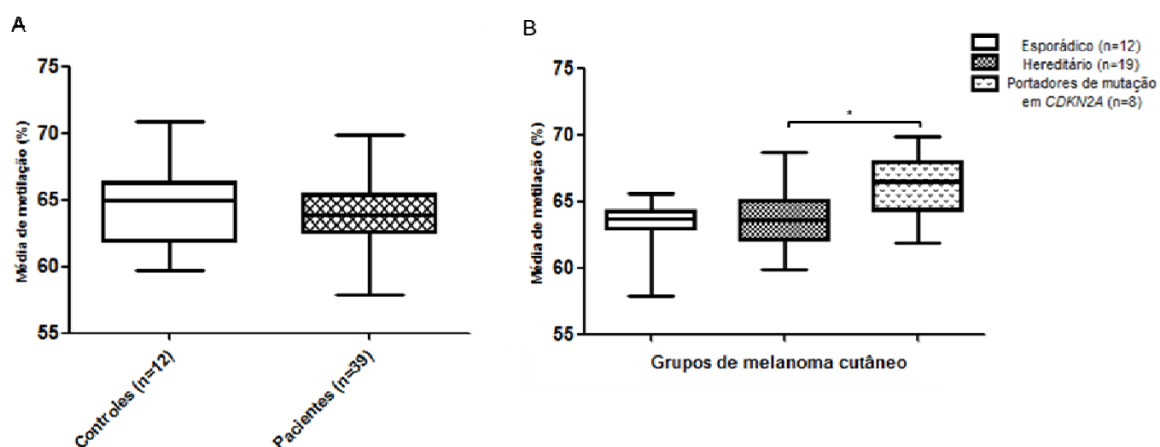
Para investigar a relevância da metilação em *LINE-1* como biomarcador, analisamos sua associação com característica clínicas dos pacientes (**Tabela 3**). Os níveis de metilação no CpG de posição 1 foram estatisticamente associados à ocorrência de metástase. Vale destacar que a presença ou não de mutação em *CDKN2A* não foi estatisticamente associada a qualquer característica clínica analisada (número de melanoma  $p= 0,57$ ; índice de Breslow  $p= 1,00$ ; metástase  $p= 0,56$ ); contudo, entre os portadores de mutação em *CDKN2A*, apenas um paciente apresentou melanoma com índice de Breslow >2 mm e não foram detectadas metástases neste grupo. Portanto, nossos dados sugerem que o status de mutação em *CDKN2A* não impactou a associação entre os níveis de metilação em *LINE-1* e ocorrência de metástase.

**Tabela 3** - Níveis de metilação global e sítio específico no elemento *LINE-1* e associação com características clínicas dos pacientes de melanoma cutâneo.

	Global		CpG1		CpG2		CpG3		CpG4	
	N (%)	média (DP)	N (%)	média (DP)	N (%)	média (DP)	N (%)	média (DP)	N (%)	média (DP)
<b>Casuística</b>										
pacientes	48 (53,4%)	77 (2,1)	47 (55,3%)	81 (4,8)	47 (53,4%)	76 (2,3)	47 (56,6%)	74 (2,3)	46 (52,9%)	78 (2,9)
controles	42 (46,6%)	76 (1,8)	38 (44,7%)	82 (1,8)	41 (46,6%)	77 (1,8)	36 (43,4%)	75 (3,1)	41 (47,1%)	76 (2,4)
<i>p-value</i>		<b>0,03</b>		0,77		<b>0,01</b>		0,11		<b>&lt; 0,01</b>
<b>Grupos de melanoma</b>										
esporádico	31 (64,6%)	74 (1,9)	31 (65,9%)	82 (4,4)	30 (63,8%)	76 (1,9)	30 (63,8%)	75 (3,1)	30 (65,2%)	77 (2,7)
hereditário	13 (27,0%)	74 (2,4)	12 (25,5%)	81 (5,2)	13 (27,6%)	74 (1,9)	13 (27,6%)	73 (2,8)	12 (26,0%)	77 (2,5)
portadores de mutação em <i>CDKN2A</i>	4 (8,4%)	78 (1,0)	4 (8,5%)	77 (4,8)	4 (8,5%)	79 (2,9)	4 (8,5%)	77 (2,6)	4 (8,7%)	82 (1,3)
<i>p-value</i>		0,09		0,1		<b>&lt;0,01</b>		<b>0,05</b>		<b>0,01</b>
<b>Características clínicas</b>										
<i>número de melanomas</i>										
1	34 (70,8%)	77 (1,9)	34 (72,3%)	82 (4,3)	34 (72,3%)	76 (2,1)	34 (72,3%)	75 (3,2)	33 (71,7%)	78 (3,1)
> 1	14 (29,2%)	77 (2,4)	13 (27,6%)	80 (5,9)	13 (27,6%)	76 (3,0)	13 (27,6%)	74 (2,8)	13 (28,3%)	78 (2,2)
<i>p-value</i>		0,79		0,2		0,74		0,37		0,71
<i>Índice de Breslow*</i>										
< 2mm	35 (77,7%)	77 (2,0)	34 (77,3%)	81 (4,8)	34 (77,3%)	76 (1,8)	34 (77,3%)	75 (3,2)	33 (76,7%)	78 (3,0)
≥ 2mm	10 (22,3%)	78 (2,1)	10 (22,7%)	83 (4,9)	10 (22,7%)	76 (3,7)	10 (22,7%)	76 (2,1)	10 (23,2%)	78 (2,7)
<i>p-value</i>		0,13		0,15		0,79		0,16		0,81
<i>Metástase</i>										
não	32 (72,7%)	77 (2,1)	31 (72,1%)	80 (5,0)	31 (72,1%)	76 (2,4)	31 (72,1%)	75 (3,0)	30 (71,4%)	78 (2,8)
sim	12 (27,3%)	78 (2,2)	12 (27,9%)	84 (3,8)	12 (27,9%)	75 (2,6)	12 (27,9%)	74 (3,3)	12 (28,6%)	78 (2,2)
<i>p-value</i>		0,64		<b>0,02</b>		0,99		0,28		0,81

N= número de indivíduos; % porcentagem do grupo em relação ao total; DP= desvio padrão; \*Índice de Breslow do melanoma de maior estadiamento;  $p \leq 0,05$  em negrito (análise feita entre as médias de metilação das categorias analisadas).

Considerando estes resultados, levantamos a possibilidade de que os níveis de metilação de outros elementos repetitivos além de *LINE-1* poderiam estar associados ao melanoma cutâneo. Para testar esta hipótese, os níveis de metilação de 22.436 sítios CpG mapeados em elementos repetitivos do DNA (*LINE*, *SINE*, *LTR* e outros) foram recuperados de dados pré-processados do *microarray* de metilação HM450K de 39 pacientes de melanoma e 12 controles. Não foram detectadas diferenças significativas entre pacientes de melanoma e controles (**Figura 13A**). Contudo, há diferença estatisticamente significativa entre dois diferentes grupos de pacientes de melanoma: portadores de mutação em *CDKN2A* mostraram níveis de metilação significativamente mais elevados quando comparados a pacientes de melanoma hereditário sem mutações nos genes *CDKN2A* e *CDK4* (**Figura 13B**).



**Figura 13** - Níveis de metilação em elementos repetitivos de DNA em pacientes de melanoma cutâneo e indivíduos sem histórico de câncer (controles). Os níveis de metilação foram obtidos a partir de 22.436 sítios CpG mapeados em sequências repetitivas utilizando a plataforma HM450K (Illumina). (A) Não foram encontradas diferenças significativas entre pacientes e controles (teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). (B) Entre os grupos de pacientes de melanoma, há diferença estatisticamente significativa, na qual pacientes portadores de mutação em *CDKN2A* apresentam níveis mais elevados de metilação em relação a pacientes de melanoma hereditário sem mutações nos genes *CDKN2A* e *CDK4* (teste de Kruskal-Wallis,  $*p < 0.05$ ).



Em síntese, os dados obtidos neste estudo sugerem que pacientes de melanoma cutâneo teriam pequeno aumento, porém estatisticamente significativo, nos níveis de metilação em *LINE-1* em relação a indivíduos sem histórico de câncer (controles). Por outro lado, os níveis de metilação em elementos repetitivos de DNA (*LINE*, *SINE*, *LTR* e outros) avaliados em conjunto não diferem entre pacientes de melanoma e controles. Entre os grupos de melanoma estudados, portadores de mutação em *CDKN2A* apresentaram diferença significativa nos níveis de metilação em *LINE-1* e em outros elementos repetitivos comparados aos pacientes de melanoma hereditário sem mutação. Ainda, o nível de metilação no CpG de posição 1 em *LINE-1* (posição 331, GenBank X58075) foi associado à ocorrência de metástase. Futuros estudos em grupos maiores são necessários para avaliar a metilação em *LINE-1* em sangue periférico como biomarcador para metástase, assim como para confirmar se hipermetilação em *LINE-1* constitui risco para desenvolvimento de melanoma cutâneo ou trata-se de uma marca epigenômica relacionada à ocorrência prévia do câncer. Estes dados foram publicados na revista científica *Melanoma Research* 2015; 25(2): 173-177 (Anexo 4).

#### 4.4 INVESTIGAÇÃO DOS NÍVEIS DE METILAÇÃO EM GENES DE RISCO AO MELANOMA CUTÂNEO E ASSOCIAÇÃO COM VARIÁVEIS CLÍNICAS EM PACIENTES DE MELANOMA

Com a finalidade de investigar diferenças de metilação em genes de risco ao melanoma cutâneo entre os diferentes grupos de melanoma, assim como explorar o potencial dos níveis de metilação nestes genes como biomarcador na doença, selecionamos com base na literatura genes de risco ao melanoma cutâneo. Em seguida, recuperamos do *microarray* HM450K os respectivos dados de metilação desses genes.

Inicialmente, selecionamos genes com base na descrição de variantes genéticas consideradas como alelos de risco alto a intermediário, que segregam com a ocorrência de melanoma cutâneo. Sete genes preenchem este critério: *CDKN2A* (CANNON-ALBRIGHT et al. 1992; KAMB et al. 1994b; QUELLE et al. 1995), *CDK4* (ZUO et al. 1996), *MITF* (YOKOYAMA et al. 2011), *BAP1* (NJAUW et al. 2012), *TERT* (HORN et al. 2013), *POT1* (ROBLES-ESPINOZA et al. 2014b) e *MGMT* (APPELQVIST et al. 2014). Adicionamos a esta lista outros genes com variantes de risco baixo ou com menor evidência de associação à predisposição ao melanoma cutâneo: o gene *MC1R*, por conter polimorfismos associados ao aumento no risco de desenvolver melanoma (FARGNOLI et al. 2010; PALMER et al. 2000); o gene *PALB2*, detectado com mutação deletéria em um indivíduo com quatro tipos diferentes de câncer, sendo um destes melanoma (AOUDE et al. 2014); e os genes *TNFRSF10C* (HYLAND et al. 2014) e *TNF* (PERGOLI et al. 2014), recentemente

associados ao risco de melanoma com base em estudos de metilação do DNA em sangue periférico.

No total, 11 genes de risco ao melanoma foram analisados em amostras de sangue periférico. Trabalhos prévios demonstraram o papel da metilação do DNA no controle da expressão de aproximadamente 50% dos genes selecionados: *CDKN2A* (VAN DER VELDEN et al. 2001), *TNF* (PIEPER et al. 2008), *PALB2* (POTAPOVA et al. 2008), *TNFRSF10C* (CHENG et al. 2009) e *TERT* (ZHANG H et al. 2015). Considerando que o impacto da metilação na expressão gênica é melhor compreendido para CpGs mapeados na região promotora, analisamos separadamente sítios CpGs mapeadas em promotor e corpo gênico. Ainda, a maioria dos CpGs analisados na região promotora encontra-se em ilhas CpG, exceto para os genes *MITF* e *TNF*.

Comparando-se diferentes grupos de pacientes de melanoma e controles, verificamos uma diferença estatisticamente significativa nos níveis de metilação no corpo do gene *MGMT* ( $p=0,02$ ) entre pacientes portadores de mutação em *CDKN2A* e pacientes afetados por melanoma esporádico (**Tabela 4**). Em seguida, foi investigada a associação dos níveis de metilação nos 11 genes com duas variáveis clínicas dos pacientes: número de melanomas e índice de Breslow do melanoma de maior estadiamento. Os níveis de metilação nos promotores dos genes *BAP1*, *MITF* e *PALB2* foram estatisticamente associados com o número de melanomas desenvolvidos no paciente, e a hipermetilação no promotor do gene *POT1* foi associada ao índice de Breslow dos tumores (**Tabela 5**).

**Tabela 4** - Nível de metilação em genes de risco ao melanoma cutâneo em diferentes grupos de pacientes de melanoma e indivíduos controle.

Gene	CHR	Transcrito (UCSC)	Região gênica	Nº de sítios CpGs (HM450K)	Controles (DP)	Mutados em <i>CDKN2A</i> (DP)	Mel. esporádico (DP)	Mel. Hereditário (DP)	<i>P-value</i>
<i>BAP1</i>	3	NM_004656	corpo	5	0,60 (0,44)	0,59 (0,45)	0,59 (0,44)	0,59 (0,44)	0,98
		NM_004656	promotor	10	0,04 (0,025)	0,03 (0,02)	0,05 (0,03)	0,05 (0,03)	0,32
<i>CDK4</i>	12	NM_000075	corpo	2	0,32 (0,24)	0,34 (0,28)	0,33 (0,24)	0,32 (0,24)	0,76
		NM_000075	promotor	13	0,26 (0,36)	0,25 (0,37)	0,25 (0,36)	0,25 (0,35)	1,00
<i>CDKN2A</i>	9	NM_058195	promotor	5	0,07 (0,03)	0,067 (0,02)	0,07 (0,04)	0,08 (0,04)	0,62
<i>MC1R</i>	16	NM_002386	promotor	9	0,35 (0,45)	0,36 (0,45)	0,35 (0,44)	0,36 (0,44)	0,95
<i>MGMT</i>	10	NM_002412	promotor	15	0,45 (0,44)	0,45 (0,45)	0,45 (0,44)	0,45 (0,44)	0,99
		NM_002412	corpo	104	0,88 (0,16)*	0,89 (0,15)	0,87 (0,16)	0,87 (0,16)*	<b>0,02</b>
<i>MITF</i>	3	NM_000248	promotor	3	0,96 (0,03)	0,96 (8,4e-3)	0,93 (0,04)	0,94 (0,03)	0,54
		NM_000248	corpo	5	0,95 (0,02)	0,96 (0,02)	0,94 (0,03)	0,94 (0,031)	0,65
		NM_006722	promotor	4	0,80 (0,17)	0,81 (0,18)	0,78 (0,17)	0,79 (0,16)	0,76
		NM_006722	corpo	20	0,87 (0,13)	0,89 (0,12)	0,87 (0,12)	0,87 (0,12)	0,88
		NM_198158	promotor	3	0,96 (0,03)	0,96 (8,4e-3)	0,93 (0,04)	0,94 (0,03)	0,54
		NM_198158	corpo	5	0,95 (0,02)	0,96 (0,02)	0,94 (0,03)	0,94 (0,03)	0,65
		NM_198159	promotor	5	0,03 (0,023)	0,03 (0,02)	0,03 (0,03)	0,03 (0,03)	1,00
		NM_198159	corpo	29	0,73 (0,32)	0,74 (0,32)	0,73 (0,31)	0,73 (0,32)	0,91
		NM_198177	promotor	4	0,79 (0,20)	0,81 (0,19)	0,79 (0,21)	0,79 (0,20)	0,94
		NM_198177	corpo	14	0,91 (0,09)	0,92 (0,09)	0,91 (0,09)	0,91 (0,09)	0,83
		NM_198178	promotor	2	0,92 (0,08)	0,93 (0,07)	0,94 (0,06)	0,93 (0,07)	0,68
		NM_198178	corpo	10	0,93 (0,08)	0,94 (0,08)	0,92 (0,08)	0,92 (0,08)	0,55
<i>PALB2</i>	16	NM_024675	corpo	5	0,23 (0,41)	0,22 (0,42)	0,24 (0,41)	0,24 (0,41)	0,77
		NM_024675	promotor	12	0,07 (0,10)	0,06 (0,10)	0,06 (0,08)	0,07 (0,09)	0,79
<i>POT1</i>	7	NM_001042594	corpo	1	0,96 (0,02)	0,97 (0,01)	0,95 (0,01)	0,95 (0,02)	0,39
		NM_001042594	promotor	12	0,23 (0,35)	0,23 (0,36)	0,23 (0,34)	0,23 (0,34)	0,88
		NM_015450	corpo	2	0,96 (3e-3)	0,97 (2,3e-3)	0,95 (6,7e-4)	0,95 (4,2e-3)	0,08
		NM_015450	promotor	11	0,16 (0,27)	0,16 (0,29)	0,17 (0,27)	0,16 (0,26)	0,81
		NR_003102	corpo	5	0,51 (0,48)	0,51 (0,48)	0,51 (0,47)	0,50 (0,47)	0,99
		NR_003102	promotor	7	0,16 (0,28)	0,17 (0,31)	0,17 (0,29)	0,17 (0,28)	0,95
		NR_003103	corpo	5	0,51 (0,48)	0,51 (0,48)	0,51 (0,47)	0,50 (0,47)	0,92
		NR_003103	promotor	7	0,16 (0,28)	0,17 (0,31)	0,17 (0,29)	0,17 (0,28)	0,95
		NR_003104	corpo	5	0,51 (0,48)	0,51 (0,48)	0,51 (0,47)	0,50 (0,47)	0,92
		NR_003104	promotor	7	0,16 (0,28)	0,17 (0,31)	0,17 (0,29)	0,17 (0,28)	0,95
<i>TERT</i>	5	NM_198255;NM_198253	corpo	61	0,87 (0,14)	0,88 (0,14)	0,86 (0,14)	0,86 (0,14)	0,11
		NM_198253;NM_198255	promotor	6	0,61 (0,32)	0,61 (0,33)	0,57 (0,29)	0,57 (0,30)	0,81
<i>TNFRSF10C</i>	8	NM_003841	promotor	13	0,38 (0,39)	0,39 (0,40)	0,38 (0,39)	0,38 (0,39)	0,99
		NM_003841	corpo	4	0,13 (0,19)	0,12 (0,18)	0,11 (0,16)	0,12 (0,16)	0,99
<i>TNF</i>	6	NM_000594	corpo	5	0,65 (0,10)	0,67 (0,10)	0,66 (0,10)	0,71 (0,11)	0,67
		NM_000594	promotor	7	0,12 (0,21)	0,10 (0,23)	0,11 (0,22)	0,11 (0,24)	0,98

Os níveis de metilação correspondem à média dos valores de beta obtidos a partir de dados de *microarray* HM450K (Illumina). Foram analisadas amostras de sangue periférico de 51 indivíduos: 12 indivíduos sem histórico de câncer (controles), 8 pacientes de melanoma portadores de mutação *CDKN2A*, 19 pacientes de melanoma hereditário sem mutações nos genes *CDKN2A* e *CDK4*, e 12 pacientes afetados por melanoma esporádico. Para análise estatística, foi utilizado teste de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas de Dunn, *p-value* significativo está destacado em negrito. DP= desvio padrão; CHR= cromossomo; a classe “promotor” compreende: TSS1500, TSS200, 5’UTR e 1<sup>st</sup>Exon; \*grupos que apresentam diferença estatisticamente significativa.

**Tabela 5** - Associação dos níveis de metilação em genes de risco ao melanoma cutâneo com características clínicas dos pacientes de melanoma.

Características clínicas dos pacientes	N	<i>BAP1</i> (NM_004656)		<i>CDK4</i> (NM_000075)		<i>CDKN2A</i> (NM_058195)	<i>MC1R</i> (NM_002386)	<i>MGMT</i> (NM_002412)	
		promotor média (DP)	corpo média (DP)	promotor média (DP)	corpo média (DP)	promotor média (DP)	promotor média (DP)	promotor média (DP)	corpo média (DP)
Número de melanomas									
1	18	0,04 (7e-3)	0,59 (0,01)	0,25 (7e-3)	0,32 (0,06)	7,4e-2 (0,01)	0,36 (0,01)	0,45 (8e-3)	0,87 (0,02)
>1	21	0,03 (6e-3)	0,59 (0,01)	0,25 (8,4e-3)	0,33 (0,04)	7,6e-2 (0,01)	0,36 (0,01)	0,45 (9e-3)	0,88 (0,02)
<i>p-value</i>		<b>2e-4</b>	0,6	0,16	0,97	0,62	0,42	0,85	0,11
Índice de Breslow*									
<1	24	0,04 (9,5e-3)	0,59 (0,02)	0,25 (8e-3)	0,33 (0,04)	0,08 (0,01)	0,36 (0,01)	0,45 (8e-3)	0,87 (0,02)
≥1	13	4,5e-3 (6,7e-3)	0,59 (0,01)	0,25 (7e-3)	0,33 (0,03)	0,07 (0,01)	0,36 (0,01)	0,45 (9e-3)	0,87 (0,01)
<i>p-value</i>		0,84	0,36	0,69	0,69	0,36	0,45	0,19	0,45
Características clínicas dos pacientes	N	<i>MITF</i> (NM_000248 e NM_198158)		<i>MITF</i> (NM_006722)		<i>MITF</i> (NM_198159)		<i>MITF</i> (NM_198177)	
		promotor média (DP)	corpo média (DP)	promotor média (DP)	corpo média (DP)	promotor média (DP)	corpo média (DP)	promotor média (DP)	corpo média (DP)
Número de melanomas									
1	18	0,93 (0,03)	0,94 (0,02)	0,78 (0,03)	0,87 (0,02)	0,08 (0,03)	0,73 (0,01)	0,79 (0,03)	0,91 (0,02)
>1	21	0,95 (0,02)	0,95 (0,02)	0,80 (0,03)	0,88 (0,01)	0,08 (0,03)	0,73 (0,01)	0,80 (0,02)	0,92 (0,01)
<i>p-value</i>		<b>0,01</b>	0,83	<b>0,02</b>	0,10	1,00	5,4e-2	<b>0,02</b>	0,2
Índice de Breslow*									
<1	24	0,95 (0,03)	0,95 (0,02)	0,80 (0,03)	0,88 (0,02)	0,08 (0,02)	0,73 (0,01)	0,80 (0,03)	0,91 (0,02)
≥1	13	0,95 (0,02)	0,94 (0,02)	0,79 (0,03)	0,87 (0,01)	0,08 (0,03)	0,73 (0,01)	0,79 (0,02)	0,91 (0,01)
<i>p-value</i>		0,99	0,19	0,42	0,44	0,94	0,44	0,54	0,51
Características clínicas dos pacientes	N	<i>MITF</i> (NM_198178)		<i>PALB2</i> (NM_024675)		<i>POT1</i> (NM_001042594)		<i>POT1</i> (NM_015450)	
		promotor média (DP)	corpo média (DP)	promotor média (DP)	corpo média (DP)	promotor média (DP)	corpo média (DP)	promotor média (DP)	corpo média (DP)
Número de melanomas									
1	18	0,94 (0,02)	0,92 (0,02)	0,24 (9e-3)	0,06 (0,01)	0,95 (0,01)	0,23 (0,01)	0,17 (0,01)	0,95 (0,02)
>1	21	0,93 (0,02)	0,93 (0,01)	0,23 (9e-3)	0,07 (0,01)	0,96 (0,02)	0,23 (0,01)	0,16 (0,01)	0,96 (0,01)
<i>p-value</i>		0,68	0,09	<b>0,01</b>	0,47	0,18	0,68	0,54	0,10
Índice de Breslow*									
<1	24	0,94 (0,02)	0,92 (0,02)	0,24 (9e-3)	0,07 (0,01)	0,95 (0,02)	0,23 (0,01)	0,16 (0,01)	0,96 (0,01)
≥1	13	0,92 (0,03)	0,92 (0,01)	0,23 (9e-3)	0,06 (0,01)	0,96 (0,01)	0,24 (0,01)	0,17 (0,01)	0,96 (0,01)
<i>p-value</i>		0,26	0,76	0,81	0,26	0,58	0,06	<b>0,04</b>	0,76
Características clínicas dos pacientes	N	<i>POT1</i> (NR_003102, NR_003103 e NR_003104)		<i>TERT</i> (NM_19855 e NM_198253)		<i>TNFRSF10C</i> (NM_003841)		<i>TNF</i> (NM_000594)	
		promotor média (DP)	corpo média (DP)	promotor média (DP)	corpo média (DP)	promotor média (DP)	corpo média (DP)	promotor média (DP)	corpo média (DP)
Número de melanomas									
1	18	0,17 (0,01)	0,50 (0,01)	0,58 (0,039)	0,86 (0,02)	0,38 (0,01)	0,12 (0,02)	0,21 (0,03)	0,67 (0,05)
>1	21	0,17 (0,01)	0,50 (0,02)	0,58 (0,043)	0,86 (0,01)	0,38 (0,01)	0,11 (0,02)	0,22 (0,03)	0,69 (0,07)
<i>P-value</i>		0,75	0,72	0,75	0,13	0,15	0,94	0,32	0,33
Índice de Breslow*									
<1	24	0,16 (0,01)	0,50 (0,02)	0,58 (0,046)	0,86 (0,02)	0,38 (0,01)	0,11 (0,02)	0,22 (0,03)	0,69 (0,07)
≥1	13	0,17 (0,01)	0,51 (0,01)	0,58 (0,028)	0,86 (0,01)	0,38 (0,01)	0,12 (0,02)	0,21 (0,03)	0,66 (0,05)
<i>P-value</i>		0,07	0,12	0,54	0,35	0,79	0,54	0,74	0,35

Os níveis de metilação correspondem à média dos valores de beta obtidos a partir de dados de *microarray* HM450K (Illumina). Foram analisadas amostras de sangue periférico de 39 pacientes de melanoma: 8 pacientes de melanoma portadores de mutação em *CDKN2A*, 19 pacientes de melanoma hereditário sem mutação nos genes *CDKN2A* e *CDK4*, e 12 pacientes afetados por melanoma esporádico. Para análise estatística, foi utilizado teste de Mann-Whitney, *p-value* significativo está destacado em negrito. N= número de pacientes; DP= desvio padrão; \*índice de Breslow do melanoma de maior estadiamento; a classe “promotor” compreende: TSS1500, TSS200, 5’UTR e 1<sup>st</sup> Exon.

Posteriormente, questionamos qual seria o perfil de metilação dos 11 genes selecionados em amostras de melanomas cutâneos. Para responder a esta questão, verificamos os níveis de metilação deste grupo de genes mais o gene *KIT*, cuja inativação por metilação do DNA é evento frequente em melanomas (DAHL et al. 2015), em uma amostra independente de melanomas primários, metástases e culturas primárias de melanócitos de indivíduos saudáveis.

Comparando-se melanomas com culturas primários de melanócitos (controle), os níveis de metilação no corpo dos genes *MGMT*, *TERT* e *TNF* foram significativamente menores nos tumores, enquanto tanto a região promotora quanto o corpo do gene *KIT* apresentaram-se hipermetilados (**Tabela 6**). Entre os subtipos de melanoma, detectamos em melanomas acrais metilação diferencial no corpo dos genes *MGMT* (hipometilação) e *TERT* (hipermetilação) quando comparados a melanoma não acrais (**Tabela 7**). Comparando-se os tumores que desenvolveram ou não metástase, não há diferenças estatisticamente significativas (**Tabela 8**); entretanto, o corpo do gene *MITF* apresentou-se hipometilado em metástases em relação aos melanomas primários pareados (**Tabela 9**).

**Tabela 6** - Nível de metilação em genes associados ao melanoma cutâneo em melanomas primários e culturas primárias de melanócitos.

Gene	CHR	Transcrito (UCSC)	Região gênica	Nº de sítios CpGs (HM450K)	Melanomas (DP)	Melanócitos (DP)	<i>p-value</i>
<i>BAP1</i>	3	NM_004656	corpo	5	0,52 (0,44)	0,44 (0,46)	1,00
		NM_004656	promotor	10	0,04 (0,01)	0,05 (0,02)	0,16
<i>CDK4</i>	12	NM_000075	corpo	2	0,18 (0,09)	0,06 (0,02)	-
		NM_000075	promotor	13	0,22 (0,30)	0,22 (0,30)	0,54
<i>CDKN2A</i>	9	NM_058195	promotor	4	0,12 (0,03)	0,08 (0,05)	0,20
<i>KIT</i>	4	NM_000222;NM_001093772	corpo	9	0,50 (0,30)	0,17 (0,28)	<b>0,01</b>
			promotor	5	0,32 (0,24)	0,08 (0,08)	<b>0,03</b>
<i>MC1R</i>	16	NM_002386	promotor	9	0,27 (0,32)	0,07 (0,05)	0,67
<i>MGMT</i>	10	NM_002412	promotor	14	0,42 (0,35)	0,44 (0,42)	0,99
		NM_002412	corpo	99	0,74 (0,15)	0,83 (0,20)	<b>&lt;1e-4</b>
<i>MITF</i>	3	NM_000248	promotor	3	0,53 (0,09)	0,06 (0,05)	0,10
		NM_000248	corpo	5	0,79 (0,20)	0,57 (0,45)	0,42
		NM_006722	promotor	4	0,79 (0,10)	0,80 (0,16)	0,89
		NM_006722	corpo	20	0,78 (0,17)	0,64 (0,38)	0,78
		NM_198158	promotor	3	0,53 (0,09)	0,06 (0,05)	0,10
		NM_198158	corpo	5	0,79 (0,20)	0,57 (0,45)	0,42
		NM_198159	promotor	5	0,04 (8,4e-3)	0,04 (1,1e-3)	0,55
		NM_198159	corpo	29	0,67 (0,29)	0,56 (0,39)	0,77
		NM_198177	promotor	4	0,77 (0,16)	0,59 (0,29)	0,20
		NM_198177	corpo	14	0,77 (0,19)	0,61 (0,42)	0,84
		NM_198178	promotor	2	0,94 (0,04)	0,97 (0,01)	-
<i>PALB2</i>	16	NM_024675	corpo	5	0,22 (0,40)	0,22 (0,39)	0,84
		NM_024675	promotor	12	0,07 (0,08)	0,08 (0,09)	0,37
<i>POT1</i>	7	NM_001042594	corpo	1	0,95 (0,04)	0,94 (0,01)	-
		NM_001042594	promotor	10	0,12 (0,23)	0,14 (0,26)	0,31
		NM_015450	corpo	1	0,95 (0,04)	0,94 (0,01)	-
		NM_015450	promotor	10	0,12 (0,23)	0,14 (0,26)	0,31
		NR_003102;NR_003103;NR_003104	corpo	3	0,33 (0,53)	0,33 (0,52)	0,70
		NR_003102;NR_003103;NR_003104	promotor	7	0,16 (0,27)	0,19 (0,30)	0,71
<i>TERT</i>	5	NM_198255;NM_198253	corpo	61	0,67 (0,13)	0,71 (0,19)	<b>0,03</b>
		NM_198253;NM_198255	promotor	6	0,52 (0,24)	0,38 (0,24)	0,49
<i>TNFRSF10C</i>	8	NM_003841	promotor	13	0,54 (0,17)	0,47 (0,32)	0,64
		NM_003841	corpo	3	0,47 (0,13)	0,34 (0,38)	0,70
<i>TNF</i>	6	NM_000594	corpo	5	0,76 (0,06)	0,89 (0,07)	<b>0,01</b>
		NM_000594	promotor	13	0,54 (0,17)	0,47 (0,32)	0,64

Os níveis de metilação correspondem à média dos valores de beta obtidos a partir de dados de *microarray* (HM450K). Foram analisadas 18 amostras de diferentes melanomas primários e 3 culturas celulares de melanócitos primários (controles) derivados de indivíduos saudáveis. Para análise estatística, foi utilizado teste de Mann-Whitney, *p-value* significativo está destacado em negrito. DP= desvio padrão; CHR= cromossomo; a classe “promotor” compreende: TSS1500, TSS200, 5’UTR e 1<sup>st</sup> Exon.

**Tabela 7** - Nível de metilação em genes associados ao melanoma cutâneo nos subtipos de melanoma.

Gene	CHR	Transcrito (UCSC)	Região gênica	n° de sítios CpGs (HM450K)	Melanoma acral (DP)	Melanoma não acral (DP)	<i>p-value</i>
<i>BAP1</i>	3	NM_004656	corpo	5	0,52 (0,43)	0,52 (0,44)	1,00
		NM_004656	promotor	10	0,04 (0,01)	0,04 (0,01)	0,44
<i>CDK4</i>	12	NM_000075	corpo	2	0,22 (0,09)	0,16 (0,09)	-
		NM_000075	promotor	13	0,23 (0,32)	0,21 (0,29)	0,92
<i>CDKN2A</i>	9	NM_058195	promotor	4	0,09 (0,05)	0,14 (0,03)	0,20
<i>KIT</i>	4	NM_000222;NM_001093772	corpo	9	0,44 (0,32)	0,48 (0,32)	0,73
			promotor	5	0,32 (0,28)	0,32 (0,23)	1,00
<i>MCL1</i>	16	NM_002386	promotor	9	0,27 (0,31)	0,27 (0,32)	0,86
<i>MGMT</i>	10	NM_002412	promotor	14	0,39 (0,33)	0,43 (0,36)	0,35
		NM_002412	corpo	99	0,71 (0,14)	0,75 (0,15)	<b>0,01</b>
<i>MITF</i>	3	NM_000248	promotor	3	0,64 (0,07)	0,49 (0,09)	0,20
		NM_000248	corpo	5	0,84 (0,15)	0,78 (0,21)	0,55
		NM_006722	promotor	4	0,83 (0,10)	0,78 (0,11)	0,89
		NM_006722	corpo	20	0,84 (0,13)	0,75 (0,18)	0,08
		NM_198158	promotor	3	0,64 (0,07)	0,49 (0,09)	0,20
		NM_198158	corpo	5	0,84 (0,15)	0,78 (0,21)	0,55
		NM_198159	promotor	5	0,04 (9,3e-3)	0,04 (0,01)	0,69
		NM_198159	corpo	29	0,72 (0,30)	0,65 (0,29)	0,19
		NM_198177	promotor	4	0,85 (0,14)	0,74 (0,17)	0,20
		NM_198177	corpo	14	0,83 (0,15)	0,75 (0,20)	0,22
		NM_198178	promotor	2	0,97 (2e-3)	0,92 (0,06)	-
		NM_198178	corpo	10	0,79 (0,15)	0,70 (0,22)	0,28
<i>PALB2</i>	16	NM_024675	corpo	5	0,22 (0,41)	0,22 (0,40)	1,00
		NM_024675	promotor	12	0,06 (0,07)	0,07 (0,08)	0,62
<i>POT1</i>	7	NM_001042594	corpo	1	0,97 (7e-3)	0,94 (0,04)	-
		NM_001042594	promotor	10	0,13 (0,24)	0,12 (0,23)	0,52
		NM_015450	corpo	1	0,97 (7e-3)	0,94 (0,04)	-
		NM_015450	promotor	10	0,13 (0,24)	0,12 (0,23)	0,52
		NR_003102, NR_003103, NR_003104	corpo	3	0,34 (0,55)	0,33 (0,53)	0,70
		NR_003102, NR_003103, NR_003104	promotor	7	0,17 (0,28)	0,16 (0,27)	1,00
<i>TERT</i>	5	NM_198255;NM_198253	corpo	61	0,73 (0,14)	0,64 (0,13)	<b>&lt;1e-3</b>
		NM_198253;NM_198255	promotor	6	0,57 (0,24)	0,50 (0,24)	0,70
<i>TNFRSF10C</i>	8	NM_003841	promotor	13	0,55 (0,19)	0,54 (0,16)	0,76
		NM_003841	corpo	3	0,40 (0,10)	0,49 (0,14)	0,40
<i>TNF</i>	6	NM_000594	corpo	5	0,84 (0,08)	0,72 (0,06)	0,06
		NM_000594	promotor	7	0,51 (0,10)	0,42 (0,08)	0,10

Os níveis de metilação correspondem à média dos valores de beta obtidos a partir de dados de *microarray* (HM450K). Foram analisadas 18 amostras de diferentes melanomas primários: 13 do subtipo não acral e 5 do subtipo acral. Para análise estatística, foi utilizado teste de Mann-Whitney, *p-value* significativo está destacado em negrito. DP= desvio padrão; CHR= cromossomo; a classe “promotor” compreende: TSS1500, TSS200, 5’UTR e 1<sup>st</sup>Exon.



**Tabela 8** - Nível de metilação em genes associados ao melanoma cutâneo em tumores que desenvolveram ou não metástase.

Gene	CHR	Transcrito (UCSC)	Região gênica	Nº de sítios CpGs (HM450K)	Tumores com metástase (DP)	Tumores sem metástase (DP)	<i>p-value</i>
<i>BAP1</i>	3	NM_004656	corpo	5	0,52 (0,45)	0,52 (0,44)	1,00
			promotor	10	0,04 (0,02)	0,04 (0,01)	0,85
<i>CDK4</i>	12	NM_000075	corpo	2	0,13 (0,08)	0,19 (0,10)	-
			promotor	13	0,20 (0,27)	0,22 (0,31)	1,00
<i>CDKN2A</i>	9	NM_058195	promotor	4	0,10 (0,05)	0,13 (0,02)	0,34
<i>KIT</i>	4	NM_000222;NM_001093772	corpo	9	0,47 (0,32)	0,45 (0,34)	0,86
			promotor	5	0,33 (0,24)	0,32 (0,28)	1,00
<i>MC1R</i>	16	NM_002386	promotor	9	0,30 (0,37)	0,26 (0,30)	0,80
<i>MGMT</i>	10	NM_002412	promotor	14	0,44 (0,31)	0,41 (0,36)	0,48
			corpo	99	0,75 (0,17)	0,74 (0,14)	0,21
<i>MITF</i>	3	NM_000248	promotor	3	0,55 (0,10)	0,52 (0,08)	0,70
			corpo	5	0,82 (0,20)	0,79 (0,20)	1,00
			promotor	4	0,82 (0,10)	0,79 (0,12)	0,49
			corpo	20	0,78 (0,16)	0,78 (0,17)	0,95
			promotor	3	0,55 (0,10)	0,52 (0,08)	0,70
			corpo	5	0,82 (0,20)	0,79 (0,20)	1,00
			promotor	5	0,04 (0,01)	0,04 (9,3e-3)	0,31
			corpo	29	0,67 (0,29)	0,67 (0,29)	0,89
			promotor	4	0,78 (0,16)	0,77 (0,16)	0,69
			corpo	14	0,77 (0,18)	0,77 (0,19)	0,98
			promotor	2	0,91 (0,07)	0,95 (0,04)	-
<i>PALB2</i>	16	NM_024675	corpo	5	0,23 (0,40)	0,22 (0,40)	0,69
			promotor	12	0,07 (0,08)	0,07 (0,08)	0,98
<i>POT1</i>	7	NM_001042594	corpo	1	0,95 (0,02)	0,95 (0,04)	-
			promotor	10	0,12 (0,22)	0,12 (0,23)	0,52
			corpo	1	0,95 (0,02)	0,95 (0,04)	-
			promotor	10	0,12 (0,22)	0,12 (0,23)	0,52
			corpo	3	0,33 (0,53)	0,33 (0,53)	0,70
			promotor	7	0,15 (0,25)	0,16 (0,27)	0,90
<i>TERT</i>	5	NM_198255;NM_198253	corpo	61	0,65 (0,16)	0,67 (0,13)	0,40
			promotor	6	0,55 (0,26)	0,51 (0,23)	0,70
<i>TNFRSF10C</i>	8	NM_003841	promotor	13	0,59 (0,15)	0,53 (0,17)	0,26
			corpo	3	0,60 (0,10)	0,43 (0,14)	0,20
<i>TNF</i>	6	NM_000594	corpo	5	0,68 (0,08)	0,78 (0,06)	0,95
			promotor	7	0,40 (0,09)	0,45 (0,09)	0,46

Os níveis de metilação correspondem à média dos valores de beta obtidos a partir de dados de *microarray* (HM450K). Foram analisadas 18 amostras de diferentes melanomas primários, que desenvolveram (n=14) ou não metástase (n=4). Para análise estatística, foi utilizado teste de Mann-Whitney, *p-value* significativo está destacado em negrito. DP= desvio padrão; CHR= cromossomo; a classe “promotor” compreende: TSS1500, TSS200, 5<sup>st</sup>UTR e 1<sup>st</sup>Exon.

**Tabela 9** - Nível de metilação em genes associados ao melanoma cutâneo em tumores primários e metástases pareadas.

Gene	CHR	Transcrito (UCSC)	Região gênica	Nº de sítios CpGs (HM450K)	Melanoma primário (DP)	Metástase (DP)	<i>p-value</i>
<i>BAP1</i>	3	NM_004656	corpo	5	0,52 (0,06)	0,55 (0,04)	0,20
		NM_004656	promotor	10	0,03 (3,1e-3)	0,03 (2,6e-3)	0,59
<i>CDK4</i>	12	NM_000075	corpo	2	0,20 (0,15)	0,18 (0,13)	0,46
		NM_000075	promotor	13	0,22 (0,04)	0,21 (0,03)	0,62
<i>CDKN2A</i>	9	NM_058195	promotor	4	0,10 (0,04)	0,12 (0,08)	0,40
<i>KIT</i>	4	NM_000222;NM_001093772	corpo	9	0,45 (0,33)	0,49 (0,33)	0,60
			promotor	5	0,30 (0,24)	0,33 (0,21)	0,69
<i>MC1R</i>	16	NM_002386	promotor	9	0,27 (0,07)	0,27 (0,07)	0,93
<i>MGMT</i>	10	NM_002412	promotor	13	0,38 (0,12)	0,35 (0,09)	0,64
		NM_002412	corpo	99	0,71 (0,23)	0,69 (0,16)	0,72
		NM_000248	promotor	3	0,48 (0,34)	0,53 (0,33)	0,33
		NM_000248	corpo	5	0,75 (0,16)	0,83 (0,15)	0,27
		NM_006722	promotor	4	0,79 (0,09)	0,79 (0,09)	0,90
		NM_006722	corpo	20	0,76 (0,15)	0,77 (0,14)	0,65
		NM_198158	promotor	3	0,48 (0,34)	0,53 (0,33)	0,33
		NM_198158	corpo	5	0,75 (0,16)	0,83 (0,15)	0,27
<i>MITF</i>	3	NM_198159	promotor	4	0,02 (0,01)	0,02 (5,3e-3)	0,07
		NM_198159	corpo	29	0,65 (0,12)	0,67 (0,11)	0,53
		NM_198177	promotor	4	0,76 (0,19)	0,75 (0,18)	0,92
		NM_198177	corpo	14	0,75 (0,14)	0,67 (0,11)	<b>0,02</b>
		NM_198178	promotor	2	0,96 (0,04)	0,97 (0,02)	0,59
		NM_198178	corpo	10	0,69 (0,18)	0,75 (0,17)	0,21
		NM_024675	corpo	5	0,22 (6,1e-3)	0,22 (8,3e-3)	0,76
<i>PALB2</i>	16	NM_024675	promotor	12	0,06 (0,02)	0,06 (0,01)	0,74
		NM_001042594	corpo	1	0,94 (0,06)	0,96 (0,02)	0,53
<i>POT1</i>	7	NM_001042594	promotor	10	0,11 (0,02)	0,11 (0,11)	0,35
		NM_015450	corpo	1	0,94 (0,06)	0,96 (0,02)	0,53
		NM_015450	promotor	10	0,11 (0,02)	0,11 (0,11)	0,35
		NR_003102;NR_003103;NR_003104	corpo	3	0,32 (0,02)	0,33 (7,4e-3)	0,41
		NR_003102;NR_003103;NR_003104	promotor	7	0,16 (0,03)	0,15 (0,02)	0,30
		NM_198255;NM_198253	corpo	60	0,65 (0,14)	0,67 (0,10)	0,41
<i>TERT</i>	5	NM_198253;NM_198255	promotor	6	0,50 (0,15)	0,52 (0,15)	0,61
		NM_003841	promotor	13	0,53 (0,10)	0,56 (0,12)	0,64
<i>TNFRSF10C</i>	8	NM_003841	corpo	3	0,43 (0,16)	0,53 (0,26)	0,40
		NM_000594	corpo	5	0,81 (0,06)	0,75 (0,12)	0,28
<i>TNF</i>	6	NM_000594	promotor	7	0,48 (0,12)	0,43 (0,16)	0,12

Os níveis de metilação correspondem à média dos valores de beta obtidos a partir de dados de *microarray* (HM450K). Foram analisadas 7 amostras de diferentes melanomas primários e respectivas metástases pareadas. Para análise estatística, foi utilizado teste de Mann-Whitney, *p-value* significativo está destacado em negrito. DP= desvio padrão; CHR= cromossomo; a classe “promotor” compreende: TSS1500, TSS200, 5’UTR e 1<sup>st</sup>Exon.

Neste estudo pode-se observar que, de uma maneira geral, as diferenças de metilação detectadas em sangue periférico são pequenas (<5%), enquanto nos tumores estas diferenças são maiores (>10%). Estudos prévios corroboram estes achados de diferenças de metilação em baixo nível em sangue periférico, demonstrando que biomarcadores epigenéticos apresentam pequenas diferenças neste tecido (MOORE et al. 2008; FLANAGAN et al. 2009; TESCHENDORFF et al. 2009; PEDERSEN et al. 2011). As diferenças de metilação detectadas em sangue periférico em nosso estudo estão principalmente na região promotora, enquanto nos tumores estão em sua maioria no corpo do gene. Ainda, as amostras de melanomas primários apresentaram-se hipometiladas em relação aos melanócitos; no entanto, não podemos descartar a possibilidade de que este resultado seja um artefato devido à manutenção destes melanócitos em cultura (NESTOR et al. 2015). Por fim, dois genes se destacam por apresentarem diferença de metilação tanto em sangue periférico de pacientes de melanoma quanto em amostras de melanoma primário: *MGMT* e *MITF*.

O gene *MGMT* codifica uma proteína de reparo que remove grupos alquil da posição O<sup>6</sup> de resíduos de guanina (MIKESKA et al. 2012). A metilação no promotor deste gene tem sido descrita como biomarcador em vários estudos, principalmente para glioblastoma (CANKOVIC et al. 2013) e câncer colorretal (INNO et al. 2014). Em melanoma, foi descrito metilação da região promotora de *MGMT* em amostras de tumor e soro de pacientes, com silenciamento deste gene nos tumores (MARINI et al. 2006; RASTETTER et al. 2007). No presente trabalho, detectamos diferenças de metilação no corpo de *MGMT* em sangue periférico e em amostras de melanoma. A metilação no corpo gênico ainda é pouco estudada e tem sido associada ao aumento

de expressão gênica (KULIS et al. 2013); contudo, alguns estudos demonstraram a complexidade desta marca, onde (a) baixos níveis de metilação no corpo gênico foram associados tanto a níveis altos quanto baixos de expressão gênica e (b) baixos níveis de metilação no corpo gênico foram associados a níveis intermediários de expressão (JJINGO et al. 2012). Nossos dados reforçam a importância da metilação do gene *MGMT* no melanoma; entretanto, estudos adicionais são necessários para avaliar se a metilação no corpo deste gene de fato impacta sua expressão.

O gene *MITF* é um fator de transcrição que controla genes relacionados à melanogênese e genes de proliferação e diferenciação dos melanócitos (CHELI et al. 2010; LAW et al. 2012). Detectamos hipermetilação no promotor de *MITF* em sangue periférico de pacientes que desenvolveram mais de um melanoma cutâneo, e o corpo deste gene apresentou hipermetilação em tumores primários em relação à metástase pareada. Estudos anteriores mostram que a expressão de *MITF* é heterogênea entre diferentes amostras de melanoma e até mesmo dentre diferentes regiões de um mesmo tumor (ENNEN et al. 2014). Altos níveis de expressão de *MITF* foram associados com diferenciação ou proliferação, enquanto baixa expressão foi relacionada com potencial invasivo (HARTMAN e CZYZ 2015). Tendo-se em vista que a expressão do gene *MITF* pode ser controlada pelos seus níveis de metilação (LAUSS et al. 2015), é possível que as diferenças de metilação identificadas em nosso estudo estejam envolvidas com o duplo papel de *MITF* de acordo com seu nível de expressão: (a) elevados níveis de metilação no promotor de *MITF* em sangue periférico e tumores podem estar associados à doença mais agressiva e (b) à diferença de metilação detectada no corpo do gene *MITF* entre

tumores primários e suas respectivas metástases pode estar relacionada com diferenças no controle do ciclo celular.

Dentre os melanomas primários estudados, identificamos diferenças de metilação no corpo dos genes *MGMT* e *TERT* entre os subtipos acral e não acral. O melanoma do subtipo acral não é associado à exposição solar e ocorre mais frequentemente em idosos e não caucasianos (STUBBLEFIELD e KELLY 2014); o perfil molecular deste subtipo de melanoma também é distinto, sendo mais frequentes mutações no gene *KIT* (BEADLING et al. 2008; FURNEY et al. 2014). Embora não tenham sido detectadas diferenças de metilação entre os subtipos acral e não acral com relação ao gene *KIT*, as amostras de melanoma como um todo são hipermetiladas no gene *KIT* quando comparadas aos melanócitos, o que reforça dados anteriores que demonstram hipermetilação de *KIT* em melanoma de estadiamento avançado (CURTIN et al. 2006; DAHL et al. 2015).

Em resumo, identificamos em dois tipos diferentes de amostra (sangue periférico de pacientes de melanoma e melanomas primários) pequenas diferenças de metilação, porém estatisticamente significantes, em oito genes associados ao melanoma cutâneo: *BAP1*, *KIT*, *MGMT*, *MITF*, *PALB2*, *POT1*, *TERT* e *TNF*. A próxima etapa seria expandir este estudo utilizando maior número de amostras, para investigar a validação de tais achados como biomarcadores em melanoma cutâneo.

Estes dados foram publicados na revista científica *BioMed Research International*, 2015; 2015:376423 (Anexo 3).

#### 4.5 PERFIL DE METILAÇÃO EM ILHAS CPG MAPEADAS EM PROMOTORES GÊNICOS DE PACIENTES DE MELANOMA

A importância da metilação aberrante do DNA em tumores é bem estabelecida e o silenciamento gênico associado à hipermetilação de ilhas CpGs localizadas em promotores é um evento comum conhecido desde 1989 (GREGER et al. 1989; WEISENBERGER 2014). Contudo, em trabalho pioneiro, GAZZOLI et al. (2002) relataram um caso de alteração constitutiva no padrão de metilação relacionado à predisposição ao câncer. Mais especificamente, foi descrito um paciente cujos linfócitos apresentavam 50% de metilação no gene de reparo de DNA *MLH1*, sendo que no tumor deste paciente o alelo não metilado apresentava uma deleção, de maneira que as células do câncer não expressavam o gene; portanto, a hipermetilação no promotor de *MLH1* seria então o primeiro evento na inativação deste gene. Reforçando a importância deste mecanismo na suscetibilidade ao câncer, foi detectado padrão aberrante de metilação de maneira constitutiva em outros genes de predisposição a câncer: *PTPRJ*, no câncer colorretal (VENKATACHALAM et al. 2010); *KILLIN*, na síndrome de Cowden (BENNETT et al. 2010, 2011); *CDHI*, no câncer gástrico (PINHEIRO et al. 2010); *BRCAl*, no câncer de mama (WONG et al. 2011) e *SDHC*, em tumor estromal gastrointestinal (KILLIAN et al. 2014).

No presente trabalho, propusemos investigar se haveria em nossa casuística paciente de melanoma com perfil de metilação aberrante na região promotora, o qual poderia estar associado à predisposição ao melanoma cutâneo. Para tanto, foram recuperados dos dados pré-processados de *microarray* HM450K os valores de beta de sondas mapeadas em ilhas CpG localizadas em regiões promotoras (cerca de

20.000 genes) e posteriormente comparamos os níveis de metilação de cada gene em cada paciente de melanoma com o nível de metilação detectado nos indivíduos sem histórico de câncer (controles). Partindo da pressuposição de que em ilhas CpG contidas em promotores gênicos apenas um padrão consistente e relativamente homogêneo de metilação teria maior probabilidade de afetar a expressão deste gene, foram identificados em cada paciente genes que apresentassem mínimo de três sítios com  $\geq 20\%$  de diferença de metilação em cada CpG e uma diferença de metilação total (considerando todos os CpGs mapeados em ilha CpG + promotor) de ao menos 40% quando comparada ao grupo controle. Este procedimento levou à identificação de padrão aberrante de metilação em sete genes de 17 pacientes de melanoma (**Tabela 10**).

**Tabela 10** - Genes diferencialmente metilados em ilha CpG localizada na região promotora em pacientes de melanoma cutâneo.

Gene	Amostra	Mediana dos valores de beta		Diferença de metilação <sup>#</sup>	Nº de sondas disponíveis*	Razão de sondas <sup>&amp;</sup>
		Paciente	Controle			
<i>ADCY10P1</i>	Mel.H4	0,55	0,95	-0,40	5	1,00
	Mel.H5	0,44	0,95	-0,50	5	1,00
	Mel.H13	0,51	0,95	-0,43	5	1,00
	Mel.H19	0,50	0,95	-0,45	5	1,00
	Mel.4	0,52	0,95	-0,42	5	1,00
	Mel.7	0,55	0,95	-0,40	5	1,00
	Mel.10	0,52	0,95	-0,42	5	1,00
<i>DPYSL4</i>	Mel.M3	0,55	0,08	0,47	11	0,73
<i>NLGN2</i>	Mel.M6	0,19	0,64	-0,45	3	1,00
<i>NPFFR2</i>	Mel.M6	0,86	0,28	0,58	3	1,00
<i>OR2L13</i>	Mel.M3	0,47	0,04	0,43	5	1,00
	Mel.M6	0,44	0,04	0,40	5	1,00
	Mel.13	0,47	0,04	0,43	5	1,00
<i>TCEB3B</i>	Mel.6	0,45	0,92	-0,47	3	1,00
<i>VTRNA2-1</i>	Mel.M7	0,06	0,50	-0,43	6	1,00
	Mel.M8	0,05	0,50	-0,45	6	1,00
	Mel.H4	0,05	0,50	-0,44	6	1,00
	Mel.H14	0,09	0,50	-0,41	6	1,00
	Mel.H18	0,04	0,50	-0,46	6	1,00
	Mel.1	0,08	0,50	-0,42	6	1,00
	Mel.11	0,06	0,50	-0,44	6	1,00

Mel.M= pacientes de melanoma portadores de mutação em *CDKN2A*; Mel.H= pacientes de melanoma hereditário sem mutação nos genes *CDKN2A* e *CDK4*; Mel= pacientes de melanoma esporádico; <sup>#</sup>diferença de metilação= (mediana do paciente - mediana dos controles); \*sondas recuperadas dos dados pré-processados do *microarray* HM450K (Illumina); <sup>&</sup>razão de sondas com  $\geq 20\%$  de diferença de metilação em relação ao controle.

Em nossa análise, a maioria dos promotores detectados com diferença de metilação  $\geq 40\%$  encontra-se hipometilada; diferentemente do relatado para alterações de metilação constitutivas associadas à predisposição ao câncer, onde há hipermetilação de um dos alelos levando à inativação transcricional. Levantamos a hipótese de que possíveis diferenças entre pacientes e controles no número de cópias de segmentos genômicos (CNVs), em especial de genes contidos em CNVs



multialélicas populacionais, poderia ter impactado os níveis detectados de metilação; um número menor de cópias de um segmento genômico em um paciente, por exemplo, poderia refletir em menor nível de metilação. De acordo com HOUSEMAN et al. (2009), dados de *microarray* de metilação baseado em *beads* (como a HM450K) sofrem pouco impacto de CNVs, mas a presença de uma ou nenhuma cópia apresentam efeitos mais visíveis nos níveis detectados de metilação, resultado esperado já que a perda da região genômica interrogada causa perda da habilidade de mensurar a metilação nesta região. Para investigar esta hipótese, pesquisamos a presença de CNVs na região dos sete genes detectados, utilizando dados do banco DVG (*Database of Genomic Variants*) disponíveis no UCSC Genome Browser. Com esta análise *in silico*, notamos a presença de CNVs descritas na população geral na região promotora de quase todos os genes, exceto *NPFFR2* (Anexo 5). Desta maneira, é possível que CNVs tenham impactado os níveis detectados de metilação nos genes candidatos; para melhor entendimento, seria necessário averiguar o status de CNVs nos pacientes e controles.

Genes com único evento de alteração (*DPYSL4*, *NLGN2*, *NPFFR2* e *TCEB3B*) ocorrem principalmente em indivíduos portadores de mutação em *CDKN2A* e, desta maneira, é muito provável que as alterações nestes genes não sejam decisivas na predisposição ao melanoma. Embora o gene *TCEB3B* esteja alterado em um paciente negativo quanto a mutação em *CDKN2A*, dados do NCBI indicam que este gene é expresso exclusivamente em testículos, sem evidências de expressão em tumores cutâneos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.375035>);

portanto, é possível que a metilação aberrante detectada não tenha impacto no melanoma.

Em seguida, investigamos a função e relação com câncer dos sete genes. Nota-se que há enriquecimento de genes associados ao sistema nervoso e que apenas três genes já foram previamente associados ao câncer (**Quadro 6**). Na literatura científica, não há dados que associem genes relacionados ao sistema nervoso central com a ocorrência de melanoma. Contudo, vale destacar que tanto o sistema nervoso quanto os melanócitos são originários da ectoderme (PATTHEY e GUNHAGA 2014).

**Quadro 6** - Informações sobre os genes diferencialmente metilados em ilha CpG localizada em região promotora nos pacientes de melanoma cutâneo.

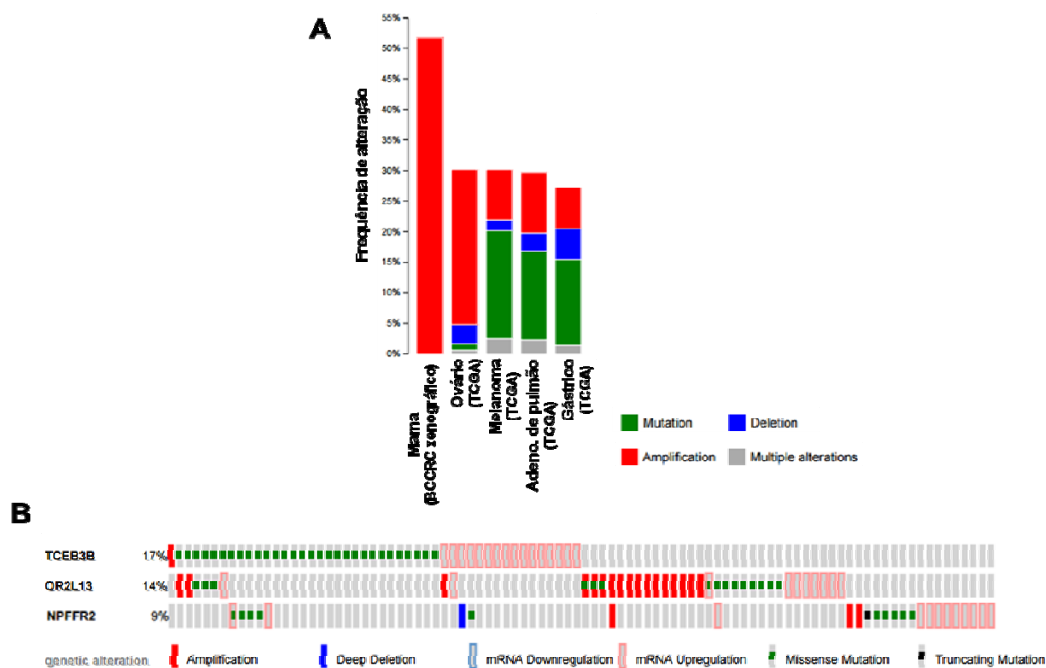
<b>Gene</b>	<b>CHR</b>	<b>Função</b>	<b>Condição no câncer</b>	<b>Referência</b>
<i>ADCY10P1</i>	6	Pseudogene	-	NCBI <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene</a>
<i>DPYSL4</i>	10	Fator indutor de apoptose ativado por p53	Hipermetilado em hepatocarcinoma	KIMURA et al. 2011; SUNG et al. 2011
<i>NLGN2</i>	17	Estabelecimento de sinapse inibitória	-	CHUBYKIN et al. 2007
<i>NPFFR2</i>	4	Modulação da dor e regulação do sistema opióide	Deletado em alguns pacientes de linfoma primário de sistema nervoso central	MOLLEREAU et al. 2005
<i>OR2L13</i>	1	Receptor olfatório	-	NCBI <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene</a>
<i>TCEB3B</i>	18	Fator de alongação da transcrição pela RNA polimerase II específico de testículos	-	ASO et al. 2000
<i>VTRNA2-1</i>	5	RNA não codificante supressor tumoral	Altos níveis de expressão em câncer de tireoide, hipometilado em pacientes de leucemia mielóide aguda com bom prognóstico, hipermetilado em câncer de pulmão de pequenas células, baixa expressão em linhagem celular de câncer de mama	CAO et al. 2013; LEE K et al. 2011; TREPPENDAHL et al. 2012; XIONG et al. 2011; ZHANG et al. 2014

CHR: cromossomo

Com o intuito de avaliar a importância dos setes genes na tumorigênese, investigamos *in silico* suas respectivas frequências de alterações genéticas em dados do cBioPortal. Em 91 estudos de diferentes tipos de câncer disponibilizados pelo cBioPortal, vimos que melanoma está entre os tumores com maior frequência de alteração no grupo de genes investigado (**Figura 14A**). Tendo-se em vista que melanomas cutâneos apresentam elevada taxa de mutação quando comparado a outros tumores sólidos (BERGER et al. 2012), realizamos esta mesma análise em outras três listas de sete genes selecionados aleatoriamente a partir da lista de genes com ilha CpG contemplados na plataforma HM450K, e vimos que melanoma não se encontra entre os tumores com maior frequência de alteração (considerando os cinco primeiros tipos de câncer, ver Anexo 6), sugerindo que nossos dados anteriores não ocorram por acaso. Analisando especificamente os dados de 278 amostras de melanomas cutâneo provenientes do TCGA, os genes mais alterados dentre o grupo de genes que investigamos foram *TCEB3B*, *OR2L13* e *NPFFR2* (**Figura 14B**). Vale destacar que, segundo informação do banco de dados Unigene do NCBI, não há indícios de expressão do gene *TCEB3B* em tumores cutâneos, porém dados do TCGA mostram expressão aberrante deste gene em alguns melanomas. Embora não seja possível discernir nesta análise *in silico* se as alterações genéticas nos sete genes candidatos seriam *passengers* ou *drivers*, os dados apontam para algum papel deste conjunto de genes no desenvolvimento de melanoma.

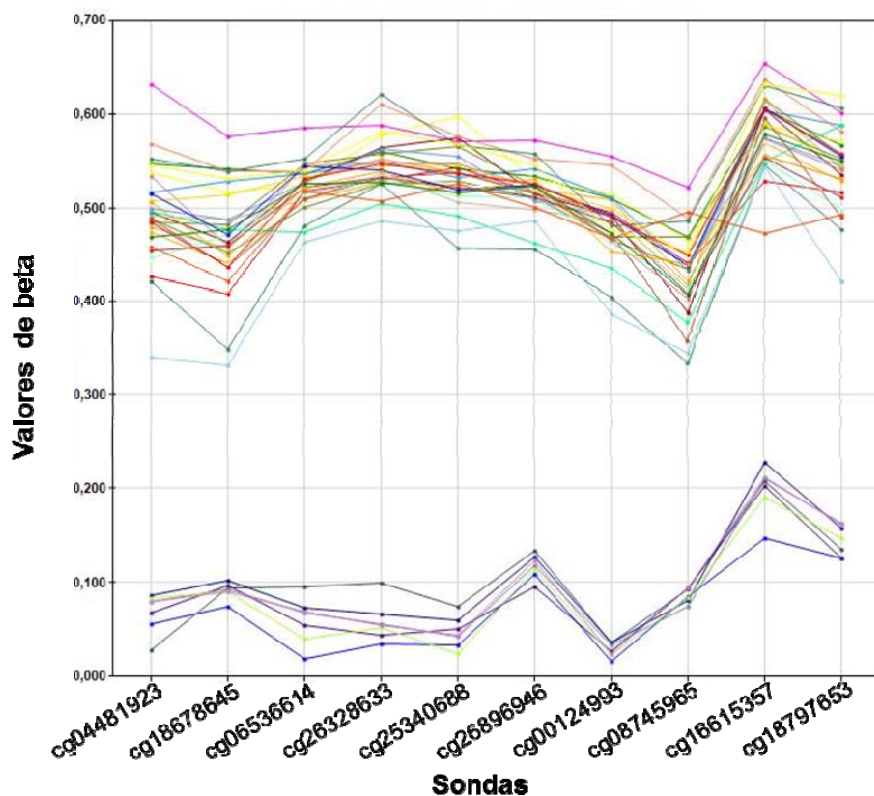
Frente aos dados descritos anteriormente para o gene *TCEB3B*, verificamos seus níveis de metilação na mesma região (promotor + ilha CpG) em 18 amostras de melanoma primário e três culturas primárias de melanócitos (controles), encontrando 88% e 83% de metilação, respectivamente. A hipermetilação neste *locus* pode estar

associada ao silenciamento deste gene em outros tecidos que não testículos, e seria interessante analisar os níveis de metilação deste gene em tumores que o expressam e também no tumor do paciente Mel.6.

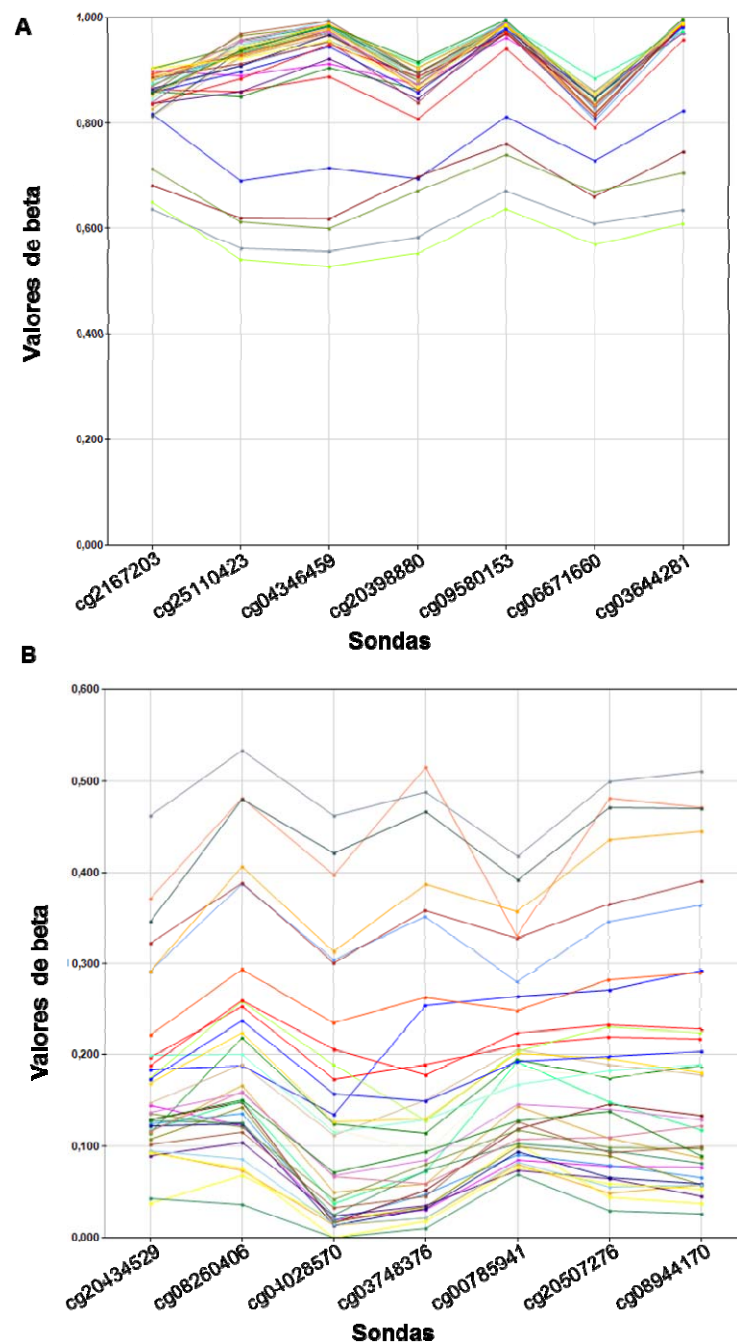


**Figura 14** - Análise *in silico* de genes com níveis alterados de metilação na região promotora em pacientes de melanoma cutâneo comparados aos controles. (A) A frequência de alterações genéticas nos sete genes detectados com metilação aberrante foi verificada em 91 estudos de câncer disponibilizados no cBioPortal e são mostrados apenas os cinco primeiros estudos cujos tumores apresentaram maior frequência de alteração no grupo de genes investigado. (B) Frequência de alterações genéticas nos dados de 278 melanomas cutâneos (retângulos) disponibilizados pelo TCGA no cBioPortal para os 3 genes mais afetados; amostras sem alteração foram excluídas.

A presença de genes com metilação aberrante recorrente entre os pacientes de melanoma (*ADCY10P1*, *OR2L13* e *VTRNA2-1*) foi um interessante achado de nossas análises. Este fato poderia estar associado com a ocorrência de melanoma, mas apenas estudos utilizando um maior número de amostras esclareceria esta hipótese. Entretanto, tendo-se em vista a presença de *VTRNA2-1* entre os genes candidatos, nos questionamos se as alterações de metilação detectadas nestes genes poderiam refletir polimorfismos de metilação, assim como descrito para *VTRNA2-1* (**Figura 15**). Para averiguar tal possibilidade, investigamos o perfil de metilação do gene *OR2L13* e do pseudogene *ADCY10P1* em um grupo controle independente de 36 amostras de sangue periférico (**Figura 16**) utilizando dados obtidos em colaboração com o Instituto de Psiquiatria, Escola de Medicina da Universidade de São Paulo.



**Figura 15** - Níveis de metilação em sítios CpG do gene *VTRNA2-1* em indivíduos controle. A plataforma HM450K (Illumina) contém 10 sondas associadas ao gene *VTRNA2-1* e são mostrados os valores de beta para estas sondas em um grupo controle independente formado por 36 amostras de sangue periférico (dados obtidos em colaboração com o Instituto de Psiquiatria, Escola de Medicina da Universidade de São Paulo). A metilação neste gene constitui um polimorfismo de metilação, no qual 75% dos indivíduos da população geral apresentam hipermetilação em um dos alelos e 25%, apresentam hipometilação (TREPPENDAHL et al. 2012). Dados obtidos no *software* GenomeStudio após extração de ruído e normalização pelos controles internos da plataforma.

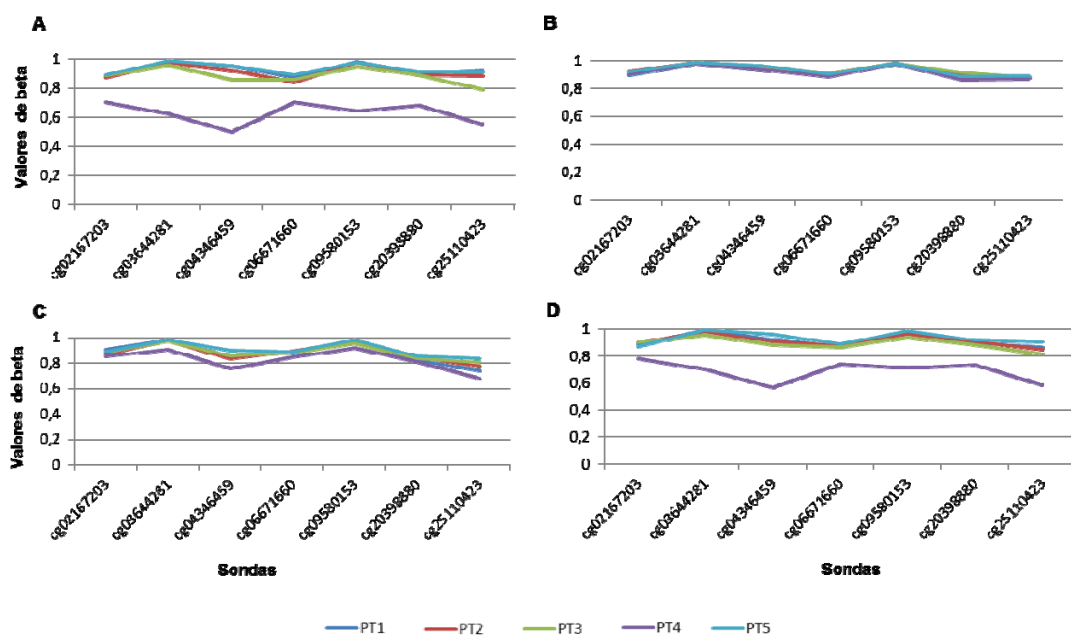


**Figura 16** - Níveis de metilação em sítios CpG de *ADCY10P1* e *OR2L13* em indivíduos controle. A plataforma HM450K (Illumina) contém 7 sondas associadas a cada um dos *loci* (A) *ADCY10P1* e (B) *OR2L13*. São mostrados os valores de beta para estas sondas em um grupo controle independente formado por 36 amostras de sangue periférico (dados fornecidos pelo Instituto de Psiquiatria, Escola de Medicina da Universidade de São Paulo). Dados obtidos no *software* GenomeStudio após extração de ruído e normalização pelos controles internos da plataforma.

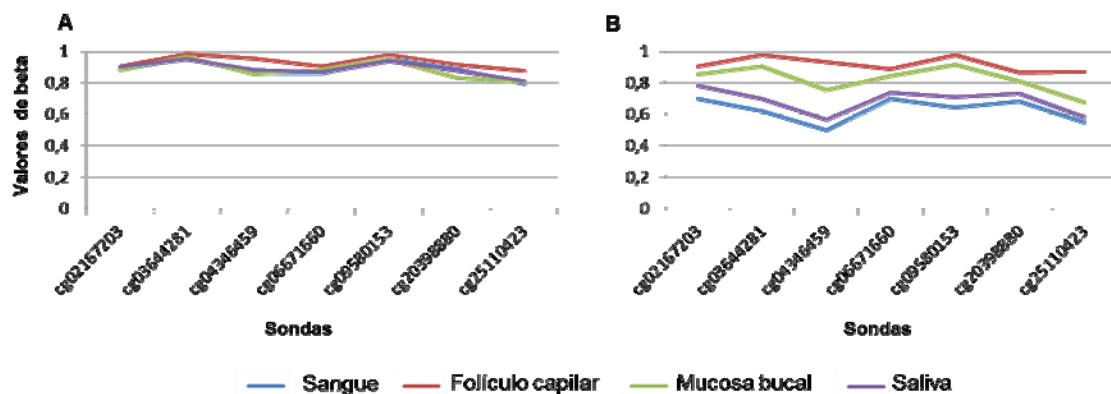


Comparando se o perfil de metilação do gene *VTRNA2-1* com os outros dois *loci*, vemos que o pseudogene *ADCY10P1* assemelha-se ao *VTRNA2-1*, com dois grupos distintos quanto ao perfil de metilação, enquanto para o gene *OR2L3* vemos uma dispersão no nível de metilação, sugerindo que *OR2L3* não apresenta polimorfismo de metilação, e tampouco um padrão único populacional (**Figura 16**). Analisamos então o perfil de metilação do pseudogene *ADCY10P1* em uma segunda amostra independente constituída de vários tecidos periféricos de cinco indivíduos saudáveis utilizando dados disponíveis no NCBI (GSE48472; SLIEKER et al. 2013). Nossa hipótese foi a de que se o pseudogene apresentar polimorfismo de metilação, o mesmo padrão de metilação será visualizado em diferentes tecidos do mesmo indivíduo, semelhante ao descrito para *VTRNA2-1* (PALIWAL et al. 2013).

Na **Figura 17**, vemos que os perfis de metilação do pseudogene *ADCY10P1* em sangue periférico são semelhantes ao de saliva, mas diferente nos demais tecidos periféricos analisados, o que vai contra a hipótese de polimorfismo de metilação no pseudogene. Contudo, nota-se que apenas um indivíduo (PT4) apresenta variação entre os perfis de metilação; e quando comparamos os níveis de metilação nos diferentes tecidos em cada paciente, vemos que o indivíduo PT4 apresenta maior variação de metilação entre os tecidos (**Figura 18**). Adicionalmente, detectamos em nossas análises pacientes com metilação aberrante em vários *loci*: Mel.M3 e Mel.H4 apresentaram alteração em dois genes, e Mel.M6, em três genes. Analisados em conjunto, os dados indicam que alguns indivíduos apresentam naturalmente maior variabilidade no padrão de metilação e existe a possibilidade de que esta característica esteja associada a polimorfismos em genes codificadores de DNA-metiltransferases (POTTER et al. 2013).



**Figura 17** - Níveis de metilação em sítios CpG do pseudogene *ADCY10P1* em diferentes tecidos periféricos. São mostrados os valores de beta para cinco indivíduos (PT1 a 5) em sete sondas do *microarray* HM450K (Illumina) nos seguintes tecidos: (A) sangue, (B) folículo capilar, (C) mucosa bucal e (D) saliva. Foram utilizados dados normalizados disponibilizados no banco público do NCBI, Gene Expression Omnibus, sob o número de acesso GSE54939.



**Figura 18** - Níveis de metilação em sítios CpG do pseudogene *ADCY10P1* em diferentes tecidos periféricos do mesmo indivíduo. São mostrados os valores de beta para dois indivíduos, (A) PT3 e (B) PT4, em sete sondas do *microarray* HM450K (Illumina). Foram utilizados dados normalizados disponibilizados no banco público do NCBI, Gene Expression Omnibus, sob o número de acesso GSE54939.

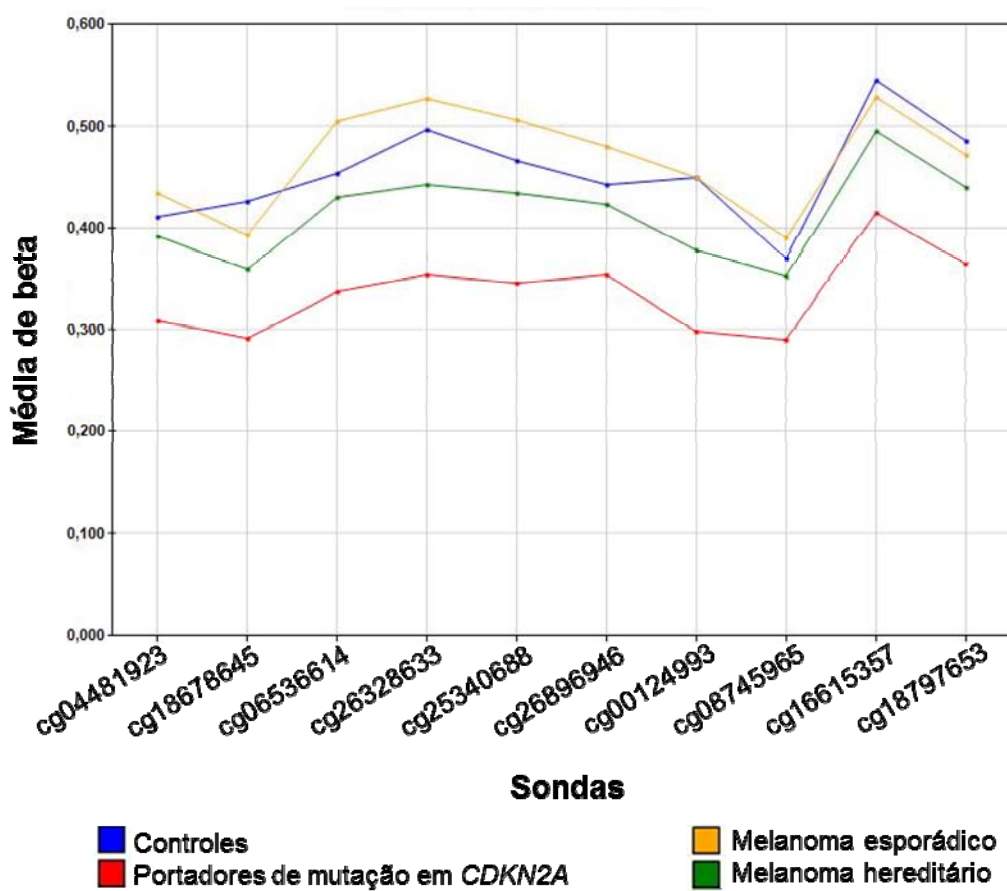
Em resumo, nós avaliamos o padrão de metilação em regiões promotoras com alta densidade de nucleotídeos CpG em cada paciente de melanoma e notamos diferença de metilação de  $\geq 40\%$  em sete *loci* de 17 pacientes. Alguns genes (*DPYSL4*, *NLGN2*, *NPFFR2* e *TCEB3B*) foram identificados como alterados apenas uma vez, principalmente em portadores de mutação em *CDKN2A*, enquanto outros genes (*ADCY10P1*, *OR2L13* e *VTRNA2-1*) estão alterados em vários pacientes. A análise *in silico* indica que tais genes estão frequentemente alterados em melanomas, abrindo a possibilidade de estudos adicionais para investigar o papel destes genes, como *TCEB3BA*, detectado hipermetilado em um paciente de melanoma esporádico e com 17% de alteração genética em amostras de melanoma disponibilizadas pelo TCGA. Entre os *loci* com alteração de metilação recorrente entre os pacientes de melanoma, apenas *VTRNA2-1* tem se mostrado como um polimorfismo de metilação (PALIWAL et al. 2013; TREPPENDAHL et al. 2012), e sua relação com melanoma foi melhor investigada no item 4.6 desta tese, a seguir.

#### **4.6 NÍVEIS DE METILAÇÃO NO GENE *VTRNA2-1* E ASSOCIAÇÃO COM VARIÁVEIS CLÍNICAS EM PACIENTES DE MELANOMA CUTÂNEO**

O gene *VTRNA2-1* foi originalmente denominado miR886 (ou pre-miR-886) devido à captura das sequências maduras miR-886-5p e miR-886-3p em experimentos de sequenciamento massivo. No entanto, experimentos posteriores mostraram que a predita estrutura do pri-886 não seria adequada para a ação da Drosha e o processamento do pre-miR-866 pela Dicer não ocorre de maneira

eficiente (LEE K et al. 2011). Devido a algumas características que o miR886 compartilha com os RNAs do complexo Vault, um complexo ribonucleoproteico que regula vários processos biológicos (BERGER et al. 2009), foi proposto que este gene também fizesse parte deste complexo e passasse a ser chamado *VTRNA2-1*, sendo este o atual nome oficial do gene. Porém, LEE K et al. (2011) demonstraram que *VTRNA2-1* não está associado fisicamente ao complexo Vault, mas se liga a 49 proteínas, dentre elas a PKR; e através da interação com PKR este RNA não codificante atua como supressor de tumor.

A metilação em *VTRNA2-1* ocorre de maneira desigual entre os alelos, de maneira que esta marca epigenética é depositada preferencialmente no alelo de origem materna após a fertilização (ROMANELLI et al. 2014). Em estudo baseado em uma população nórdica, foi demonstrado que 75% da população apresenta metilação em um dos alelos do *VTRNA2-1*, ao passo que 25% apresentam ambos alelos hipometilados; sendo que este segundo grupo apresenta melhor prognóstico quando afetado por leucemia mielóide aguda (TREPPENDAHL et al. 2012). Em nossos dados de *microarray* HM450K, vimos que há separação entre parte dos pacientes de melanoma cutâneo e os indivíduos controle quanto ao padrão de metilação deste gene, sugerindo associação entre níveis mais baixos de metilação em *VTRNA2-1* e a ocorrência de melanoma (**Figura 19**).



**Figura 19** - Padrão de metilação em sítios CpG do gene *VTRNA2-1*. A plataforma HM450K (Illumina) contém 10 sondas associadas ao gene *VTRNA2-1*, as médias dos valores de beta são mostradas para indivíduos sem histórico de câncer (controles, n=12) e pacientes de melanoma (8 portadores de mutação em *CDKN2A*, 12 afetados por melanoma esporádico e 19 de melanoma hereditário sem mutações em *CDKN2A* e *CDK4*). Os dados foram obtidos com *software* GenomeStudio, após extração de ruído e normalização pelos controles internos da plataforma.

Para investigar esta hipótese, analisamos por pirosequenciamento os níveis de metilação em *VTRNA2-1* em uma amostra maior de pacientes de melanoma cutâneo e controles. Foi desenhado um conjunto de *primers* (**Quadro 5** e **Figura 20**) para analisar sete sítios CpG (sendo cinco deles contemplados na plataforma HM450K), mapeados entre 138 e 96pb em relação ao éxon 1 do gene *VTRNA2-1* (ENSG00000270123, identificação de *VTRNA2-1* no Ensembl-

<http://www.ensembl.org/index.html>). Foram analisados 51 indivíduos sem histórico de câncer (grupo controle) e 68 pacientes de melanoma; após exclusão de amostras com coeficiente de variação >10% entre duas replicatas experimentais restaram 43 controles e 50 pacientes.

**chr5:135416187-135416472 (fita minus)**

**Sequência original**

CCAGTGGGTGGATTTTGCCCCCTCCACGGTTCGCGCAGGATGCGGGCGGGAGGAACTGAGAGT  
 CCCTCCAGGACA **CG**TTAGCAGGA **CG**CCTGG **CG**CAGAG **CG**GG **CG**AGAC **CG**CATGA **CG**CAGGCCTCT  
 CGGGGCGGGGAGCACATGCAGCCCGTCCCTCTCCACATCGTCACTCTTCTATGGTTTAGAAGTTTC  
 AGTCGCACACTCCTACCC **GGGT****CGGAGTTAGCTCAAGCGGTTACCTCCTCATGCCGGACTTTCTATC**  
**TGTCCATCTCTGTGCTGGGGT**

**Sequência convertida representando tratamento com bissulfito de sódio**

TTAGTGGGTGGATTTGTTTTTTTTTACGGTTTCGCGTAGGATGCGGGCGGGAGGAATTGAGAGTTT  
 TTTTAGGATA **CG**TTAGTAGGA **CG**TTTTGG **CG**TAGAG **CG**GG **CG**AGAT **CG**TATGA **CG**TAGGTTTTTCGGG  
 GGCGGGGAGTATATGTAGTTCGTTTTTTTTTATATCGTTATTTTTTATGGTTTAGAAGTTTTAGTCGTA  
 TATTTTTATT **CGGGT****CGGAGTTAGTTAAGCGGTTATTTTTTATGT****CGGATTTTTATTGTTTATTTTT**  
**GTGTTGGGGT**

*primer F* → , *primer R* ← , *primer de sequenciamento* ↔ , biotina •

**Figura 20** - Esquema da sequência de DNA amplificada para análise de metilação de sítios CpG do gene *VTRNA2-1* por pirosequenciamento. A localização no genoma e fita do DNA são mostrados. A sequência de DNA foi obtida no UCSC Genome Browser (hg19) e convertida manualmente para representar o tratamento por bissulfito de sódio; os dinucleotídeos CpGs foram preservados. Os sítios CpGs analisados por pirosequenciamento estão destacados em amarelo. Em vermelho, é representado parte do gene *VTRNA2-1*.

A **Tabela 11** apresenta os dados obtidos no pirosequenciamento, mostrando que não foi encontrada diferença significativa de metilação em *VTRNA2-1* entre controles e pacientes. Desta maneira, não detectamos associação entre ocorrência de melanoma cutâneo e nível de metilação de *VTRNA2-1*.

**Tabela 11** - Metilação no gene *VTRNA2-1* e dados gerais dos indivíduos analisados.

	Pacientes	Controles
<b>Nº de indivíduos</b>	50	43
<b>Gênero</b>		
feminino	26	22
masculino	24	21
<b>Idade média (DP)</b>	51 (16)	47 (15)
<b>% metilação (DP)</b>	33 (16)	33 (12)
<b>Status de metilação</b>		
Metilado	41	38
não metilado	9	5
<i>p-value</i>		0,56

DP= desvio padrão; status de metilação: metilado <10% de metilação, não metilado >10% (TREPPENDAHL et al. 2012). Teste de Fisher,  $p < 0,05$ .

Em seguida, investigamos se os níveis de metilação em *VTRNA2-1* (a) diferem entre os grupos de pacientes de melanoma analisados ou (b) são associados às variáveis clínicas dos pacientes de melanoma. Foi encontrada associação estatisticamente significativa entre os níveis de metilação em *VTRNA2-1* e os diferentes grupos de pacientes de melanoma, onde pacientes de melanoma esporádico apresentam maiores níveis de metilação que pacientes de melanoma hereditário (**Tabela 12**). No entanto, quando consideramos os níveis de metilação em *VTRNA2-1* como uma variável categórica (status de metilação: metilado e não metilado), baseado nos limites sugeridos por TREPPENDAHL et al. (2012) para o polimorfismo de metilação neste *locus*, não há diferença significativa entre pacientes

de melanoma hereditário e pacientes de melanoma esporádico ( $p= 1,0$ ; teste de Fisher). Por fim, os níveis de metilação em *VTRNA2-1* não foram associados às variáveis clínicas dos pacientes (**Tabela 12**).

**Tabela 12** - Níveis de metilação em *VTRNA2-1* e características clínicas de pacientes de melanoma cutâneo.

	Metilação em <i>VTRNA2-1</i>			
	N	% (DP)	Status	
			metilado	não metilado
<b>Controles</b>	43	33 (12)	38	5
<b>Grupos de pacientes de melanoma</b>				
esporádico	33	36 (15) <sup>#</sup>	28	5
familiar	12	30 (13) <sup>#</sup>	10	2
portadores de mutação em <i>CDKN2A</i>	5	24 (21)	3	2
<i>p-value</i>		<b>0,04</b>		-
<b>Características clínicas dos pacientes</b>				
<i>número de melanomas</i>				
1	34	34 (16)	28	6
> 1	16	31 (15)	13	3
<i>p-value</i>		0,13		1
<i>Índice de Breslow*</i>				
< 1mm	30	37 (16)	24	6
≥ 1mm	16	40 (11)	15	1
<i>p-value</i>		0,18		0,39
<i>Metástase</i>				
não	34	32 (11)	27	7
sim	10	37 (17)	9	1
<i>p-value</i>		0,43		0,66

N= número de indivíduos; %= porcentagem de metilação; DP= desvio padrão; status de metilação: metilado >10% de metilação, não metilado <10% (TREPPENDAHL et al. 2012); \* índice de Breslow do melanoma de maior estadiamento; # grupos que apresentam diferença estatisticamente significativa; *p-value* <0,05 em negrito. Os níveis de metilação foram comparados utilizando-se teste Kruskal-Wallis seguido de comparações múltiplas de Dunn; o status de metilação foi testado quanto a diferenças utilizando-se teste de Fisher.

Em tumores sólidos, há apenas um trabalho que analisa os níveis de metilação em *VTRNA2-1*. Foi descrita metilação aberrante em 27% dos seguintes casos analisados: tumores de mama, cólon, pulmão e bexiga, sempre em relação ao tecido



normal adjacente (ROMANELLI et al. 2014). Entretanto, a associação desta metilação aberrante com prognóstico da doença não foi explorado. Nós comparamos os níveis de metilação em *VTRNA2-1* entre 14 amostras de melanomas primários e três culturas primárias de melanócitos (controles), e não encontramos diferenças significativas (média de metilação nos melanomas= 30,6%; média de metilação nos melanócitos= 30,4%). Com o intuito de verificar se a metilação em *VTRNA2-1* seria importante durante a progressão tumoral, nós avaliamos a metilação deste gene em seis pares melanomas primários e suas respectivas metástases. Contudo, não foram encontradas diferenças significativas (teste t pareado,  $p= 0,41$ ).

Em síntese, nossos dados sugerem que os níveis de metilação em *VTRNA2-1* não estão associados à ocorrência de melanoma cutâneo. Adicionalmente, avaliamos a associação de três variáveis clínicas com os níveis de metilação de *VTRNA2-1* em sangue periférico de pacientes de melanoma cutâneo, não encontrando associação significativa. Também avaliamos um pequeno número de melanomas cutâneos pareados com suas respectivas metástases, não detectando diferença significativa. Nossos dados não apoiam a hipótese de que a metilação em *VTRNA2-1* constituiria um biomarcador em melanoma cutâneo. Contudo, pacientes de melanoma esporádico apresentaram níveis de metilação em *VTRNA2-1* significativamente maior comparando-se aos pacientes de melanoma hereditário; porém, ambos os grupos apresentam níveis de metilação compatíveis com metilação em um dos alelos de *VTRNA2-1*. Estudos que analisem os níveis de metilação de *VTRNA2-1* em tecido não tumoral de pacientes e em seus respectivos melanomas podem ampliar a compreensão do potencial deste gene no processo de formação do melanoma.

## 4.7 PERFIL DE METILAÇÃO GLOBAL DO GENOMA NO MELANOMA HEREDITÁRIO

### 4.7.1 Pacientes portadores de mutação em *CDKN2A*

Alterações na metilação do DNA podem ocorrer de maneira dependente ou independente do contexto genético (RICHARDS 2006). Naturalmente, mutações que ocorram em genes de controle de mecanismos epigenéticos podem ocasionar metilação aberrante, visto que as funções de adição de grupo metil ou manutenção desta marca são frequentemente comprometidas nestes casos (BERDASCO e ESTELLER 2013). Contudo, a metilação aberrante também pode decorrer de mutações em genes não relacionados ao controle epigenético. Em tumores sólidos, foi relatado que a mutação *BRAF*<sup>V600E</sup> ocasiona alterações globais no perfil de metilação em câncer colorretal (KAMBARA et al. 2004), de tireoide (HOU et al. 2011) e melanoma (HOU et al. 2012). No contexto de predisposição ao câncer, foi demonstrado que a inativação por metilação do gene *MSH2*, detectada em alguns pacientes com síndrome de Lynch, é ocasionada pela deleção do gene *EPCAM*, localizado *upstream* a *MSH2* (LIGTENBERG et al. 2009). Tendo-se em vista que variações genéticas podem ocasionar metilação aberrante, levantamos a hipótese de que a presença de mutações germinativas em gene de predisposição ao câncer poderia alterar o perfil de metilação constitutivo de seu portador. Assim, questionamos se a presença de mutação germinativa em *CDKN2A*, principal gene de predisposição ao melanoma cutâneo, poderia estar associada a uma assinatura epigenética constitutiva em pacientes de melanoma cutâneo.

Dados de metilação de DNA de sangue periférico foram obtidos utilizando o *microarray* de metilação HM450K em pacientes de melanoma portadores de mutação em *CDKN2A* (n=8), pacientes com história de melanoma esporádico (n=8) e indivíduos sem histórico de câncer (n=8). Após pré-processamento dos dados de *microarray*, restaram 470.870 sondas, sendo que 4.708 destas correspondem a 1% de sondas com maior desvio padrão entre os três grupos analisados. A análise estatística SAM para comparação dos três grupos acima listados foi realizada utilizando os valores de metilação desta fração de 1% de sondas mais variáveis, resultando em 166 sítios CpGs diferencialmente metilados (**Tabela 13**).

**Tabela 13** - Análise SAM comparando os níveis de metilação de 1% de sondas com maior variabilidade entre pacientes de melanoma cutâneo portadores ou não de mutação em *CDKN2A* e indivíduos sem histórico de câncer.

Sonda (HM450K)	CHR	Coordenada genômica (hg19)	Valor de beta			Score esperado	Score observado	Gene <sup>a</sup>	SNP no sítio CpG <sup>b</sup>	Elemento repetitivo <sup>a,b</sup>
			portadores de mutação em <i>CDKN2A</i>	pacientes de melanoma esporádico <sup>d</sup>	Controles					
cg03476105	7	96770912	0,72	0,17	0,49	0,14	1,81	<i>ACN9</i>	-	tRNA-Lys-AAG
cg13447813 <sup>c</sup>	10	88756580	0,77	0,42	0,65	0,35	1,16	<i>AGAP11</i>	-	-
cg21581312 <sup>c</sup>	15	35529473	0,62	0,23	0,77	0,21	1,13	<i>ANP32AP1</i>	-	-
cg10493270 <sup>c</sup>	11	120251845	0,62	0,21	0,42	0,28	1,38	<i>ARHGEF12</i>	-	LINE
cg18402991 <sup>c</sup>	4	76958054	0,83	0,37	0,89	0,19	1,33	<i>ART3;CXCL11</i>	-	-
cg20627546 <sup>c</sup>	1	1451383	0,84	0,4	0,72	0,24	1,43	<i>ATAD3A</i>	-	-
cg02568557 <sup>c</sup>	11	129288930	0,7	0,22	0,73	0,18	1,62	<i>BARX2</i>	-	MER6A
cg01963573 <sup>c</sup>	6	107388925	0,85	0,38	0,89	0,22	1,54	<i>BEND3</i>	-	-
cg24955546 <sup>c</sup>	6	107391213	0,69	0,34	0,67	0,23	1,09	<i>BEND3</i>	rs3814072	-
cg14853443 <sup>c</sup>	6	32375447	0,53	0,18	0,69	0,33	1,21	<i>BTNL2</i>	-	LTR
cg09608008	11	66529885	0,86	0,39	0,73	0,2	1,45	<i>C11orf80</i>	-	-
cg11057824 <sup>c</sup>	14	50471938	0,68	0,31	0,82	0,26	1,04	<i>C14orf182</i>	-	-
cg27323430 <sup>c</sup>	5	126387527	0,85	0,46	0,34	0,3	1,3	<i>C5ORF63</i>	-	-
cg00397871 <sup>c</sup>	7	31692686	0,84	0,44	0,85	0,27	1,35	<i>CCDC129</i>	-	LINE
cg20963267 <sup>c</sup>	11	85568704	0,75	0,41	0,64	0,44	1,07	<i>CCDC83</i>	-	-
cg08066417 <sup>c</sup>	16	66413098	0,49	0,15	0,29	0,51	1,09	<i>CDH5</i>	-	LTR
cg02424007 <sup>c</sup>	6	110967726	0,91	0,39	0,85	0,17	1,82	<i>CDK19</i>	-	-
cg05157492 <sup>c</sup>	6	31698734	0,66	0,28	0,58	0,32	1,26	<i>CLIC1;DDAH2</i>	-	-
cg24141198 <sup>c</sup>	1	115259970	0,57	0,19	0,8	0,27	1,27	<i>CSDE1;NRAS</i>	-	-
cg15208247 <sup>c</sup>	1	244857838	0,81	0,38	0,73	0,23	1,43	<i>DESI2</i>	-	-
cg17204652 <sup>c</sup>	2	233252706	0,64	0,28	0,84	0,21	1,22	<i>ECEL1P2</i>	-	-
cg26309498 <sup>c</sup>	2	109607038	0,78	0,42	0,5	0,56	1,1	<i>EDAR</i>	-	SINE
cg07922204	17	28395674	0,87	0,53	0,73	0,56	1,21	<i>EFCAB5</i>	-	-
cg18803079 <sup>c</sup>	1	64014643	0,55	0,15	0,77	0,21	1,24	<i>EFCAB7;DLEU2L</i>	-	-
cg23015327 <sup>c</sup>	17	292975	0,78	0,45	0,63	0,5	1,18	<i>FAM101B</i>	-	-
cg02711724 <sup>c</sup>	8	130877076	0,72	0,12	0,63	0,12	1,99	<i>FAM49B</i>	-	-
cg10665123 <sup>c</sup>	3	192271706	0,66	0,32	0,58	0,45	1,2	<i>FGF12</i>	-	LINE
cg13657659 <sup>c</sup>	2	208632393	0,85	0,32	0,7	0,15	1,55	<i>FZD5</i>	-	-
cg12946560 <sup>c</sup>	15	90892448	0,91	0,51	0,89	0,28	1,5	<i>GABARAPL3</i>	-	-
cg01385862 <sup>c</sup>	1	35227029	0,66	0,31	0,69	0,28	1,05	<i>GJB4</i>	-	-
cg01905902 <sup>c</sup>	12	100550995	0,75	0,37	0,44	0,27	1,13	<i>GOLGA2L1</i>	rs12370675	-
cg26112390	12	100550390	0,81	0,43	0,71	0,3	1,4	<i>GOLGA2P5</i>	-	-
cg09622330 <sup>c</sup>	16	10205262	0,76	0,39	0,75	0,29	1,17	<i>GRIN2A</i>	-	-
cg11141652	22	24348549	0,68	0,12	0,74	0,13	1,3	<i>GSTTP1</i>	-	-
cg26097381 <sup>c</sup>	6	31779598	0,78	0,26	0,85	0,15	1,54	<i>HSPA1L</i>	-	-
cg17983571 <sup>c</sup>	10	65186953	0,73	0,2	0,74	0,14	1,53	<i>JMJD1C</i>	-	-
cg08585897 <sup>c</sup>	16	75680535	0,8	0,17	0,44	0,1	2,04	<i>KARS;TERF2IP</i>	-	-
cg25748121 <sup>c</sup>	18	44541383	0,51	0,17	0,65	0,47	1,15	<i>KATNAL2</i>	-	HERVE-int
cg21400851 <sup>c</sup>	17	73056681	0,89	0,38	0,44	0,16	1,48	<i>KCTD2</i>	-	-
cg12981595 <sup>c</sup>	17	39254427	0,8	0,41	0,66	0,31	1,25	<i>KRTAP4-8</i>	-	-
cg02414646 <sup>c</sup>	10	4720653	0,59	0,14	0,75	0,22	1,51	<i>LOC100216001</i>	-	LTR
cg03458633 <sup>c</sup>	10	4720663	0,55	0,19	0,78	0,41	1,26	<i>LOC100216001</i>	-	LTR
cg08270240	19	21933659	0,91	0,57	0,9	0,42	1,08	<i>LOC641367;ZNF100</i>	-	-
cg17678343	2	108443292	0,71	0,4	0,79	0,26	1,1	<i>LOC729121;RGPD4</i>	-	-
cg18440777 <sup>c</sup>	11	68157499	0,86	0,5	0,65	0,36	1,3	<i>LRP5</i>	-	-
cg27457921 <sup>c</sup>	17	43976811	0,76	0,3	0,58	0,2	1,51	<i>MAPT</i>	-	SINE
cg16026647	17	15689920	0,72	0,36	0,64	0,22	1,09	<i>MEIS3P1</i>	-	-
cg15040616 <sup>c</sup>	6	46801218	0,87	0,53	0,91	0,49	1,06	<i>MEP1A</i>	rs62622418	-
cg20361427	7	7610535	0,62	0,3	0,71	0,61	1,07	<i>MIOS</i>	-	MER1A
cg03609493	4	11370314	0,44	0,1	0,41	0,26	1,09	<i>MIR572</i>	-	-
cg19484299 <sup>c</sup>	2	234775274	0,74	0,27	0,63	0,18	1,3	<i>MSL3L2</i>	-	-
cg07730007 <sup>c</sup>	12	107377277	0,78	0,41	0,8	0,31	1,15	<i>MTERFD3</i>	-	-
cg03840908 <sup>c</sup>	17	79905152	0,57	0,22	0,48	0,36	1,13	<i>MYADML2</i>	-	MER21C
cg07074586 <sup>c</sup>	12	56555325	0,67	0,3	0,48	0,26	1,17	<i>MYL6;MYL6</i>	-	-
cg10318313	11	3014937	0,7	0,27	0,67	0,25	1,39	<i>NAP1L4</i>	-	SINE
cg07917842	17	29672644	0,6	0,24	0,64	0,31	1,21	<i>NF1</i>	-	-
cg11792281 <sup>c</sup>	17	26443366	0,72	0,08	0,81	0,08	1,91	<i>NLK</i>	-	-

Cont/ Tabela 13

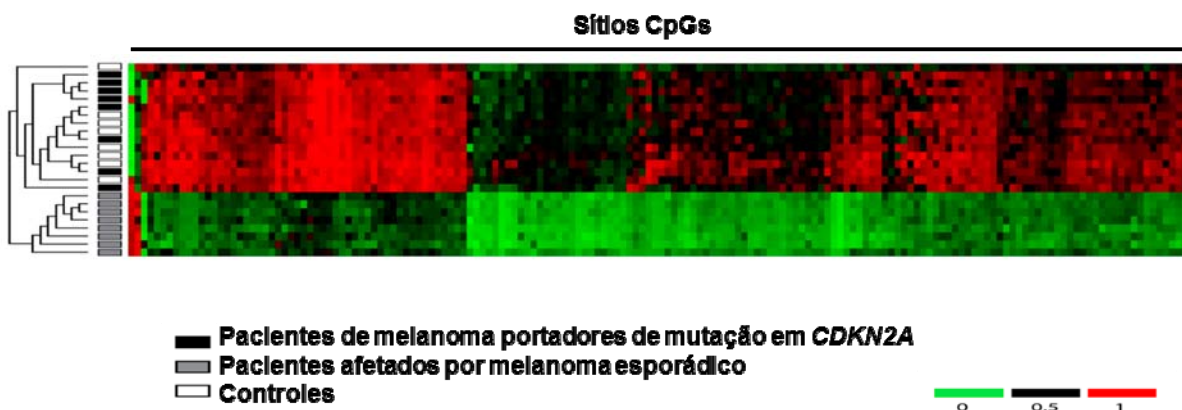
Sonda (HM450K)	CHR	Coordenada genômica (hg19)	Valor de beta		Score esperado	Score observado	Gene <sup>a</sup>	SNP no sítio CpG <sup>b</sup>	Elemento repetitivo <sup>a,b</sup>	
			portadores de mutação em	pacientes de melanoma esporádico						
			<i>CDKN2A</i>	Controles						
cg13701509 <sup>c</sup>	5	170833685	0,8	0,43	0,61	0,29	1,15	<i>NPM1</i>	-	-
cg04487904 <sup>c</sup>	5	176693341	0,87	0,52	0,75	0,31	1,12	<i>NSD1</i>	-	-
cg00934735 <sup>c</sup>	5	180582587	0,76	0,39	0,86	0,36	1,26	<i>OR2V2</i>	-	-
cg18195986 <sup>c</sup>	12	53848593	0,87	0,42	0,8	0,21	1,62	<i>PCBP2</i>	-	-
cg25641223	6	165747945	0,44	0,89	0,48	0,19	1,09	<i>PDE10A</i>	-	-
cg06012730 <sup>c</sup>	15	75315579	0,66	0,26	0,37	0,29	1,3	<i>PPCDC</i>	-	-
cg06790069 <sup>c</sup>	1	40203513	0,68	0,27	0,77	0,22	1,25	<i>PPIE</i>	-	LTR
cg24192846	6	30037773	0,69	0,24	0,38	0,2	1,21	<i>PPP1R11</i>	-	-
cg14952920 <sup>c</sup>	9	138379838	0,75	0,34	0,64	0,23	1,07	<i>PPP1R26</i>	-	-
cg17896229 <sup>c</sup>	20	5294595	0,62	0,23	0,77	0,25	1,24	<i>PROKR2</i>	-	-
cg06251958	7	102989081	0,68	0,34	0,85	0,44	1,05	<i>PSMC2</i>	-	-
cg11309891 <sup>c</sup>	11	73388802	0,77	0,38	0,88	0,27	1,21	<i>RAB6A</i>	-	-
cg13284070 <sup>c</sup>	3	128483832	0,62	0,19	0,47	0,19	1,21	<i>RAB7A</i>	-	-
cg09797837 <sup>c</sup>	1	17734771	0,75	0,36	0,82	0,27	1,32	<i>RCC2</i>	-	-
cg19371097 <sup>c</sup>	1	17735001	0,87	0,52	0,66	0,4	1,06	<i>RCC2</i>	-	-
cg01973725 <sup>c</sup>	5	80608537	0,88	0,53	0,68	0,37	1,12	<i>RNU5E;RNU5D;ZCCHC9</i>	-	-
cg18642567 <sup>c</sup>	14	21755798	0,74	0,39	0,54	0,35	1,1	<i>RPGRIPI</i>	-	-
cg15815375 <sup>c</sup>	20	17594530	0,8	0,37	0,73	0,24	1,25	<i>RRBP1</i>	-	-
cg05790002 <sup>c</sup>	16	82033681	0,65	0,25	0,74	0,25	1,2	<i>SDR42E1</i>	-	-
cg11402396	10	13364856	0,74	0,37	0,53	0,32	1,26	<i>SEPHS1</i>	-	-
cg11320438 <sup>c</sup>	19	50458233	0,82	0,48	0,79	0,64	1,09	<i>SIGLEC11</i>	-	HERV3-int
cg00618291 <sup>c</sup>	1	2234291	0,89	0,52	0,77	0,38	1,12	<i>SKI</i>	-	-
cg03860054 <sup>c</sup>	16	55691102	0,69	0,29	0,79	0,26	1,34	<i>SLC6A2</i>	-	-
cg27184249 <sup>c</sup>	1	38010230	0,92	0,56	0,78	0,39	1,22	<i>SNIP1</i>	-	-
cg06243989 <sup>c</sup>	15	25425615	0,58	0,21	0,73	0,26	1,16	<i>SNORD115-6</i>	-	-
cg15477139	15	25223633	0,7	0,34	0,64	0,46	1,07	<i>SNRPN;SNURF</i>	-	-
cg21610999 <sup>c</sup>	17	8661909	0,68	0,27	0,5	0,23	1,35	<i>SPDYE4</i>	-	-
cg01011918 <sup>c</sup>	1	153013573	0,73	0,4	0,71	0,4	1,97	<i>SPRR2D</i>	-	-
cg02718464 <sup>c</sup>	13	41384019	0,83	0,39	0,88	0,22	1,32	<i>UGT1L1;SLC25A15;MIR62.</i>	-	-
cg19422253 <sup>c</sup>	3	149212391	0,56	0,24	0,54	0,39	1,06	<i>TM4SF4</i>	-	-
cg00070715	5	138862796	0,56	0,23	0,34	0,37	1,08	<i>TMEM173</i>	-	SINE
cg17008454 <sup>c</sup>	5	118724372	0,74	0,36	0,59	0,33	1,23	<i>TNFAIP8</i>	-	SINE
cg11963436 <sup>c</sup>	10	93567261	0,51	0,11	0,76	0,21	1,15	<i>TNKS2</i>	-	-
cg19912736	10	93567154	0,94	0,58	0,92	0,4	1,311	<i>TNKS2</i>	-	-
cg15198344 <sup>c</sup>	19	48304772	0,83	0,47	0,86	0,49	1,03	<i>TPRX1</i>	-	-
cg12720152 <sup>c</sup>	14	91087476	0,73	0,29	0,7	0,26	1,23	<i>TTC7B</i>	-	-
cg01123250 <sup>c</sup>	2	210673545	0,65	0,18	0,51	0,16	1,37	<i>UNC80</i>	-	-
cg04383836 <sup>c</sup>	17	9559049	0,59	0,19	0,74	0,26	1,12	<i>USP43</i>	-	LINE
cg10907356 <sup>c</sup>	2	17830694	0,89	0,53	0,65	0,42	1,29	<i>YSNL1</i>	-	-
cg11807153 <sup>c</sup>	5	140098496	0,48	0,16	0,71	0,52	1,04	<i>VTRNA1-2</i>	-	-
cg18030105 <sup>c</sup>	11	3396237	0,77	0,32	0,65	0,22	1,54	<i>ZNF195</i>	-	-
cg25477163 <sup>c</sup>	19	58147078	0,57	0,15	0,78	0,25	1,35	<i>ZNF211</i>	-	LINE
cg23088989	10	38301786	0,8	0,46	0,89	0,44	1,03	<i>ZNF33A</i>	-	-
cg11564652 <sup>c</sup>	19	9761193	0,58	0,15	0,54	0,21	1,42	<i>ZNF562</i>	rs79483027	-
cg18651544	19	52838984	0,85	0,44	0,88	0,23	1,29	<i>ZNF610</i>	-	-
cg09607178 <sup>c</sup>	6	29978432	0,77	0,32	0,8	0,2	1,42	<i>ZNRD1-AS1</i>	-	-
cg00316520 <sup>c</sup>	3	197837441	0,75	0,37	0,8	0,27	1,2	-	-	-
cg00882175 <sup>c</sup>	4	4143170	0,85	0,45	0,6	0,29	1,31	-	-	-
cg01339959 <sup>c</sup>	2	184125517	0,95	0,47	0,75	0,19	1,6	-	-	-
cg01372694 <sup>c</sup>	7	65878352	0,63	0,22	0,79	0,23	1,31	-	-	-
cg01381374 <sup>c</sup>	7	93474158	0,72	0,28	0,8	0,22	1,3	-	-	-
cg02035102 <sup>c</sup>	7	23603991	0,64	0,27	0,6	0,38	1,2	-	-	-
cg02406531 <sup>c</sup>	5	102559788	0,71	0,36	0,72	0,35	1,12	-	-	LINE
cg02611874 <sup>c</sup>	10	46194725	0,75	0,33	0,7	0,24	1,29	-	-	-
cg04683418	17	21848728	0,93	0,58	0,78	0,46	1,32	-	-	-
cg04791162 <sup>c</sup>	14	62331287	0,53	0,19	0,68	0,24	1,01	-	-	-
cg05112967 <sup>c</sup>	7	63353492	0,67	0,21	0,28	0,19	1,47	-	-	-

Cont/ Tabela 13

Sonda (HM450K)	CHR	Coordenada genômica (hg19)	Valor de beta		Score esperado	Score observado	Gene <sup>a</sup>	SNP no sítio CpG <sup>b</sup>	Elemento repetitivo <sup>a,b</sup>	
			portadores de mutação em	pacientes de						
			<i>CDKN2A</i>	melanoma esporádico						
cg13701509 <sup>c</sup>	5	170833685	0,8	0,43	0,61	0,29	1,15	<i>NPM1</i>	-	-
cg04487904 <sup>c</sup>	5	176693341	0,87	0,52	0,75	0,31	1,12	<i>NSD1</i>	-	-
cg00934735 <sup>c</sup>	5	180582587	0,76	0,39	0,86	0,36	1,26	<i>OR2V2</i>	-	-
cg18195986 <sup>c</sup>	12	53848593	0,87	0,42	0,8	0,21	1,62	<i>PCBP2</i>	-	-
cg25641223	6	165747945	0,44	0,89	0,48	0,19	1,09	<i>PDE10A</i>	-	-
cg06012730 <sup>c</sup>	15	75315579	0,66	0,26	0,37	0,29	1,3	<i>PPCDC</i>	-	-
cg06790069 <sup>c</sup>	1	40203513	0,68	0,27	0,77	0,22	1,25	<i>PP1E</i>	-	LTR
cg24192846	6	30037773	0,69	0,24	0,38	0,2	1,21	<i>PPP1R11</i>	-	-
cg14952920 <sup>c</sup>	9	138379838	0,75	0,34	0,64	0,23	1,07	<i>PPP1R26</i>	-	-
cg17896229 <sup>c</sup>	20	5294595	0,62	0,23	0,77	0,25	1,24	<i>PROKR2</i>	-	-
cg06251958	7	102989081	0,68	0,34	0,85	0,44	1,05	<i>PSMC2</i>	-	-
cg11309891 <sup>c</sup>	11	73388802	0,77	0,38	0,88	0,27	1,21	<i>RAB6A</i>	-	-
cg13284070 <sup>c</sup>	3	128483832	0,62	0,19	0,47	0,19	1,21	<i>RAB7A</i>	-	-
cg09797837 <sup>c</sup>	1	17734771	0,75	0,36	0,82	0,27	1,32	<i>RCC2</i>	-	-
cg19371097 <sup>c</sup>	1	17735001	0,87	0,52	0,66	0,4	1,06	<i>RCC2</i>	-	-
cg01973725 <sup>c</sup>	5	80608537	0,88	0,53	0,68	0,37	1,12	<i>RNU5E;RNU5D;ZCCHC9</i>	-	-
cg18642567 <sup>c</sup>	14	21755798	0,74	0,39	0,54	0,35	1,1	<i>RPGRIPI</i>	-	-
cg15815375 <sup>c</sup>	20	17594530	0,8	0,37	0,73	0,24	1,25	<i>RRBP1</i>	-	-
cg05790002 <sup>c</sup>	16	82033681	0,65	0,25	0,74	0,25	1,2	<i>SDR42E1</i>	-	-
cg11402396	10	13364856	0,74	0,37	0,53	0,32	1,26	<i>SEPHS1</i>	-	-
cg11320438 <sup>c</sup>	19	50458233	0,82	0,48	0,79	0,64	1,09	<i>SIGLEC11</i>	-	HERV3-int
cg00618291 <sup>c</sup>	1	2234291	0,89	0,52	0,77	0,38	1,12	<i>SKI</i>	-	-
cg03860054 <sup>c</sup>	16	55691102	0,69	0,29	0,79	0,26	1,34	<i>SLC6A2</i>	-	-
cg27184249 <sup>c</sup>	1	38010230	0,92	0,56	0,78	0,39	1,22	<i>SNIP1</i>	-	-
cg06243989 <sup>c</sup>	15	25425615	0,58	0,21	0,73	0,26	1,16	<i>SNORD115-6</i>	-	-
cg15477139	15	25223633	0,7	0,34	0,64	0,46	1,07	<i>SNRPN;SNURF</i>	-	-
cg21610999 <sup>c</sup>	17	8661909	0,68	0,27	0,5	0,23	1,35	<i>SPDYE4</i>	-	-
cg01011918 <sup>c</sup>	1	153013573	0,73	0,4	0,71	0,4	1,97	<i>SPRR2D</i>	-	-
cg02718464 <sup>c</sup>	13	41384019	0,83	0,39	0,88	0,22	1,32	<i>UGT1L1;SLC25A15;MIR62</i>	-	-
cg19422253 <sup>c</sup>	3	149212391	0,56	0,24	0,54	0,39	1,06	<i>TM4SF4</i>	-	-
cg00070715	5	138862796	0,56	0,23	0,34	0,37	1,08	<i>TMEM173</i>	-	SINE
cg17008454 <sup>c</sup>	5	118724372	0,74	0,36	0,59	0,33	1,23	<i>TNFAIP8</i>	-	SINE
cg11963436 <sup>c</sup>	10	93567261	0,51	0,11	0,76	0,21	1,15	<i>TNKS2</i>	-	-
cg19912736	10	93567154	0,94	0,58	0,92	0,4	1,311	<i>TNKS2</i>	-	-
cg15198344 <sup>c</sup>	19	48304772	0,83	0,47	0,86	0,49	1,03	<i>TPRX1</i>	-	-
cg12720152 <sup>c</sup>	14	91087476	0,73	0,29	0,7	0,26	1,23	<i>TTC7B</i>	-	-
cg01123250 <sup>c</sup>	2	210673545	0,65	0,18	0,51	0,16	1,37	<i>UNC80</i>	-	-
cg04383836 <sup>c</sup>	17	9559049	0,59	0,19	0,74	0,26	1,12	<i>USP43</i>	-	LINE
cg10907356 <sup>c</sup>	2	17830694	0,89	0,53	0,65	0,42	1,29	<i>YSNL1</i>	-	-
cg11807153 <sup>c</sup>	5	140098496	0,48	0,16	0,71	0,52	1,04	<i>VTRNA1-2</i>	-	-
cg18030105 <sup>c</sup>	11	3396237	0,77	0,32	0,65	0,22	1,54	<i>ZNF195</i>	-	-
cg25477163 <sup>c</sup>	19	58147078	0,57	0,15	0,78	0,25	1,35	<i>ZNF211</i>	-	LINE
cg23089899	10	38301786	0,8	0,46	0,89	0,44	1,03	<i>ZNF33A</i>	-	-
cg11564652 <sup>c</sup>	19	9761193	0,58	0,15	0,54	0,21	1,42	<i>ZNF562</i>	rs79483027	-
cg18651544	19	52838984	0,85	0,44	0,88	0,23	1,29	<i>ZNF610</i>	-	-
cg09607178 <sup>c</sup>	6	29978432	0,77	0,32	0,8	0,2	1,42	<i>ZNRD1-AS1</i>	-	-
cg00316520 <sup>c</sup>	3	197837441	0,75	0,37	0,8	0,27	1,2	-	-	-
cg00882175 <sup>c</sup>	4	4143170	0,85	0,45	0,6	0,29	1,31	-	-	-
cg01339959 <sup>c</sup>	2	184125517	0,95	0,47	0,75	0,19	1,6	-	-	-
cg01372694 <sup>c</sup>	7	65878352	0,63	0,22	0,79	0,23	1,31	-	-	-
cg01381374 <sup>c</sup>	7	93474158	0,72	0,28	0,8	0,22	1,3	-	-	-
cg02035102 <sup>c</sup>	7	23603991	0,64	0,27	0,6	0,38	1,2	-	-	-
cg02406531 <sup>c</sup>	5	102559788	0,71	0,36	0,72	0,35	1,12	-	-	LINE
cg02611874 <sup>c</sup>	10	46194725	0,75	0,33	0,7	0,24	1,29	-	-	-
cg04683418	17	21848728	0,93	0,58	0,78	0,46	1,32	-	-	-
cg04791162 <sup>c</sup>	14	62331287	0,53	0,19	0,68	0,24	1,01	-	-	-
cg05112967 <sup>c</sup>	7	63353492	0,67	0,21	0,28	0,19	1,47	-	-	-

CHR= cromossomo. <sup>a</sup> analisado no UCSC Genome Browser; <sup>b</sup> de acordo com PRICE et al. (2013);  
<sup>c</sup> sítios CpG que representam níveis de metilação variável de acordo com a população sanguínea  
(JAFFE e IRIZARRY 2014).

A *clusterização* hierárquica não supervisionada realizada com os valores de metilação deste grupo de 166 CpGs mostra que estes sítios são capazes de diferenciar os pacientes afetado por melanoma esporádico dos demais grupos analisados, sendo possível notar que aqueles pacientes apresentam hipometilação (**Figura 21**).



**Figura 21** - *Cluster* hierárquico não supervisionado construído a partir de CpGs detectados como diferencialmente metilados entre grupos de pacientes de melanoma cutâneo e controles. Foram utilizados os valores de metilação de 166 sítios CpG obtidos com *microarray* HM450K (Illumina) e detectados como diferencialmente metilados por SAM. A barra à direita indica o nível de metilação (0-verde = não metilado, 1-vermelho = metilado).

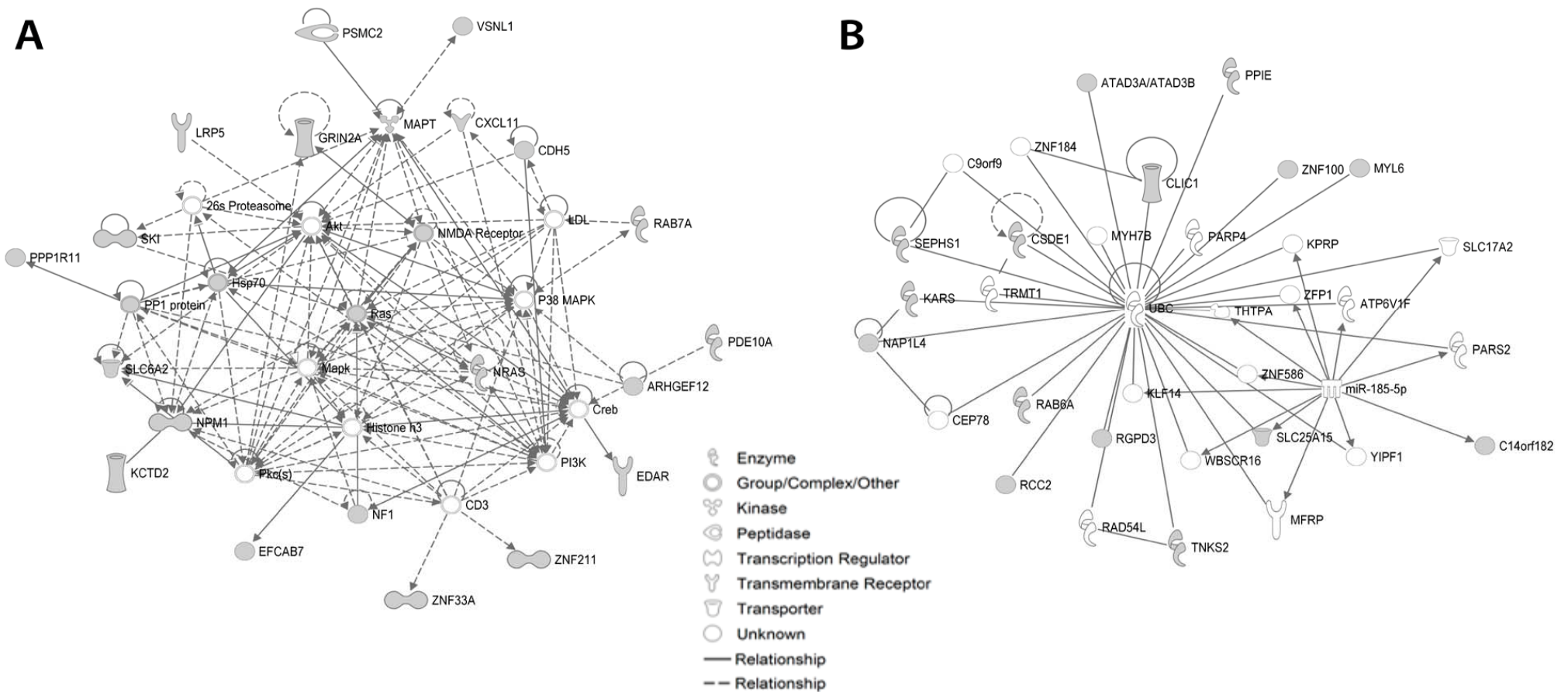
Estudos prévios realizados em sangue periférico relataram a hipometilação do DNA como um fator de risco ao desenvolvimento de câncer, pois a hipometilação de leucócitos (a) foi detectada mesmo antes do diagnóstico do tumor e (b) poderia refletir uma condição sistêmica favorável ao câncer (FRISO et al. 2013; WOO e KIM 2012). Contudo, este perfil consistente de hipometilação em nossos dados não foi detectado nos pacientes portadores de mutação em *CDKN2A*, sugerindo que as diferenças no perfil de metilação detectadas entre estes dois grupos poderiam ser reflexo de diferenças na etiologia do melanoma (hereditário versus esporádico).

Há também a possibilidade de que diferenças quanto ao tempo existente entre a coleta do sangue e a presença de melanoma no paciente (sobrevida livre de doença, dado reportado nos **Quadros 1, 2 e 3**) influenciem os níveis de metilação detectados em sangue periférico. De acordo com JAFFE e IRIZARRY (2014), a composição de células sanguíneas pode ser fonte de variabilidade dos níveis de metilação. Desta maneira, a ocorrência de melanoma poderia alterar a proporção das subpopulações de células sanguíneas, o que seria mais evidente em pacientes cujo sangue periférico houvesse sido coletado mais próximo à ocorrência do tumor - e este é o caso do grupo aqui estudado de pacientes de melanoma esporádico (ver **Quadro 1 e 3**). Identificamos que a maioria dos CpGs detectados como hipometilados (n=130) em pacientes de melanoma esporádico está sujeita à variabilidade nos níveis de metilação em decorrência de heterogeneidade na composição da população sanguínea. KOESTLER et al. (2012) apontaram 50 sondas cujo padrão de metilação constituiria uma assinatura epigenética em leucócitos de pacientes de tumores sólidos (câncer de cabeça, pescoço, bexiga e ovário). Contudo, não há sobreposição entre as sondas propostas por KOESTLER et al. (2012) e nosso conjunto de 166 sondas. Desta maneira, é possível que pacientes de melanoma apresentem um perfil de metilação em leucócito diferente do descrito para outros tumores sólidos. Após a publicação dos resultados referentes a este estudo (DE ARAÚJO et al. 2014), nós estimamos a proporção de seis tipos celulares (linfócitos B, linfócitos T CD4 e CD8 positivos, células *natural killers*, monócitos e granulócitos) utilizando o pacote FlowSorted.Blood.450k (JAFFE e IRIZARRY 2014). Foi encontrado, em média, uma diferença na proporção de células sanguíneas de 1,7% (desvio padrão de 1,6) entre pacientes de melanoma e controles, e 1,8% (desvio padrão de 0,7) entre



pacientes afetados por melanoma esporádico e pacientes portadores de mutação em *CDKN2A*, favorecendo a hipótese de heterogeneidade de células sanguíneas entre as amostras analisadas.

Grande parte dos CpGs detectados como diferencialmente metilados entre os três grupos (115 CpGs) estão mapeados em sequências associadas a 110 genes, quatro destes já associados a melanoma: (a) *NRAS*, oncogene mutado em mais de 20% dos melanomas cutâneos (FEDORENKO et al. 2013); (b) *CDH5*, que apresenta elevados níveis de expressão em linhagens celulares de melanomas agressivos (HENDRIX et al. 2001); (c) *SKI*, gene supressor de tumor, mas com altos níveis de expressão associados com progressão do melanoma (REED et al. 2005); e (d) *GRING2*, frequentemente mutado em melanoma e associado à progressão tumoral (WEI et al. 2011; PRICKETT e SAMUELS 2012). A análise *in silico* utilizando IPA mostrou que as principais vias biológicas associadas a este grupo de 110 genes são: Extensão do telômero pela telomerase, Mecanismos moleculares do câncer e Sinalização por CDK5. A rede biológica de maior relevância gerada pelo IPA conecta 21 genes associados aos CpGs diferencialmente metilados, adicionando outros 10 genes; esta rede é relacionada ao Desenvolvimento embrionário, Desenvolvimento de órgãos e Desenvolvimento de organismo (**Figura 22A**). Outra rede, com 20 genes diferencialmente metilados, é relacionada ao Desenvolvimento e função de pele e cabelo, Morfologia de órgãos, e Desenvolvimento e função do sistema digestório (**Figura 22B**).



**Figura 22** - Redes biológicas geradas pela análise IPA com base nas interações de 110 genes diferencialmente metilados entre pacientes de melanoma cutâneo com e sem mutações em *CDKN2A* e controles. (A) Desenvolvimento embrionário, Desenvolvimento de órgãos e Desenvolvimento de organismo. (B) Desenvolvimento e função de pele e cabelo, Morfologia de órgãos, e Desenvolvimento e função do sistema digestório. Genes em cinza são diferencialmente metilados e genes em branco foram adicionados pelo IPA.

Posteriormente, investigamos diferenças de metilação entre pacientes de melanoma portadores de mutação em *CDKN2A* e controles. Para esta análise, sítios CpGs com diferença mínima de 20% de metilação entre estes dois grupos (589 CpGs) foram submetidos à análise estatística RP, resultando em 90 CpGs diferencialmente metilados. Foi realizada validação técnica do nível de metilação obtido no *microarray* para um destes CpGs (cg00631877, mapeado no gene *PLXNC1*, **Figura 23** e **Quadro 5**) através de pirosequenciamento, obtendo-se alta correlação (coeficiente de correlação de Spearman= 0,85; **Figura 24**).

**cg00631877 (chr12: 94640673) - *PLXNC1***

**chr12:94640614-94640823 (fita minus)**

**Sequência original**

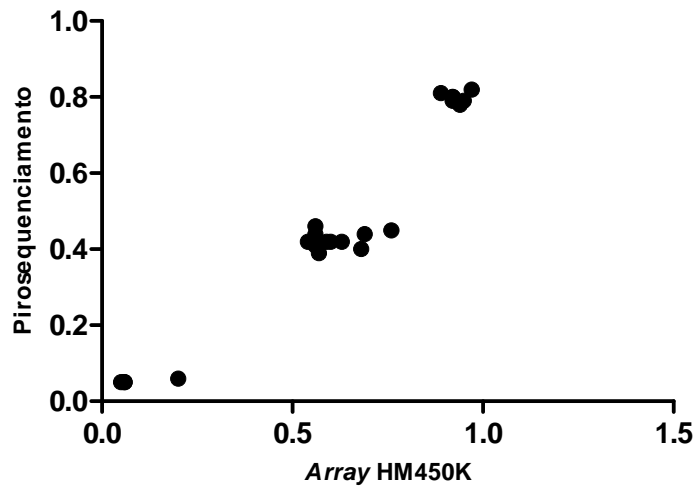
CATAAATATATTGTCCTGTTTAGGTGTACAGAAGGACAGGCAGAGGAGGCTGGTGGGTTAGGGGAGG  
 ATGGCAAACATTCTACAGAAAAGCAATTATAACTCATAAAAAGAAATTTATCAGGTGGGAAAACTATT  
 TTTCCCCACCCC**CG**CCACCCCCTGATACTAGAGCATAAAAAAGACAATAGGAAGAGGCAATTGGTG  
 GAAAAAT

**Sequência convertida representando tratamento com bissulfito de sódio**

TATAAATATATTGTTTTGTTTAGGTGTATAGAAGGATAGGTAGAGGAGGTTGGTGGGTTAGGGGAGGA  
 TGGTAAATATTTTATAGAAAAGTAATTATAATTTATAAAAAGAAATTTATTAGGTGGGAAAAATTATTTT  
 TTTTATTTT**CG**TATTTTTTATAGATTAGAGTATAAAAAAGATAATAGGAAGAGGTAATTGGTGGGAAAA

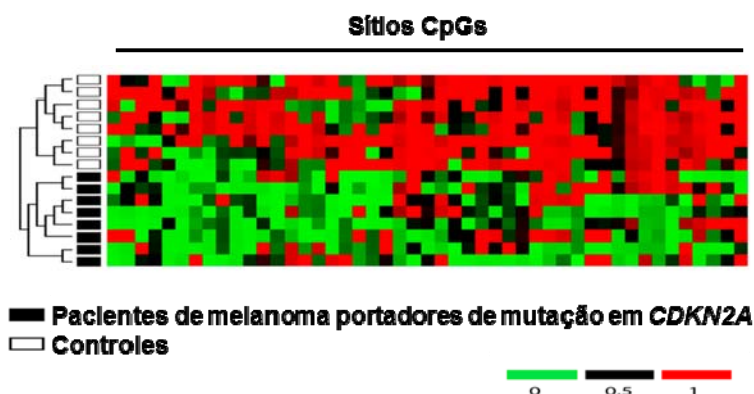
*primer F* → , *primer R* ← , *primer de sequenciamento* ↔ , *biotina* •

**Figura 23** - Esquema da região de DNA amplificada para análise de metilação do sítio CpG cg00631877 (gene *PLXNC1*) por pirosequenciamento. A localização no genoma e fita do DNA são mostrados. A sequência de DNA foi obtida no UCSC Genome browser (hg19) e convertida manualmente para representar o tratamento por bissulfito de sódio; os dinucleotídeos CpGs foram preservados. O sítio CpG analisado é destacado em amarelo.



**Figura 24** - Correlação entre os níveis de metilação em um sítio CpG do gene *PLXNC1* obtidos pelo *microarray* HM450K (Illumina) e por pirosequenciamento. Foram comparados os valores de metilação referente à sonda cg00631877, mapeada no gene *PLXNC1*, através do coeficiente de correlação de Spearman ( $r= 0,85$ ). Cada ponto representa um indivíduo dos grupos de: pacientes de melanoma portadores de mutação em *CDKN2A* ( $n=8$ ), pacientes de melanoma esporádico ( $n=8$ ) e indivíduos sem histórico de câncer ( $n=8$ ).

Do grupo de 90 CpGs diferencialmente metilados entre portadores de mutação em *CDKN2A* e controles, há 47 sítios hipometilados e 43 hipermetilados (**Tabela 14**). Somente o conjunto de sondas hipometiladas foi capaz de distinguir portadores de mutação em *CDKN2A* e controles (**Figura 25**). Um total de 63 CpGs detectados como diferencialmente metilados são associados a 58 genes, e a análise *in silico* utilizando IPA mostrou enriquecimento de genes relacionados ao câncer (**Tabela 14**), gerando duas redes biológicas relevantes, ambas contendo 14 genes diferencialmente metilados (**Figura 26**).



**Figura 25** - *Cluster* hierárquico não supervisionado construído a partir de CpGs detectados como hipometilados em pacientes de melanoma cutâneo portadores de mutação em *CDKN2A* em relação aos controles. Foram utilizados os valores de metilação de 47 sítios CpG obtidos com *microarray* HM450K (Illumina) e detectados como hipometilados através de análise RP. A barra à direita indica o nível de metilação (0-verde = não metilado, 1-vermelho = metilado).

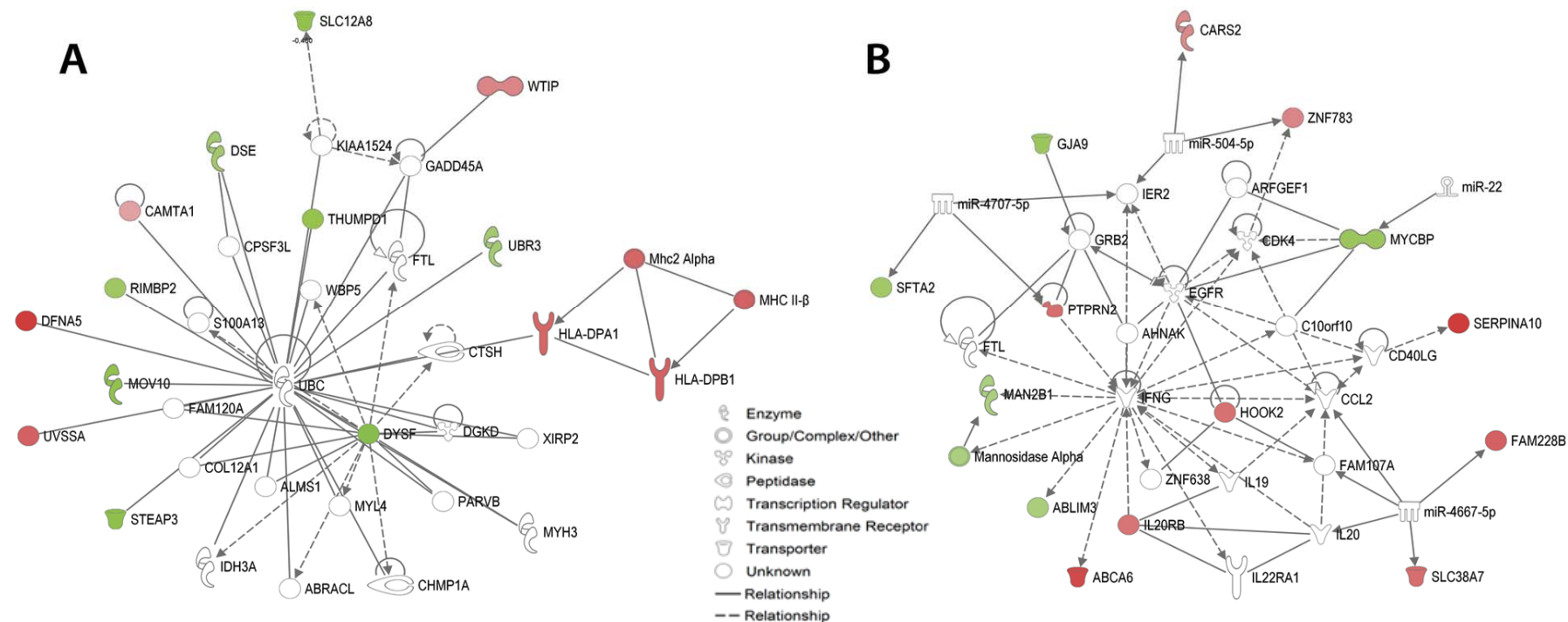
**Tabela 14** - Sítios CpG diferencialmente metilados entre pacientes de melanoma cutâneo portadores de mutação em *CDKN2A* e indivíduos sem histórico de câncer.

Sonda (HM450K)	CHR	Coordenadas genômicas (hg19)	$\Delta\beta$	<i>p</i> -value	Gene <sup>a</sup>	SNP no sítio CpG <sup>b</sup>	Elemento repetitivo <sup>a, b</sup>
cg15150396	2	71787431	-0,57	3,20e-4	<i>DYSF</i> <sup>c</sup>	rs11896175	-
cg12466610	1	220950205	-0,51	<1e-6	<i>MARC2</i>	rs12402066	-
cg00030117	2	119980249	-0,49	0,002	<i>STEAP3</i> <sup>c</sup>	rs838059	-
cg21927991	8	135494242	-0,48	0,002	<i>ZFAT</i> <sup>c</sup>	rs5025124	-
cg16377948	1	113221657	-0,46	0,002	<i>MOV10</i>	rs2999155	-
cg09866143	3	124861521	-0,46	0,003	<i>SLC12A8</i> <sup>c</sup>	rs11917613	MER5A1
cg00631877	12	94640673	-0,44	0,004	<i>PLXNC1</i> <sup>c</sup>	rs869047	-
cg26846609	16	20750043	-0,43	0,002	<i>THUMPDI</i>	rs1466770	-
cg03549208	2	203642154	-0,42	0,002	<i>ICA1L</i>	rs62194158	-
cg09636756	18	77134251	-0,42	4,20e-4	<i>ATP9B</i> <sup>c</sup>	rs3786181	-
cg02627240	7	144184387	-0,42	0,02	<i>TPK1</i>	rs41237	-
cg04515524	19	17489148	-0,39	0,009	<i>PLVAP</i>	rs73018403, rs725808 <sup>d</sup>	-
cg07258715	3	12801785	-0,38	0,012	<i>TMEM40</i>	rs9865548	LINE
cg24051749	1	39340282	-0,38	8,65e-4	<i>GJA9</i> <sup>c</sup> ; <i>MYCBP</i>	rs880303	-
cg05308244	12	130968528	-0,37	0,009	<i>RIMBP2</i> <sup>c</sup>	rs4320987	-
cg04990378	20	61160996	-0,37	0,005	<i>C20orf166</i> <sup>c</sup> ; <i>MIR133A2</i>	rs6143047	-
cg04145681	6	30899162	-0,36	0,002	<i>SFTA2</i>	rs2532925	-
cg24407607	6	116753994	-0,35	0,008	<i>DSE</i>	rs549262	-
cg21589417	2	170834853	-0,34	0,009	<i>UBR3</i>	rs13017065	LINE
cg17040924	11	4565489	-0,33	0,015	<i>OR52M1</i> <sup>c</sup>	rs2641412	-
cg27341708	4	140952109	-0,33	0,015	<i>MAML3</i> <sup>c</sup>	rs11100449	-
cg24844518	5	156811669	-0,31	0,009	<i>CYFIP2</i>	rs4305634	-
cg13815695	12	104237895	-0,31	0,002	<i>GNN</i>	rs7966100	-
cg13653328	5	148520669	-0,31	0,007	<i>ABLIM3</i> <sup>de</sup>	rs11168092	-
cg04246708	1	246785611	-0,30	0,015	<i>CNST</i>	rs3129547	-
cg10776061	19	12768390	-0,30	0,004	<i>MAN2B1</i>	rs73002392	-
cg23803868	19	2340235	-0,26	0,004	<i>SPPL2B</i>	rs12460384	-
cg05809586	21	31709690	-0,22	0,007	<i>KRTAP27-1</i> <sup>c</sup>	rs2244485	-
cg24087071	14	94750291	0,51	<1e-6	<i>SERPINA10</i> <sup>c</sup>	rs1950641	-
cg25709790	7	24742552	0,51	4,10e-4	<i>DFNA5</i>	rs2240005	-
cg22142142	15	90891614	0,49	0,001	<i>GABARAPL3</i>	rs6496665	-
cg07157030	14	63671356	0,49	0,005	<i>RHOJ</i> <sup>c</sup>	-	-

Cont/Tabela 14

Sonda (HM450K)	CHR	Coordenadas genômicas (hg19)	$\Delta\beta$	p-value	Gene <sup>a</sup>	SNP no sítio CpG <sup>b</sup>	Elemento repetitivo <sup>a, b</sup>
cg13167158	1	1562535	0,46	0,001	<i>MIB2</i>	rs11544452	-
cg24086348	17	67138138	0,46	0,002	<i>ABC A6<sup>c</sup></i>	rs3744489	-
cg18771300	14	63671737	0,46	0,011	<i>RHOJ<sup>c</sup></i>	-	-
cg10926851	5	146253830	0,45	1,70e-5	<i>PPP2R2B<sup>c</sup></i>	rs1835950	LINE
cg09167828	2	11286089	0,44	0,002	<i>C2orf50</i>	rs11903207	SINE
cg05751055	6	33036504	0,42	0,002	<i>HLA-DPA1<sup>c</sup></i>	rs1042434	-
cg13078798	1	92203667	0,41	0,005	<i>TGFBR3<sup>c</sup></i>	rs11165390	LTR
cg14302130	6	33032830	0,40	0,002	<i>HLA-DPA1<sup>c</sup></i>	rs1042920	-
cg20981163	6	33049983	0,40	0,003	<i>HLA-DPB1</i>	rs9277358,rs75339520	-
cg10528826	7	157571460	0,39	0,006	<i>PTPRN2<sup>c</sup></i>	rs28448886	-
cg12012426	4	1366463	0,39	0,002	<i>UVSSA<sup>c</sup></i>	rs6856550	-
cg11716267	2	24367828	0,39	0,003	<i>LOC375190</i>	rs35331966	LINE
cg11437465	6	33036958	0,38	0,011	<i>HLA-DPA1<sup>c</sup></i>	rs2308929	-
cg06484169	6	33052354	0,38	0,012	<i>HLA-DPB1</i>	rs9277441,rs80340467	SINE
cg14516100	4	186560083	0,37	0,012	<i>SORBS2<sup>c</sup></i>	-	-
cg10500653	1	39407651	0,36	0,005	<i>RHBDL2</i>	-	-
cg05876883	16	58704495	0,36	0,006	<i>SLC38A7</i>	rs16960359	-
cg25283336	6	33033484	0,35	0,016	<i>HLA-DPA1<sup>c</sup></i>	rs67640541	-
cg12858166	6	33033176	0,35	0,007	<i>HLA-DPA1<sup>c</sup></i>	-	-
cg11738485	19	12877000	0,35	0,008	<i>HOOK2</i>	-	-
cg16523115	3	136675725	0,34	0,012	<i>IL20RB</i>	rs73864647	LINE
cg13431688	9	101869277	0,33	0,006	<i>TGFBR1<sup>c</sup></i>	rs6478972	-
cg20550012	7	157370486	0,33	0,012	<i>PTPRN2<sup>c</sup></i>	rs123779	-
cg10771931	19	34972145	0,30	0,0135	<i>WTIP</i>	rs7248847	-
cg07878625	7	148977647	0,30	0,008	<i>ZNF783</i>	rs10248661	-
cg10993865	13	111293846	0,29	0,011	<i>CARS2</i>	rs330570	-
cg01600516	17	6904263	0,27	0,015	<i>ALOX12<sup>c</sup></i>	rs11571335	-
cg01543583	14	59947673	0,27	0,005	<i>C14orf149</i>	rs1253100	-
cg16652920	1	7432614	0,23	0,005	<i>CAMTA1<sup>c</sup></i>	rs11579620	-
cg21598190	7	2099404	0,23	0,01	<i>MAD1L1<sup>c</sup></i>	rs6953670	-
cg08136432	16	88902276	0,21	0,012	<i>GALNS</i>	rs12934499,rs17603837	-
cg08136432	16	88902276	0,21	0,012	<i>GALNS</i>	rs12934499,rs17603837	-
cg02100397	19	646890	-0,50	1,90e-4	-	rs10403235	-
cg11331837	17	35161825	-0,44	0,001	-	rs295848	-
cg19373347	1	219634786	-0,42	0,005	-	rs12025363	-
cg06445586 <sup>d</sup>	11	49073835	-0,41	0,007	-	-	-
cg12074150	2	34128722	-0,41	3,20e-4	-	rs2103033, rs1705134	LTR
cg12479705	4	13893547	-0,37	0,007	-	rs962301	-
cg22849321	6	113128231	-0,37	0,011	-	rs3844153	LINE
cg08717807	16	85531414	-0,35	0,005	-	rs9931008	-
cg16032108	11	2286079	-0,33	0,007	-	-	MER45B
cg00727777	8	2337813	-0,32	0,01	-	-	-
cg22305850	2	100824103	-0,32	0,01	-	rs4851267	-
cg10470368	11	64146517	-0,31	0,011	-	rs61886927	MER45B
cg21070081	5	110105162	-0,31	0,001	-	rs244431	-
cg24643105	11	113928473	-0,30	0,007	-	rs34029763	-
cg19300401	6	16962712	-0,29	0,002	-	rs6903672	LINE
cg27452255	1	85686316	-0,29	0,01	-	rs12563295	-
cg19384241	2	55393977	-0,29	0,005	-	-	-
cg26941787	12	76023400	-0,28	0,006	-	rs7958760	LINE
cg25649515	3	177309023	-0,23	0,014	-	rs552757	-
cg27225663	6	169142715	0,51	0,003	-	rs909507	simple repeat
cg16992599	15	28752121	0,44	0,004	-	-	-
cg14797147	5	124309096	0,41	8,50e-4	-	rs62372824	-
cg03965172	4	3683268	0,36	0,012	-	rs2880892	-
cg26465155	11	35611044	0,36	0,009	-	rs610680	LTR
cg11857805	14	100441223	0,34	0,004	-	rs1191030	-
cg18557837	3	39847605	0,28	0,009	-	rs9858242	-
cg21587006	10	839609	0,27	0,01	-	rs61831437	-

$\Delta\beta$  = [(média dos valores de metilação para pacientes portadores de mutação em *CDKN2A*) - (média dos valores de metilação para controles)]; <sup>a</sup>UCSC Genome Browser; <sup>b</sup>dados de PRICE et al. 2013; <sup>c</sup>genes relacionados ao câncer (Ingenuity Patway Analysis); <sup>d</sup>sítios que apresentam valores de metilação impactados pela heterogeneidade da população sanguínea de acordo com JAFFE e IRIZARRY (2014).

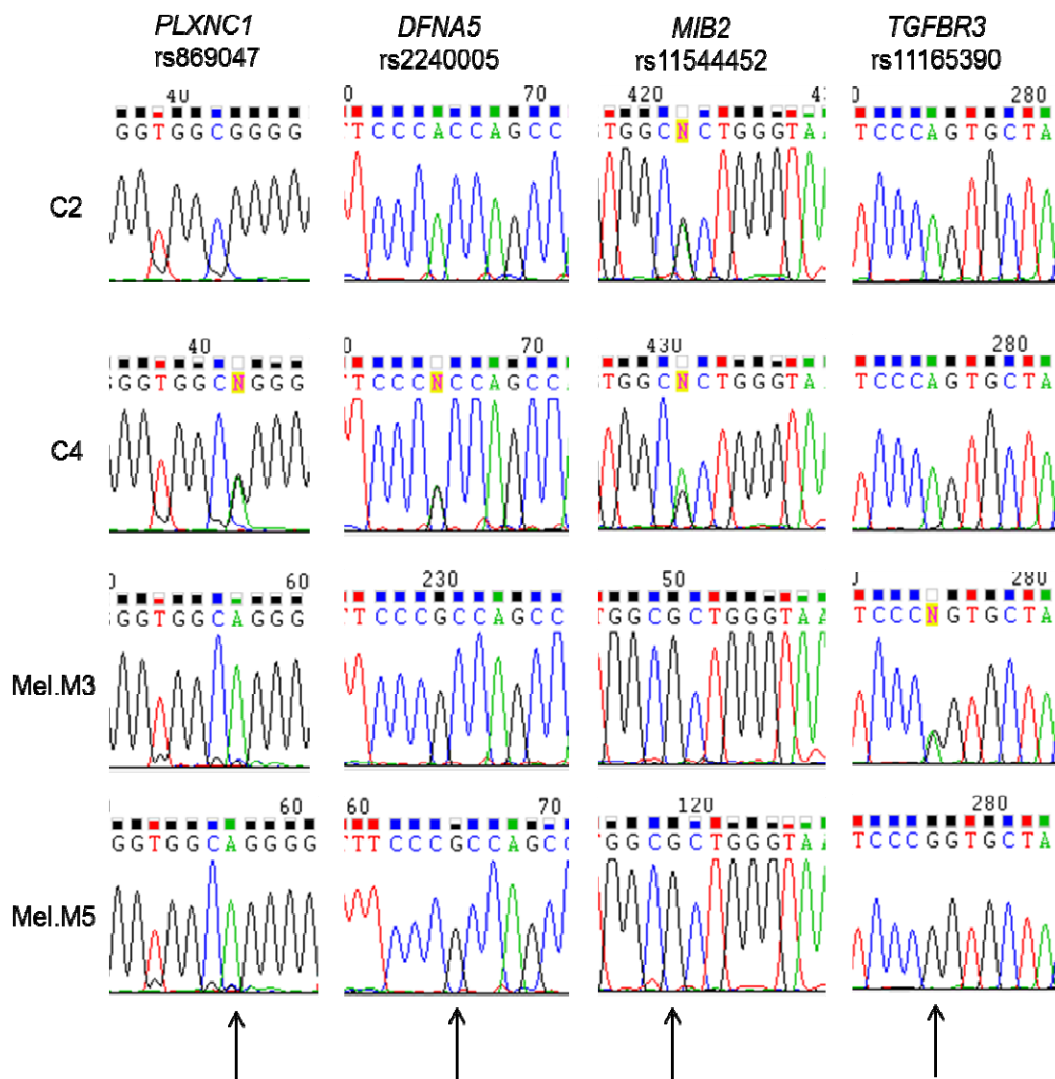


**Figura 26** - Redes biológicas geradas pela análise IPA com base nas interações de 58 genes diferencialmente metilados entre pacientes de melanoma cutâneo portadores mutação em *CDKN2A* e controles. **(A)** Distúrbios do tecido conjuntivo, Distúrbios de desenvolvimento e Distúrbios hereditários. **(B)** Sinalização e interação célula-célula, Desenvolvimento do sistema hematológico e Função e tráfico de células do sistema imune. Os genes foram destacados de acordo com seu status de metilação: hipometilado é representado em verde e hipermetilado, vermelho; genes em branco foram adicionados pelo IPA.

Entretanto, a presença de SNPs foi investigada nos 90 CpGs diferencialmente metilados entre pacientes portadores de mutação em *CDKN2A* e controles, sendo observado que 87,8% destes sítios apresentam SNP na posição da citosina ou guanina. Vale destacar que os níveis de metilação são quantificados com base na proporção C/T gerada pelo tratamento de bissulfito de sódio na posição da citosina do CpG interrogado, deste modo não é possível diferenciar citosinas não metiladas de timinas se houver SNP C/T na citosina interrogada. De maneira semelhante, um SNP na guanina do dinucleotídeo CpG abole o sítio de metilação.

Para detalhar o impacto de SNPs nos níveis de metilação dos CpGs detectados como diferencialmente metilados, genotipamos SNPs presentes em quatro CpGs mapeados em genes previamente relacionados ao melanoma: *PLXNC1*, um supressor da progressão do melanoma (SCOTT et al. 2009; CHEN Y et al. 2013; PALIWAL et al. 2013), *DFNA5*, cuja baixa expressão contribui para resistência a droga etopósido (GROTTKE et al. 2000; LAGE et al. 2001), *MIB2*, supressor de invasão tumoral (TAKEUCHI et al. 2006), e *TGFBR3*, candidato à suscetibilidade ao melanoma (WALKER et al. 2004). Vimos que os níveis de metilação nestes quatro sítios CpGs são diretamente relacionados a variação genética (**Figura 27 e Quadro 7**): a perda do sítio CpG foi associada a baixos níveis de metilação e a manutenção do sítio, a altos níveis de metilação.





**Figura 27** - Eletroferogramas dos genes detectados como diferencialmente metilados entre pacientes de melanoma cutâneo portadores de mutação em *CDKN2A* e indivíduos sem histórico de câncer. São apresentados quatro exemplos da genotipagem de SNPs presentes em sítios CpGs. A posição do SNP é representada pela seta. C= indivíduos controle (sem histórico de câncer); Mel.M= pacientes de melanoma portadores de mutação em *CDKN2A*.

**Quadro 7** - Genotipagem de SNPs presentes em sítios CpG diferencialmente metilados entre pacientes de melanoma cutâneo portadores de mutação em *CDKN2A* e indivíduos controle.

Amostra	<i>PLXNC1</i>	<i>DFNA5</i>	<i>MIB2</i>	<i>TGFBR3</i>
	rs869047 ( $\beta$ )	rs2240005 ( $\beta$ )	rs11544452 ( $\beta$ )	rs11165390 ( $\beta$ )
	[G; 0.441] <sup>a</sup>	[G;0.425] <sup>a</sup>	[G; 0.240] <sup>a</sup>	[G; 0.460] <sup>a</sup>
Mel.M1	NA (0,56)	NA (0,87)	NA (0,97)	NA (0,42)
Mel.M2	A/G (0,59)	A/G (0,44)	G (0,94)	G (0,83)
Mel.M3	A (0,06)	G (0,88)	G (0,95)	A/G (0,52)
Mel.M4	A/G (0,54)	G (0,89)	G (0,96)	G (0,86)
Mel.M5	A (0,05)	G (0,88)	G (0,96)	G (0,88)
Mel.M6	A/G (0,57)	G (0,90)	A/G (0,24)	G (0,84)
Mel.M7	A (0,06)	G (0,89)	G (0,96)	A (0,07)
Mel.M8	A/G (0,57)	G (0,92)	G (0,93)	G (0,82)
C1	A/G (0,63)	A/G (0,31)	G (0,95)	A/G (0,40)
C2	G (0,89)	A (0,02)	A/G (0,23)	A (0,06)
C3	G (0,92)	A (0,04)	A/G (0,22)	A (0,07)
C4	A/G (0,60)	A/G (0,39)	A/G (0,21)	A (0,07)
C5	G (0,92)	A (0,04)	G (0,95)	G (0,81)
C6	G (0,93)	A/G (0,44)	A/G (0,25)	A (0,05)
C7	A/G (0,68)	A/G (0,46)	A/G (0,21)	A (0,07)
C8	G (0,94)	G (0,89)	A/G (0,20)	A/G (0,46)

$\beta$ : nível de metilação, variando de 0 (não metilado) a 1 (totalmente metilado); <sup>a</sup>[alelo ancestral; heterozigose] de acordo com NCBI dbSNP 138; NA- informação não avaliada; A= adenina; G= guanina.

Questionamos se estes SNPs poderiam estar associados à ocorrência de melanoma. Para tentar responder esta questão, verificamos a frequência alélica do SNP rs869047 (gene *PLXNC1*) em um grupo maior de pacientes de melanoma (n= 62) e indivíduos controles (n= 95; amostras de DNA cedidas pelo Departamento de Genética e Biologia Evolutiva - Universidade de São Paulo). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Teste exato de Fisher,  $p= 0,2$ ). Adicionalmente, a lista de SNPs detectada nesta análise foi comparada com dados de

GWAS (Genome-Wide Association Study) em melanoma cutâneo (BROWN et al. 2008; BISHOP et al. 2009; AMOS et al. 2011; BARRETT et al. 2011; MACGREGOR et al. 2011; TEERLINK et al. 2012; ILES et al. 2013), e não foi encontrada sobreposição. Uma possibilidade a ser discutida é a de que os SNPs por nós reportados influenciem a penetrância de mutações em *CDKN2A*, como ocorre com variantes no gene *MC1R* (FARGNOLI et al. 2010); no entanto, estudos adicionais seriam necessários para averiguar esta hipótese.

Em resumo, estes dados sugerem que pacientes afetados por melanoma esporádico apresentam um perfil de hipometilação possivelmente associado à ocorrência recente da doença em relação ao período em que o sangue foi coletado. Adicionalmente, pacientes de melanoma portadores de mutação em *CDKN2A* apresentam uma assinatura epigenética em leucócitos como resultado de variações genéticas em relação ao grupo controle. Estes dados foram publicados na revista científica *Experimental and Molecular Pathology* 2014; 97:425-432 (Anexo 7).

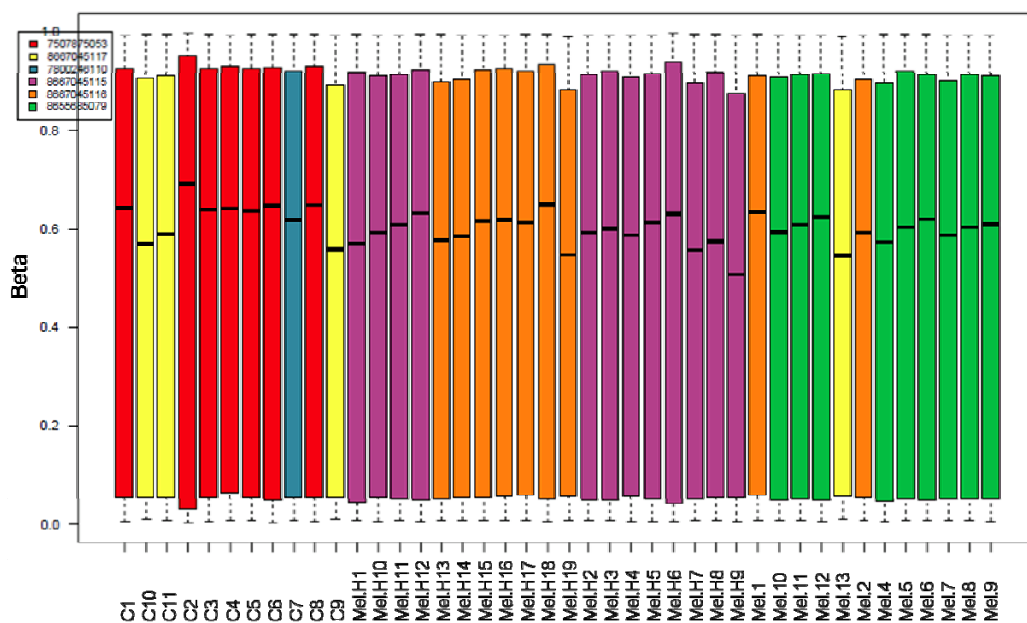
#### **4.7.2 Pacientes negativos quanto a mutações em *CDKN2A* e *CDK4***

Com a finalidade de investigar a existência de um perfil de metilação global associado à ocorrência de melanoma cutâneo hereditário e assim explorar o papel da metilação aberrante do DNA na predisposição ao melanoma, analisamos os níveis de metilação do sangue periférico de pacientes caracterizados como melanoma hereditário ou melanoma esporádico, ambos os grupos negativos quanto a mutações no principal gene de suscetibilidade ao melanoma (*CDKN2A*), comparando o padrão de metilação obtido (a) entre eles e (b) com indivíduos sem histórico de câncer (controles).

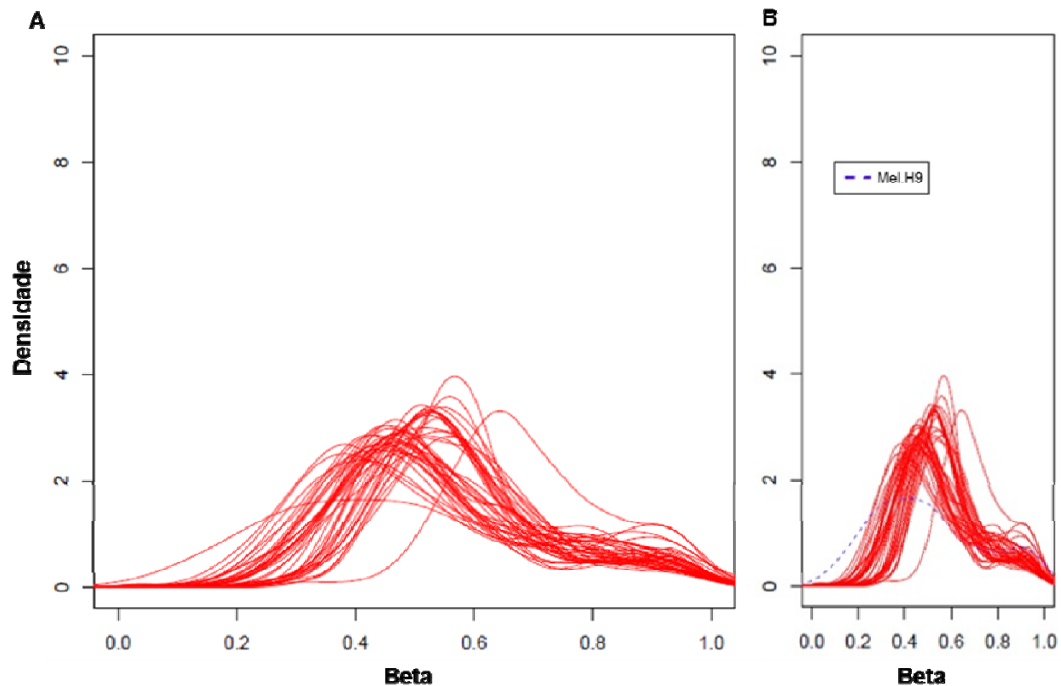
Após delineamento do perfil de metilação do DNA com o *microarray* HM450K, o gênero dos indivíduos foi confirmado no RnBeads com base na intensidade dos sinais emitidos pelos cromossomos sexuais; embora sondas mapeadas nos cromossomos X e Y sejam excluídas de futuras análises, um desacordo entre o gênero descrito para a amostra genômica testada e o gênero predito a partir do resultado do *microarray* poderia significar outros problemas, como contaminação com material genético de outro indivíduo. Foi também analisada a proximidade genética entre as amostras testadas utilizando 65 SNPs presentes na plataforma HM450K, notando-se proximidade entre os controles C3 e C12 (**Figura 28**). Para evitar viés nos níveis de metilação possivelmente ocasionado pela semelhança genética, a amostra C12 foi excluída.



Em seguida, foi realizado o pré-processamento dos dados no RnBeads para exclusão de sondas indesejáveis e normalização. Uma segunda etapa de controle de qualidade analisou a distribuição dos níveis de metilação detectados em cada amostra considerando-se todas as sondas restantes ( $n= 437.752$ ) e sondas associadas a regiões de *imprinting* genômico ( $n= 227$ ). Na **Figura 29**, evidencia-se que os níveis de metilação detectados para a amostra Mel.H9 são menores do que aqueles das demais amostras; além disso, a amostra Mel.H9 apresenta um perfil de metilação diferente do esperado em regiões de *imprinting* genômico (**Figura 30**); em condições normais, o nível de metilação de tais regiões deve ficar ao redor de 50-60% (RANCOURT et al. 2012). Desta maneira, a amostra Mel.H9 foi excluída de futuras análises.



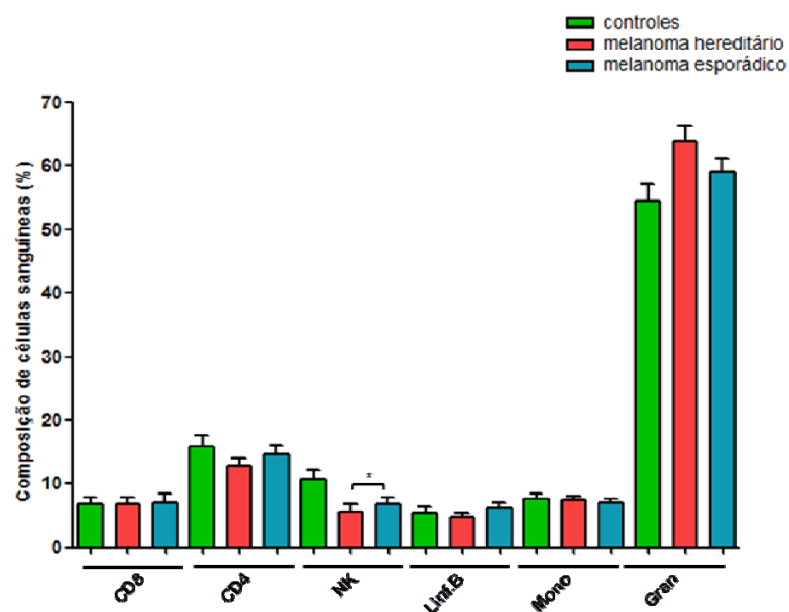
**Figura 29** - Boxplot dos níveis de metilação detectados pelo *microarray* HM450K (Illumina) para cada amostra da casuística. A distribuição dos valores de beta é mostrada para pacientes de melanoma cutâneo hereditário (Mel.H1-19), esporádico (Mel.1-2, Mel.4-13) e indivíduos sem histórico de câncer (C1-11). As amostras foram coloridas de acordo como *chip* utilizado no *microarray*.



**Figura 30** - Distribuição dos níveis de metilação em regiões de *imprinting* genômico na casuística analisada por *microarray* HM450K (Illumina). É mostrada a distribuição dos valores de beta em 227 sondas associadas a regiões de *imprinting* genômico para: (A) todas as amostras analisadas: 19 pacientes de melanoma cutâneo hereditário, 12 pacientes de melanoma cutâneo esporádico e 11 controles e (B) todas as amostras, destacando-se Mel.H9 (linha tracejada).

Para investigar covariáveis que pudessem alterar os níveis de metilação detectados e, por consequência, influenciar os resultados, foi realizada PCA considerando alguns fatores associados ao desenho experimental. Além de fatores relacionados às condições de execução do experimento (*chip*, posição no *chip*, dia de realização do experimento), características como gênero (EL-MAARRI et al. 2011) e idade (FRAGA e ESTELLER 2007) podem interferir nos resultados. Outros fatores associados às características dos pacientes também podem ser investigados como covariáveis; em nosso estudo, uma covariável investigada foi a presença de melanoma no momento da coleta de sangue. Ainda, estudos prévios também

apontam a importância da heterogeneidade da população sanguínea em amostras de sangue periférico, pois diferenças na proporção destas células entre indivíduos podem influenciar os níveis de metilação detectados (JAFJE e IRIZARRY 2014; ZOU et al. 2014). Foram então estimadas as porcentagens de seis tipos celulares (linfócitos T CD4 e CD8, linfócitos B, células NK, monócitos e granulócitos) em nossas amostras e este dado foi incluído nas análises (**Figura 31**). A análise por PCA utilizando os 13 fatores descritos acima mostra que 12 deles (idade, todos os tipos celulares, *chip*, posição no *chip*, grupos estudados, gênero e dia do experimento) estão associados aos 10 primeiros principais componentes (**Tabela 15**).



**Figura 31** - Estimativa da porcentagem de diferentes populações de células sanguíneas em dois grupos estudados de pacientes de melanoma cutâneo e no controle. A estimativa foi realizada através do pacote FlowSorted.Blood.450k do Bioconductor e a porcentagem de cada tipo celular foi comparada entre os grupos de pacientes de melanoma cutâneo e controles por teste de Kruskal-Wallis com teste de comparações múltiplas de Dunn. CD8= linfócito T CD8+; CD4= linfócito T CD4+; NK= células *Natural Killer*; Linf.B= linfócitos B; Mono= monócitos; Gran= granulócitos. \* $p < 0,01$ .

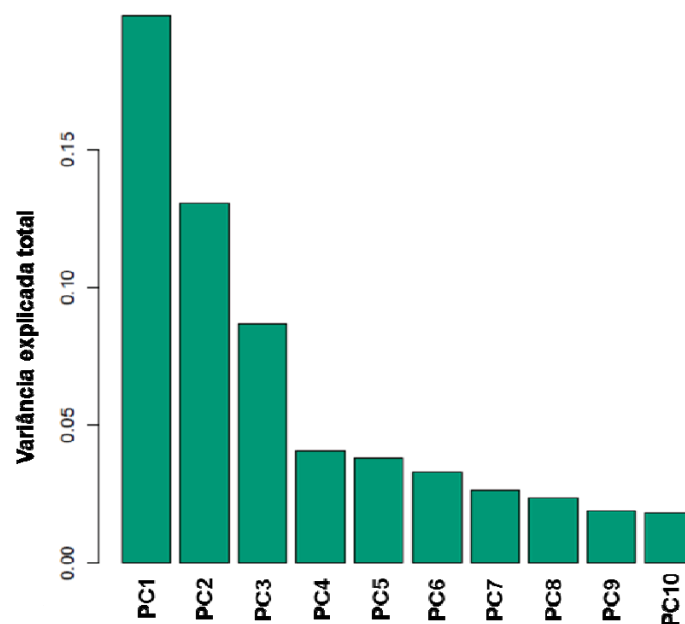


**Tabela 15** - Associação entre covariáveis relacionadas aos dados do *microarray* HM450K (Illumina) e principais componentes.

Fatores	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
Idade	0,37	0,10	<b>0,02</b>	0,34	0,12	0,47	0,06	<b>0,05</b>	0,50	0,26
Linfócitos T CD8	<b>0,02</b>	0,23	<b>0,03</b>	0,96	0,31	0,19	0,06	0,08	0,45	0,75
Linfócitos T CD4	0,41	0,26	<b>4,0e-3</b>	0,83	0,26	0,20	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	0,12	0,10
Células NK	0,54	0,08	<b>1,6e-4</b>	0,93	0,27	0,27	0,20	0,18	<b>0,03</b>	0,51
Linfócito B	<b>0,02</b>	0,10	<b>2,1e-4</b>	0,76	0,41	0,39	0,62	0,22	0,11	0,79
Monócitos	0,26	0,78	0,24	0,92	0,99	0,13	0,38	0,52	0,90	<b>0,05</b>
Granulócitos	0,95	<b>0,04</b>	<b>5,5e-7</b>	0,92	0,08	0,10	0,12	0,10	0,44	0,99
<i>Chip</i>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>1,3e-3</b>	<b>0,03</b>	<b>1,5e-3</b>	<b>0,04</b>	0,27	0,42	0,66	0,96
Posição no <i>chip</i>	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>	0,1	0,34	0,47	0,17	0,65	<b>0,03</b>	0,71	0,53
Grupos estudados	<b>2,0e-3</b>	0,32	<b>5,3e-4</b>	<b>0,04</b>	0,13	<b>0,03</b>	0,15	0,53	0,86	0,27
Gênero	0,94	0,84	0,14	<b>0,05</b>	0,77	0,73	0,94	0,25	<b>0,02</b>	0,73
Dia do experimento*	<b>2,5e-4</b>	0,65	<b>9,2e-5</b>	0,32	0,34	<b>6,2e-4</b>	0,89	0,78	0,99	0,76
Presença melanoma <sup>#</sup>	0,89	0,23	0,54	0,07	0,25	0,88	0,68	0,39	0,34	0,92

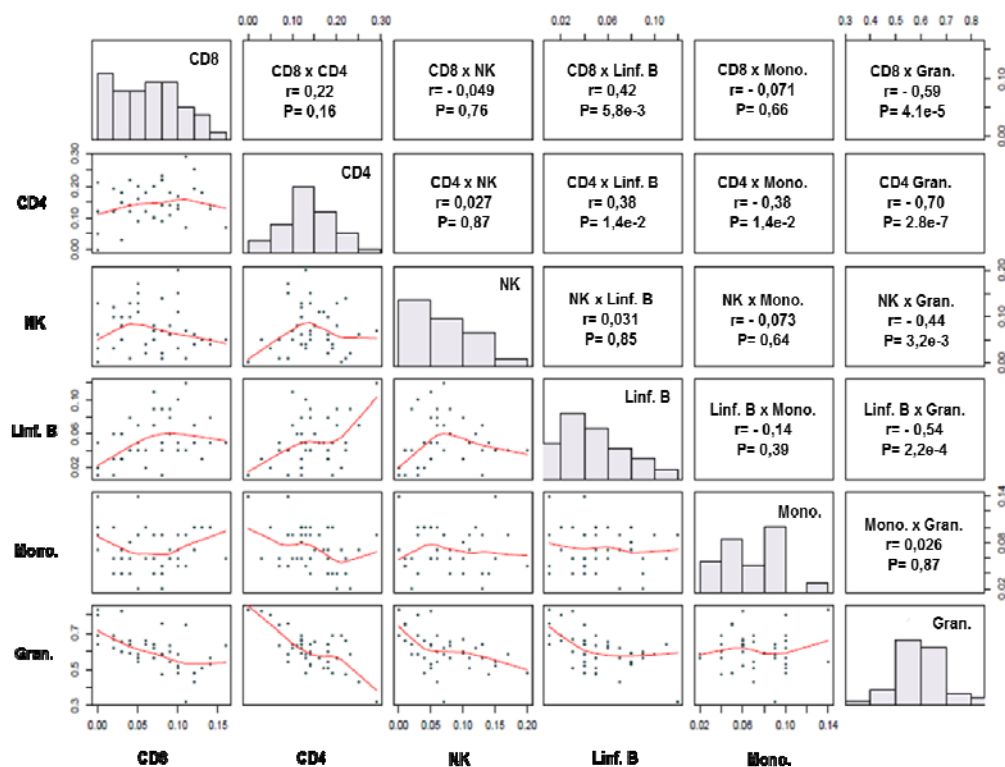
Grupos estudados: pacientes de melanoma cutâneo hereditário, pacientes de melanoma cutâneo esporádico, indivíduos sem histórico de câncer; \*dia em que foi realizado o *microarray*; <sup>#</sup>presença de melanoma no momento da coleta de sangue periférico; PC: principal componente; Anova, *p*-valor ≤ 0,05 em negrito.

Em seguida, avaliamos quais principais componentes melhor explicariam a variabilidade encontrada nos níveis de metilação, selecionando os quatro primeiros PCs, os quais estão associados às maiores proporções de variância explicada (**Figura 32**). Desta maneira, as covariáveis associadas aos principais componentes PC1-4 (**Tabela 15**) foram selecionadas para correção (excluindo-se nossa variável de interesse “grupos estudados”).



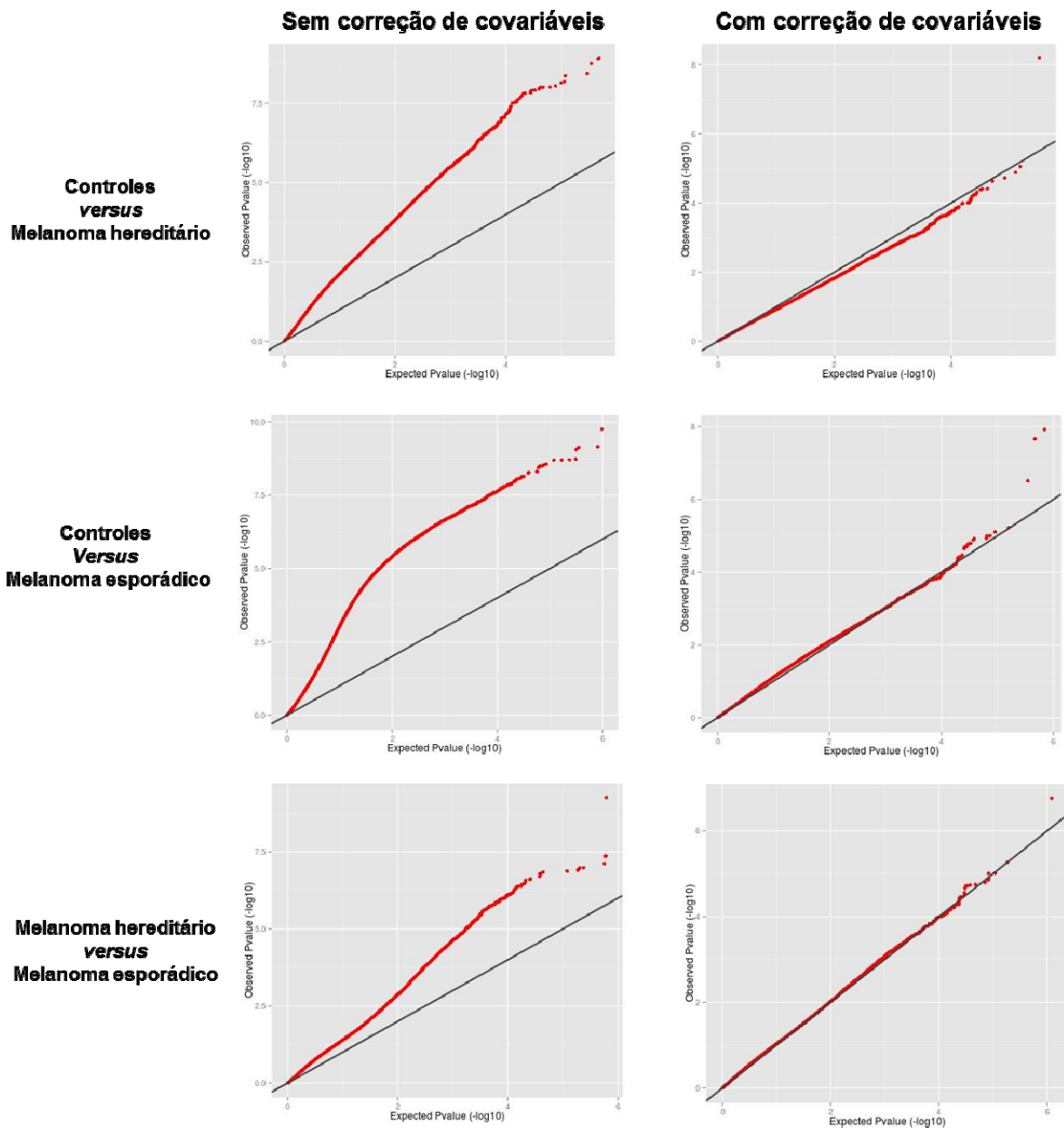
**Figura 32** - Proporção da variância explicada total para cada principal componente. Dados do *microarray* de metilação HM450K (Illumina), realizado em pacientes de melanoma cutâneo hereditário, pacientes de melanoma cutâneo esporádico e indivíduos sem histórico de câncer foram submetidos à análise de PCA, investigando a contribuição de 10 principais componentes (PC) na variabilidade dos níveis de metilação obtidos.

Para facilitar o trabalho e tempo computacional durante a correção de covariáveis associadas à heterogeneidade da população sanguínea, selecionamos apenas um tipo celular sanguíneo. Para esta escolha, foi calculada a correlação entre as proporções dos diferentes tipos celulares com o objetivo de determinar qual célula poderia prever a proporção das demais. Na **Figura 33**, vemos que os granulócitos são o tipo celular mais abundante (cerca de 60%) e que este mesmo tipo celular foi correlacionado com os demais tipos celulares (exceto monócito), ou seja, a partir da proporção de granulócitos pode-se estimar a proporção dos demais tipos celulares. Portanto, a proporção estimada de granulócitos foi selecionada para posterior correção de covariável relacionada à heterogeneidade sanguínea.



**Figura 33** - Correlação entre os diferentes tipos celulares presentes no sangue periférico. Na diagonal (sentido superior esquerda para inferior direita) são mostradas a distribuição da proporção estimada de cada tipo celular sanguíneo (linfócitos T CD8 e CD4, células NK, linfócitos B, monócitos e granulócitos) na casuística analisada (pacientes de melanoma hereditário, pacientes de melanoma esporádico e controles) por *microarray* HM450K (Illumina). Acima da diagonal, são mostrados dados referentes à correlação de Pearson realizada com os dois tipos celulares especificados. Abaixo da diagonal, são mostrados os gráficos obtidos na correlação de Pearson.

Foi então realizada a análise de metilação diferencial entre grupos, comparando-se: (a) controles com pacientes de melanoma hereditário, (b) controles com pacientes de melanoma esporádico e (c) pacientes de melanoma hereditário com pacientes de melanoma esporádico. O efeito da correção das covariáveis *chip*, posição no *chip*, idade, gênero e proporção estimada de granulócitos sobre os valores de *p* é mostrado na **Figura 34**. Nota-se de maneira clara que a correção eliminou a inflação nos valores de *p*, sendo, portanto, eficiente.



**Figura 34** - Gráficos QQ-plot obtidos a partir de dados antes e após a correção de covariáveis. Para cada uma das três comparações que foram realizadas na análise de metilação diferencial utilizando a plataforma HM450K (Illumina) é mostrado o efeito da correção das covariáveis: *chip*, posição no *chip*, idade, gênero e proporção estimada de granulócitos, nos valores de *p*. Nota-se inflação nos valores de *p* antes da correção de covariáveis.

Após esta rigorosa análise de metilação diferencial, apenas cinco sítios CpGs foram detectados com diferença de metilação e significância estatística (**Tabela 16**). Um dos sítios CpG identificados (cg10519543), mapeado na região promotora do gene *C7orf65*, foi encontrado nas comparações controles *versus* melanoma hereditário e controles *versus* melanoma esporádico, sugerindo ser uma característica de pacientes de melanoma. A função do gene *C7orf65* não é conhecida (**Quadro 8**); uma análise *in silico* revelou que a região genômica onde é mapeado cg10519543 não está associada à regulação de expressão gênica, de acordo com dados disponibilizados pelo ENCODE não há evidências de acetilação de lisina na posição 27 da histona H3 (H3K27ac - marca de ativação transcricional), sensibilidade à DNase I (que representa potencial para transcrição) ou ligação de fatores de transcrição (**Figura 35**). O ENCODE fornece informações dos níveis de H3K27ac e sensibilidade à DNase I em 7 e 125 linhagens celulares, respectivamente, avaliando 161 fatores de transcrição em 91 linhagens celulares, sendo células provenientes de diferentes tecidos.

Pacientes de melanoma esporádico apresentam dois sítios CpGs diferencialmente metilados em relação aos controles no corpo dos genes *TMCO3* e *MCPHI*, respectivamente (**Tabela 16**). O gene *MCPHI* apresenta múltiplas funções e foi previamente associado a diversos tipos de câncer. A função do gene *TMCO3* não é esclarecida e há poucas evidências de sua associação com câncer (**Quadro 8**). Anteriormente, descrevemos que, em relação aos controles, pacientes de melanoma esporádico apresentam hipometilação global associada à heterogeneidade da população sanguínea quando comparado a pacientes de melanoma portadores de mutação em *CDKN2A* e controles (item 4.7.1). Os três CpGs encontrados como

diferencialmente metilados nos pacientes de melanoma esporádico na presente análise estão hipermetilados em relação aos controles e não estão entre os sítios detectados como hipometilados anteriormente. A ausência de diferença de metilação entre os dois grupos de pacientes de melanoma pode indicar que as alterações detectadas entre pacientes e controles decorram da ocorrência prévia de melanoma, ainda que apenas um sítio CpG seja compartilhado nas comparações controles *versus* pacientes de melanoma hereditário e controles *versus* pacientes de melanoma esporádico.

**Tabela 16** - Sítios CpG diferencialmente metilados entre pacientes de melanoma cutâneo hereditário ou esporádico e indivíduos sem histórico de câncer.

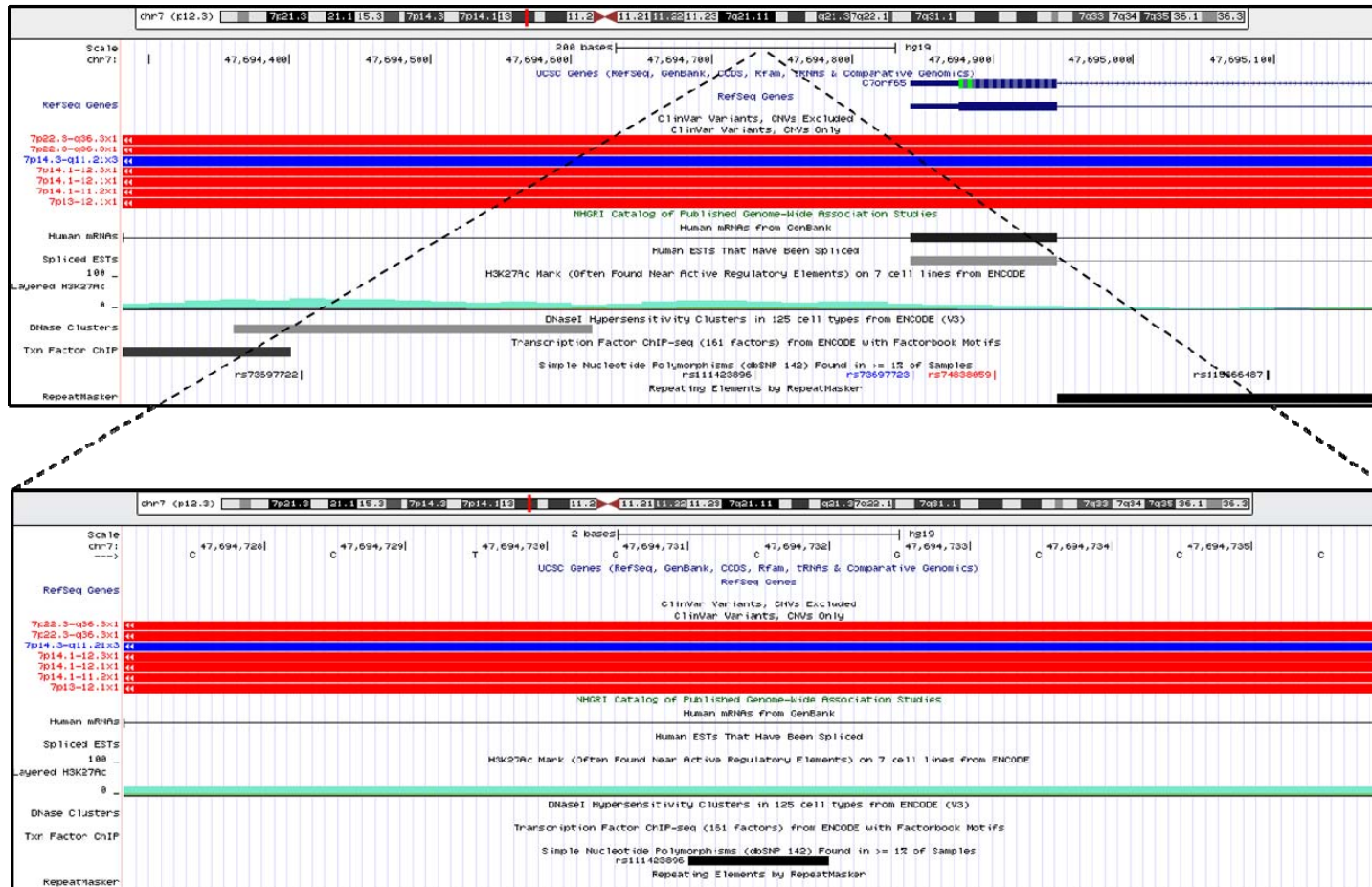
Análise	Sonda (HM450K)	CHR	Coordenada genômica (hg19)	$\Delta\beta$	<i>p-value</i>	<i>p-value adj.</i>	Gene *	Região gênica *	Localização em relação à ilha CpG*
C X Mel.H	cg10519543	7	47694732	0,15	6,33e-9	<b>2,77e-03</b>	<i>C7orf65</i>	TSS200	-
	cg10519543	7	47694732	0,14	1,20e-8	<b>4,77e-3</b>	<i>C7orf65</i>	TSS200	-
C X Mel.S	cg08749286	8	6479846	0,20	2,18e-8	<b>4,77e-3</b>	<i>MCPH1</i>	corpo	-
	cg07876831	13	114161463	0,15	3,10e-7	<b>4,52e-2</b>	<i>TMCO3</i>	corpo	N_Shelf
Mel.H X Mel.S	cg27519424	21	38362420	-0,08	1,72e-7	7,53e-2	<i>HLCS</i>	5'UTR	Ilha

C= controles; Mel.H= pacientes de melanoma hereditário; Mel.S= pacientes de melanoma esporádico; CHR= cromossomo; *p-value adj.*= *p-value* ajustado para múltiplas testagens FDR 5%; *p-value* ajust.  $\leq 0,05$  em negrito; \*informação fornecida pela Illumina, baseada no UCSC Genome Browser; TSS200= a 200 pb do sítio de início de transcrição; N\_Shelf = localizado a 2-4 Kb da Ilha CpG, em direção à 5' da Ilha.

$\Delta\beta$ = [(média dos valores de metilação para pacientes de melanoma) - (média dos valores de metilação para controles)] ou [(média dos valores de metilação para pacientes de melanoma hereditário) - (média dos valores de metilação para pacientes de melanoma esporádico)].

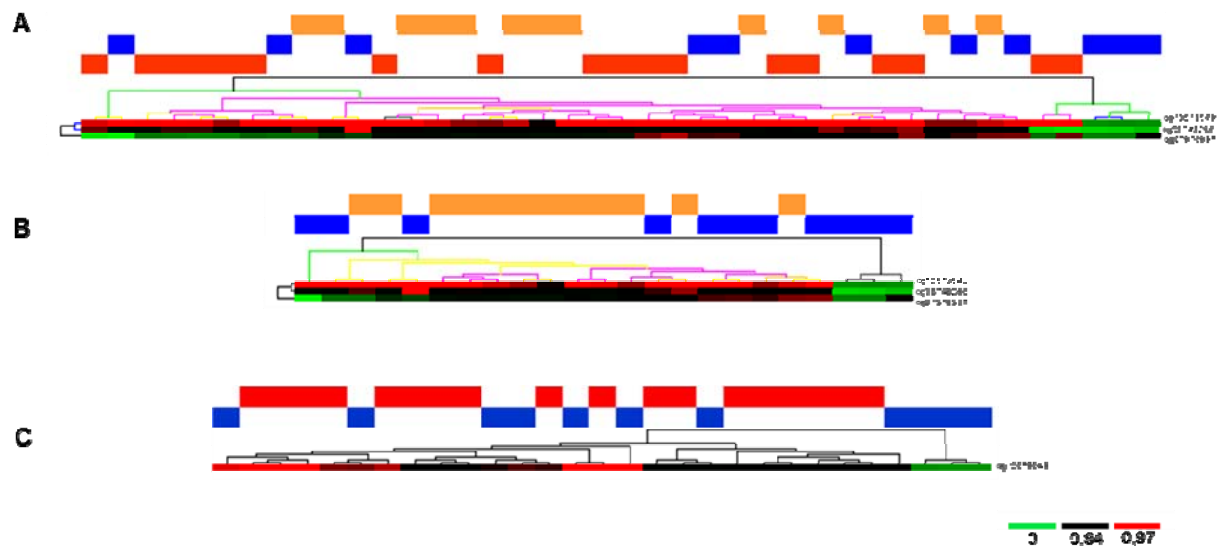
**Quadro 8** - Informações sobre genes associados aos sítios CpG diferencialmente metilados entre pacientes de melanoma cutâneo hereditário ou esporádico e indivíduos sem histórico de câncer.

Gene	Função	Condição no câncer	Referência
<i>C7orf65</i>	-	-	-
<i>MCPH1</i>	Apoptose, reparo de danos ao DNA, integridade do centrôssomo, manutenção do telômero, relaxamento da cromatina e checagem do ciclo celular	Baixos níveis de expressão em câncer de mama, cavidade oral, ovário, pulmão, rins e leucemia mielóide crônica	GIALLONGO et al. 2011; VENKATESH e SURESH 2014; WANG et al. 2014; ZHANG J et al. 2013
<i>TMCO3</i>	Provável função: transporte $\text{Na}^+/\text{H}^+$	Duplicado em um paciente com distonia, dismorfismo facial, deficiência intelectual e câncer de mama	MOSCOVICH et al. 2013



**Figura 35** - Esquema representando informações sobre a região genômica em torno de um sítio CpG diferencialmente metilado em pacientes de melanoma cutâneo hereditário e esporádico. No painel superior é mostrada uma região de 900 pb (chr7:47,694,282-47,695,181), que inclui o sítio CpG diferencialmente metilado (cg10519543, HM450K, Illumina), localizado em chr7: 47,697,32. Abaixo, é mostrada uma região de 9 pb ao em torno da localização da sonda. Nota-se que não há indícios que o sítio CpG esteja localizado em região de regulação de expressão gênica (ausência de: H3K27ac, sensibilidade a DNase I e ligação de fatores de transcrição). As variantes clínicas encontradas na região são relacionadas a distúrbios de desenvolvimento. O SNP presente na posição do sítio CpG (rs11423896, dbSNP 142) possui baixo índice de heterozigosidade (0,03). Informação obtida no UCSC Genome Browser (hg19), utilizando dados do ENCODE.

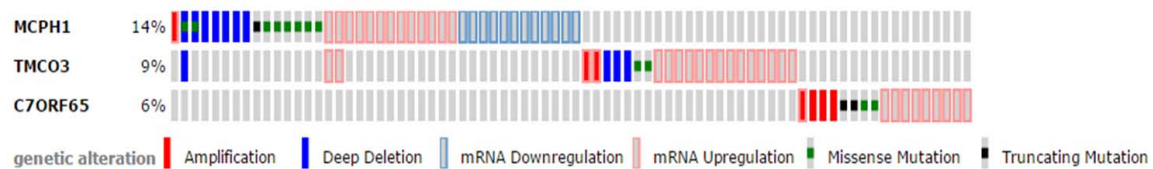
A análise de cluster hierárquico não supervisionado mostra que os níveis de metilação nos três sítios CpGs detectados como diferencialmente metilados não são capazes de diferenciar pacientes de melanoma e controles (**Figura 36**).



**Figura 36** - *Cluster* hierárquico não supervisionado utilizando CpGs detectados como diferencialmente metilados entre pacientes de melanoma cutâneo e controles. Foram utilizados os valores de metilação de 3 sítios CpG obtidos com *microarray* HM450K (Illumina) e detectados como diferencialmente metilados em análise realizada no RnBeads. (A) É mostrado o agrupamento de pacientes de melanoma hereditário negativos quanto à mutação em *CDKN2A* e *CDK4* (vermelho), pacientes de melanoma esporádico (laranja) e controles (azul) com base nos níveis de metilação dos sítios cg10519543, cg08749286 e cg07876831, diferencialmente metilados entre pacientes de melanoma esporádico e controles. (B) Agrupamento entre pacientes de melanoma esporádico e controles com base nos níveis de metilação dos três sítios. (C) Agrupamento entre pacientes de melanoma hereditário negativos quanto à mutação em *CDKN2A* e controles, com base no sítio cg10519543, diferencialmente metilado entre estes grupos. A barra à direita indica o nível de metilação (0= não metilado, 1= metilado).



Os níveis de metilação dos três sítios CpGs foram verificados em amostras de melanoma primário (n=18), nos quais os CpGs encontram-se metilados (>90% de metilação); dados em culturas primárias de melanócitos (n=3) foram disponíveis apenas para o cg10519543, com metilação de 95%. Com o intuito de investigar a importância dos genes *MCPHI*, *C7orf65* e *TMCO3* no melanoma cutâneo, a frequência de alterações genéticas nestes genes foi averiguada em 278 amostras de melanoma cutâneo disponibilizadas pelo TCGA no cBioPortal (**Figura 37**), a maior frequência de alteração é vista no gene *MCPHI* (14%).



**Figura 37** - Análise *in silico* dos três genes detectados como diferencialmente metilados em pacientes de melanoma cutâneo hereditário e esporádico. A frequência de alterações genéticas (tipos listados abaixo na figura) em três genes (mostrados à esquerda da figura) foi investigada nos dados de 278 melanomas cutâneos (retângulos) disponibilizados pelo TCGA no cBioPortal; amostras sem alteração foram excluídas.

Também foram realizadas análises de metilação diferencial considerando regiões genômicas específicas (gene, promotor, ilha CpG e regiões de 5 Kb), porém não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes. Estes dados indicam que as diferenças de metilação previamente relatadas nos genes *MCPHI*, *C7orf65* e *TMCO3* são restritas aos únicos CpGs. Contudo, a plataforma HM450K contempla poucas sondas (n= 9) para o gene *C7orf65*, sendo possível que haja diferença de metilação em outros CpGs não investigados.

A plataforma HM450K tem sido utilizada em diversos estudos que analisam sangue periférico em diferenças contextos, como diabetes (SWAN et al. 2015), stress pós-traumático (BOKS et al. 2015), esquizofrenia (WALTON et al. 2015), teste pré-natal (XIANG et al. 2014) e pesquisa forense (PARK et al. 2014). Surpreendentemente, estudos em câncer utilizando sangue periférico são raros: encontramos apenas dois estudos; em um deles, foram descritos dois sítios CpGs com diferença de metilação <10% associados ao hábito de fumar, doença cardiovascular e câncer (ZHANG Y et al. 2015), no outro, 403 CpGs foram detectados como diferencialmente metilados (menos que 1% de diferença) entre gêmeos discordantes para câncer de mama, sendo um destes CpGs validado em uma população independente (HEYN et al. 2014). Portanto, nosso estudo é pioneiro e contribui para o entendimento da metilação do DNA na ocorrência de melanoma, utilizando uma abordagem experimental robusta e que priorizou diferenças de metilação maiores que 10%, sendo uma abordagem não realizada nos outros dois estudos em câncer citados acima.

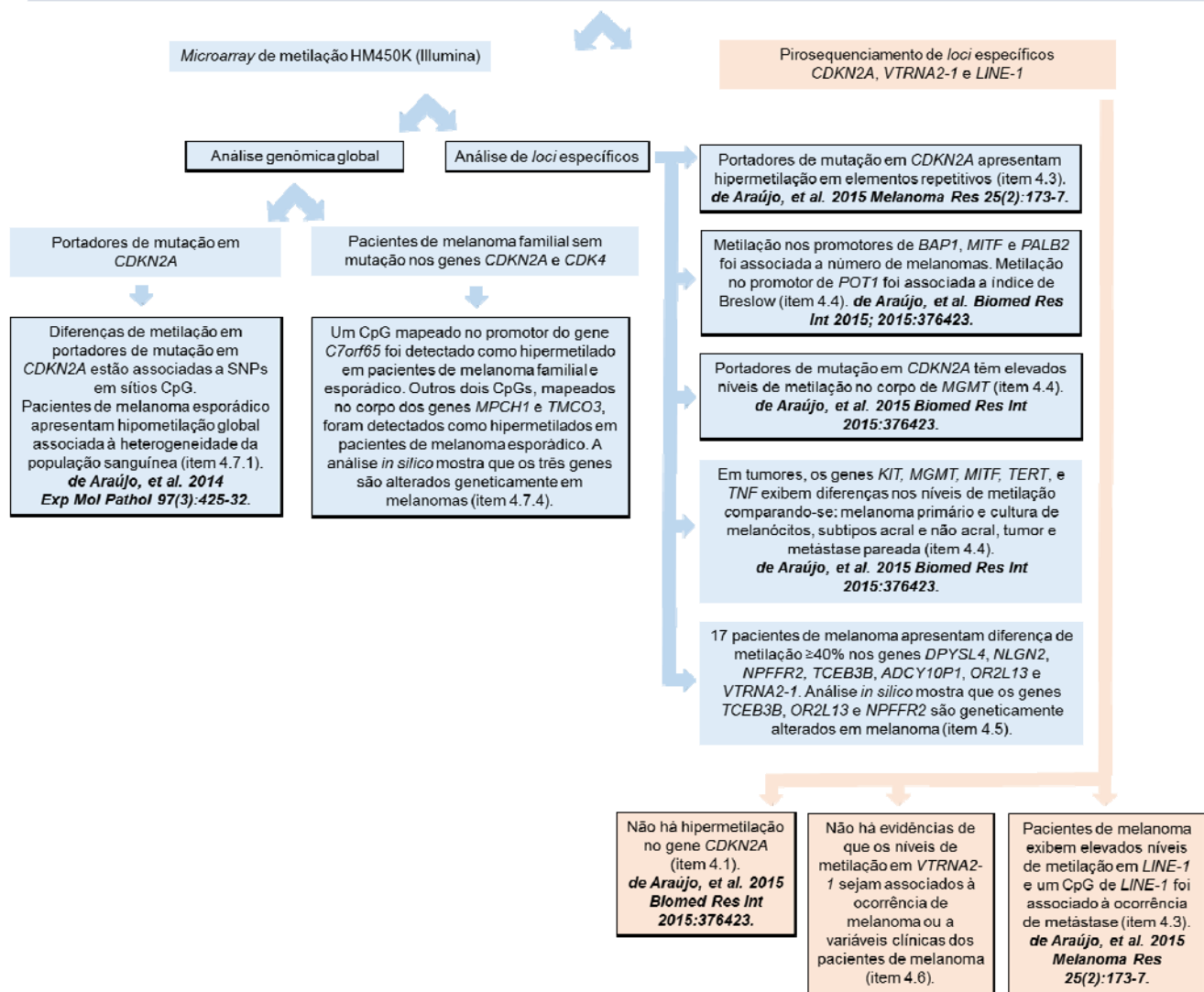
Em síntese, foram detectados três CpGs diferencialmente metilados ( $\geq 14\%$  de diferença de metilação) em pacientes de melanoma hereditário e esporádico em relação a indivíduos sem histórico de câncer. Não foram encontradas diferenças significativas entre pacientes de melanoma hereditário e pacientes de melanoma esporádico, sendo possível que as alterações de metilação estejam associadas à ocorrência e não ao risco de melanoma. Os CpGs diferencialmente metilados são mapeados nos genes *MCPHI*, *C7orf65* e *TMCO3*, cujas frequências de alterações genéticas em amostras de melanoma cutâneo do TCGA variam de 6-14%. O gene *MCPHI* se destaca como candidato em futuros estudos, devido à (a) hipermetilação

de 20% em pacientes de melanoma esporádico, (b) sua associação com diversos tipos de câncer e (c) frequente alteração em melanomas.

#### 4.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o intuito de explorar o papel da metilação do DNA na predisposição ao melanoma cutâneo, delineamos o perfil de metilação global do DNA em amostras de sangue periférico de diferentes grupos de pacientes afetados por melanoma (hereditário e esporádico), em comparação a indivíduos sem histórico de câncer. Investigamos a associação do padrão global de metilação assim como de níveis de metilação em *loci* específicos com a ocorrência de melanoma e também com algumas características clínicas. Amostras de melanomas primários independentes e de culturas de melanócitos de indivíduos controle também foram analisadas em *loci* específicos. A **Figura 38** resume nossos principais achados.

**HIPÓTESE:** Pacientes de melanoma familiar e/ou esporádico tem alteração no perfil de metilação de DNA em comparação a indivíduos sem histórico de câncer



**Figura 38** - Fluxograma representativo dos resultados desta tese de doutoramento.

A seguir, algumas considerações são elaboradas a respeito da abordagem experimental, suas limitações e vantagens:

- Em nosso estudo, pudemos contar com a vantagem de partir de uma casuística de mais de 50 famílias com ocorrência de melanoma, com pacientes previamente caracterizados e acompanhados no A.C. Camargo Cancer Center no Núcleo de Câncer de Pele, Departamento de Oncogenética e Centro Internacional de Pesquisa (DE ÁVILA et al. 2014). A partir desta casuística, selecionamos aqueles pacientes com fortes evidências de melanoma hereditário, para assim garantir um grupo mais homogêneo e dados mais robustos. A casuística deste estudo abrange 27 famílias com fortes indícios de melanoma hereditário, um alto número considerando a raridade deste tipo de câncer.
- Embora a causa genética do melanoma familiar seja desconhecida na maioria das famílias no mundo, incluindo a casuística do A.C. Camargo Cancer Center, apenas quatro estudos buscaram possíveis causas epigenéticas, sendo investigados poucos genes. Neste estudo, propusemos investigar possíveis causas epigenéticas em uma escala global, utilizando a mais recente ferramenta de *microarray* de metilação do DNA (HM450K, Illumina).
- A plataforma HM450K analisa mais de 450.000 sítios CpGs, distribuídos em regiões intergênicas ou associadas a 99% das RefSeq, em um procedimento curto (cerca de quatro dias) e de baixo custo (BIBIKOVA et al. 2011). Além de análise global de metilação, é possível investigar os níveis de metilação

em *loci* específicos, como foi realizado neste estudo, resultando em artigos científicos independentes.

- Como modelo de estudo, escolhemos sangue periférico com o intuito de investigar modificações que fossem eventualmente constitutivas (germinativas). Este tipo de amostra pode ser obtido de forma pouco invasiva e trata-se do tecido normal dos pacientes, coletado como rotina no A.C. Camargo Cancer Center para armazenamento no Biobanco, quando consentido. Contudo, é bem estabelecido que a metilação do DNA em algumas regiões é tecido-específica (LOKK et al. 2014) e, assim, nossos achados podem ser restritos ao material genômico de células sanguíneas dos pacientes, ausentes nos melanomas. Não há disponibilidade de amostras de melanomas do mesmo grupo de pacientes estudados para corroborar nossos achados. Duas abordagens foram realizadas em parte das análises para minimizar tal limitação: (a) realizamos análise *in silico* utilizando dados de 278 amostras de melanoma cutâneo disponibilizadas pelo TCGA; porém, apenas alterações genéticas (mutações e alterações no número de cópias genômicas) e ao nível de expressão gênica estavam disponíveis no momento da análise, sendo ainda necessária a validação dos níveis de metilação em tumores; (b) para alguns *loci* estudados, adicionamos à investigação o padrão de metilação de melanomas cutâneos e culturas primárias de melanócitos, cujos dados foram obtidos em plataforma HM450K em mestrado desenvolvido em nosso grupo (PRAMIO 2015).
- No presente estudo, utilizamos duas técnicas robustas para delinear o perfil de metilação do DNA: *microarray* de metilação com a plataforma HM450K e

pirosequenciamento. Ambas as análises envolvem um passo inicial de tratamento do DNA com bissulfito de sódio, o qual tem como finalidade distinguir citosinas metiladas (5mC) das livres de metilação. Contudo, a citosina pode apresentar outras modificações covalentes: 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-carboxicitosina (5-caC) e 5-formilcitosina (5fC) (KRIAUCIONIS e TAHILIANI 2014). Todas estas modificações da citosina são sucessivas e decorrentes da ação de proteínas da família TET (GUO et al. 2011), podendo representar passos de um processo ativo de desmetilação do DNA (BHUTANI et al. 2011). O tratamento com bissulfito de sódio não distingue 5mC de 5hmC, assim como citosinas livres de metilação não podem ser distinguidas de 5caC e 5fC (ULAHANNAN e GREALLY 2015). Desta maneira, há a possibilidade de um sítio detectado como metilado (5mC) estar na verdade em um processo de desmetilação (5hmC) e a abordagem metodológica utilizada não é capaz de fazer tal distinção. Recentemente, outras metodologias foram desenvolvidas para quantificar separadamente os níveis de cada modificação da citosina; o bissulfito oxidativo, por exemplo, permite quantificar 5hmC (BOOTH et al. 2012; PLONGTHONGKUM et al. 2014).

- A plataforma HM450K produz resultados muito robustos e reproduzíveis, sendo validada em 2011 (SANDOVAL et al. 2011), mas até o momento não há consenso acerca do melhor método para analisá-la (MORRIS e BECK 2015). Durante este período, importantes questões sobre a plataforma foram levantadas: desvio na distribuição dos níveis de metilação detectados pelos diferentes tipos de sondas presentes na plataforma (DEDEURWAERDER et

al. 2013), presença de SNPs em sítios CpGs (PRICE et al. 2013) e presença de sondas com múltiplos alinhamentos (CHEN YA et al. 2013). As diferentes estratégias que utilizamos nas diversas análises conduzidas neste nosso estudo refletem os níveis sucessivos de complexidade na avaliação dos dados da HM450K que foram surgindo na literatura científica durante o doutoramento, sendo que buscamos acompanhar tal evolução. Os níveis de metilação detectados pela HM450K são validados por outras técnicas, mas a seleção dos sítios CpGs diferencialmente metilados pode variar de acordo com o método escolhido de análise; assim, é possível que novas questões a respeito da plataforma HM450K ou outras covariáveis não consideradas no nosso estudo levem a resultados diferentes.

- A plataforma HM450K analisa apenas uma pequena fração do conteúdo de CpGs encontrados no genoma humano (ULAHANNAN e GREALLY 2015). Desta maneira, metodologias mais abrangentes, como sequenciamento do genoma após tratamento com bissulfito de sódio, podem detectar metilação aberrante em regiões não analisadas pela HM450K.



## 5 CONCLUSÕES

- Em amostras de sangue periférico, não foi detectado metilação na região promotora de *CDKN2A* em pacientes de melanoma hereditário ou esporádico.
- Em amostras de sangue periférico, pacientes de melanoma portadores ou não de mutação em *CDKN2A* apresentam hipometilação no elemento *LINE-1* quando comparado a indivíduos sem histórico de câncer, e um sítio CpG específico foi associado à ocorrência de metástase. Pacientes de melanoma portadores de mutação em *CDKN2A* apresentam hipermetilação também em outros elementos repetitivos do DNA quando comparados a pacientes de melanoma hereditário sem mutação em *CDKN2A*.
- Os níveis de metilação em cinco genes de risco ao melanoma cutâneo mostram diferenças estatisticamente significativas em sangue periférico de pacientes de melanoma. O corpo do gene *MGMT* foi encontrado como hipermetilado em pacientes portadores de mutação em *CDKN2A* em relação a pacientes afetados por melanoma esporádico. Os níveis de metilação nos promotores dos genes *BAP1*, *MITF* e *PALB2* foram associados ao número de melanomas desenvolvido pelo indivíduo. Hipermetilação no promotor de *POT1* foi associada com índice de Breslow  $\geq 1$ mm.
- Os níveis de metilação em cinco genes associados ao melanoma cutâneo mostram diferenças estatisticamente significativas em amostras de melanomas primários. Foi encontrada hipometilação no corpo dos genes *MGMT*, *TERT* e *TNF* e hipermetilação do gene *KIT* em relação a culturas

primárias de melanócitos provenientes de indivíduos saudáveis. Melanomas de subtipo acral apresentaram diferenças nos níveis de metilação no corpo dos genes *MGMT* e *TERT* quando comparados ao subtipo não acral. O corpo do gene *MITF* foi detectado como hipometilado em metástase em relação ao tumor pareado.

- Um total de sete genes (*DPYSL4*, *NLGN2*, *NPFFR2*, *TCEB3B*, *ADCY10P1*, *OR2L13* e *VTRNA2-1*) apresentam ilha CpG mapeada em suas respectivas regiões promotoras com padrão aberrante de metilação (diferença  $\geq 40\%$ ) em amostras de sangue periférico de dezessete pacientes de melanoma (quatro deles portadores de mutação em *CDKN2A*). Como candidato para futuras análises destaca-se o gene *TCEB3B*, detectado como hipometilado em um paciente de melanoma esporádico e com 17% de frequência de alteração genética em tumores (análise *in silico* com dados do TCGA).
- Os níveis de metilação em *VTRNA2-1* em amostras de sangue periférico são compatíveis com o descrito para outras populações, onde 75% dos indivíduos apresentam metilação em um dos alelos e 25%, hipometilação em ambos os alelos. Não observamos associação dos níveis de metilação em *VTRNA2-1* com a ocorrência de melanoma ou variáveis clínicas de pacientes de melanoma. Também não foram detectadas diferenças entre melanomas primários e culturas de melanócitos ou em tumores e metástases pareadas.
- Amostras de sangue periférico de pacientes de melanoma hereditário portadores de mutação em *CDKN2A* apresentam diferença de metilação em 90 sítios CpGs quando comparado a indivíduos sem histórico de câncer

(controles), sendo esta assinatura epigenética decorrente de SNPs presentes nos sítios CpGs.

- Amostras de sangue periférico de indivíduos afetados por melanoma esporádico apresentam hipometilação global quando comparado aos controles. Este resultado possivelmente foi influenciado pela heterogeneidade da população sanguínea entre pacientes e controles, mas os sítios CpG diferencialmente metilados são distintos ao relatado para pacientes acometidos por outros tipos de tumores sólidos.
- A análise global de metilação do genoma em amostras de sangue periférico após correção da heterogeneidade de células sanguíneas detectou um sítio CpG (cg10519543, gene *C7orf65*) diferencialmente metilado entre pacientes de melanoma hereditário sem mutação em *CDKN2A* e controles. O mesmo sítio CpG foi também detectado na comparação pacientes de melanoma esporádico versus controles, além de outros dois sítios: cg08749286, gene *MCPHI*, e cg07876831, gene *TMCO3*. Estudos adicionais são necessários para melhor compreender a relevância da metilação destes sítios no melanoma cutâneo. O gene *MCPHI* destaca-se como candidato devido à alta frequência de alteração genética em tumores e prévia associação com câncer.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Malek Z, Swope VB, Suzuki I, et al. Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1995; 92:1789-93.

Abdel-Rahman MH, Pilarski R, Cebulla CM, et al. Germline BAP1 mutation predisposes to uveal melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers. **J Med Genet** 2011; 48:856-9.

[ACS] American Cancer Society. **Cancer facts & figures 2015**. Available from: <URL:<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf>> [2015 mai 12]

Aguissa-Touré A-H, Li G. Genetic alterations of PTEN in human melanoma. **Cell Mol Life Sci** 2012; 69:1475-91.

Amos CI, Wang L-E, Lee JE, et al. Genome-wide association study identifies novel loci predisposing to cutaneous melanoma. **Hum Mol Genet** 2011; 20:5012-23.

Anderson DE. Hereditary aspects of malignant melanoma. **JAMA** 1967; 200:741-6.

Andrews JC. Malignant melanoma in siblings. **Arch Dermatol** 1968; 98:282-3.

Aoude LG, Wadt KAW, Pritchard AL, Hayward NK. Genetics of familial melanoma: 20 years after CDKN2A. **Pigment Cell Melanoma Res** 2015; 28:148-60.

Aoude LG, Xu M, Zhao ZZ, et al. Assessment of PALB2 as a candidate melanoma susceptibility gene. **PLoS One** 2014; 9:e100683.

Appelqvist F, Yhr M, Erlandson A, Martinsson T, Enerbäck C. Deletion of the MGMT gene in familial melanoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2014; 53:703-11.

Aso T, Yamazaki K, Amimoto K, et al. Identification and characterization of Elongin A2, a new member of the Elongin family of transcription elongation factors, specifically expressed in the testis. **J Biol Chem** 2000; 275:6546-52.

Assenov Y, Müller F, Lutsik P, Walter J, Lengauer T, Bock C. Comprehensive analysis of DNA methylation data with RnBeads. **Nat Methods** 2014; 11:1138-40.

- Bahuau M, Vidaud D, Kujas M, et al. Familial aggregation of malignant melanoma/dysplastic naevi and tumours of the nervous system: an original syndrome of tumour proneness. **Ann Genet** 1997; 40:78-91.
- Barrett JH, Iles MM, Harland M, et al. Genome-wide association study identifies three new melanoma susceptibility loci. **Nat Genet** 2011; 43:1108-13.
- Baubec T, Schübeler D. Genomic patterns and context specific interpretation of DNA methylation. **Curr Opin Genet Dev** 2014; 25C:85-92.
- Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. **Clin Cancer Res** 2008; 14:6821-8.
- Bennett KL, Mester J, Eng C. Germline epigenetic regulation of KILLIN in Cowden and Cowden-like syndrome. **JAMA** 2010; 304:2724-31.
- Bennett KL, Campbell R, Ganapathi S, et al. Germline and somatic DNA methylation and epigenetic regulation of KILLIN in renal cell carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2011; 50:654-61.
- Berdasco M, Esteller M. Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes. **Hum Genet** 2013; 132:359-83.
- Berger MF, Hodis E, Heffernan TP, et al. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. **Nature** 2012; 485:502-6.
- Berger W, Steiner E, Grusch M, Elbling L, Micksche M. Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity. **Cell Mol Life Sci** 2009; 66:43-61.
- Bertolotto C, Abbe P, Hemesath TJ, et al. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. **J Cell Biol** 1998; 142:827-35.
- Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, et al. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. **Nature** 2011; 480:94-8.
- Bertolotto C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. **Scientifica (Cairo)** 2013; 2013:635203.

Berwick M, MacArthur J, Orlow I, et al. MITF E318K's effect on melanoma risk independent of, but modified by, other risk factors. **Pigment Cell Melanoma Res** 2014; 27:485-8.

Bestor T, Laudano A, Mattaliano R, Ingram V. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. **J Mol Biol** 1988; 203:971-83.

Bestor TH. Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. **EMBO Journal** 1992; 11:2611-7.

Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi. **Arch Dermatol** 2003; 139:1620-4; discussion 1624.

Bhutani N, Burns DM, Blau HM. DNA demethylation dynamics. **Cell** 2011; 146:866-72.

Bibikova M, Barnes B, Tsan C, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. **Genomics** 2011; 98:288-95.

Bishop DT, Demenais F, Iles MM, et al. Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. **Nat Genet** 2009; 41:920-5.

Bogenrieder T, Herlyn M. The molecular pathology of cutaneous melanoma. **Cancer Biomark** 2010; 9:267-86.

Boks MP, Van Mierlo HC, Rutten BPF, et al. Longitudinal changes of telomere length and epigenetic age related to traumatic stress and post-traumatic stress disorder. **Psychoneuroendocrinology** 2015; 51:506-12.

Booth MJ, Branco MR, Ficz G, et al. Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution. **Science** 2012; 336:934-7.

Brennan K, Flanagan JM. Is there a link between genome-wide hypomethylation in blood and cancer risk? **Cancer Prev Res (Phila)** 2012; 5:1345-57.

Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. **Photochem Photobiol** 84:539-49.

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. **Ann Surg** 1970; 172:902-8.

Brohem CA, Massaro RR, Tiago M, et al. Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death. **Pigment Cell Melanoma Res** 2012; 25:354-69.

Brown KM, Macgregor S, Montgomery GW, et al. Common sequence variants on 20q11.22 confer melanoma susceptibility. **Nat Genet** 2008; 40:838-40.

Campa D, Rizzato C, Stolzenberg-Solomon R, et al. TERT gene harbors multiple variants associated with pancreatic cancer susceptibility. **Int J Cancer** 2015; 137:2175-83.

Campos AHJFM, Silva AA, Mota LDDC, et al. The value of a tumor bank in the development of cancer research in Brazil: 13 years of experience at the a C camargo hospital. **Biopreserv Biobank** 2012; 10:168-73.

Candido S, Rapisarda V, Marconi A, et al. Analysis of the B-RafV600E mutation in cutaneous melanoma patient with occupational sun exposure. **Oncol Rep** 2014; 31:1079-82.

Cankovic M, Nikiforova MN, Snuderl M, et al. The role of MGMT testing in clinical practice: a report of the association for molecular pathology. **J Mol Diagn** 2013; 15:539-55.

Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, et al. Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. **Science** 1992; 258:1148-52.

Cao J, Song Y, Bi N, et al. DNA methylation-mediated repression of miR-886-3p predicts poor outcome of human small cell lung cancer. **Cancer Res** 2013; 73:3326-35.

Carbone M, Yang H, Pass HI, Krausz T, Testa R, Gaudino G. BAP1 and cancer. **Nat Rev Cancer** 2013; 13:153-9.

Cash HL, Tao L, Yuan J-M, et al. LINE-1 hypomethylation is associated with bladder cancer risk among nonsmoking Chinese. **Int J Cancer** 2012; 130:1151-9.

Cawley EP, Kruse WT, Pinkus HK. Genetic aspects of malignant melanoma. **AMA Arch Derm Syphilol** 1952; 65:440-50.

Chakraborty AK, Funasaka Y, Slominski A, et al. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. **Biochim Biophys Acta** 1996; 1313:130-8.

Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, Bertolotto C. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. **Pigment Cell Melanoma Res** 2010; 23:27-40.

Chen YA, Lemire M, Choufani S, et al. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. **Epigenetics** 2013; 8:203-9.

Chen Y, Soong J, Mohanty S, Xu L, Scott G. The neural guidance receptor Plexin C1 delays melanoma progression. **Oncogene** 2013; 32:4941-9.

Cheng Y, Kim JW, Liu W, et al. Genetic and epigenetic inactivation of TNFRSF10C in human prostate cancer. **Prostate** 2009; 69:327-35.

Chhajlani V, Wikberg JE. Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA (FEBS 11553). **FEBS Letters** 1996; 390:238.

Chubykin AA, Atasoy D, Etherton MR, et al. Activity-Dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by Neuroligin-1 versus Neuroligin-2. **Neuron** 2007; 54:919-31.

Clark WH, Elder DE, Guerry D, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Hum Pathol** 1984; 15:1147-65.

Clark WH, Reimer RR, Greene M, Ainsworth AM, Mastrangelo MJ. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. "The B-K mole syndrome". **Arch Dermatol** 1978; 114:732-8.



- Cobb JP, Walker DG. Studies on human melanoma cells in tissue culture. I. Growth characteristics and cytology. **Cancer Res** 1960; 20:858-67.
- Cockerell CJ. The pathology of melanoma. **Dermatol Clin** 2012; 30:445-68.
- Cooper DN, Krawczak M. Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. **Hum Genet** 1989; 83:181-8.
- Cronin JC, Wunderlich J, Loftus SK, et al. Frequent mutations in the MITF pathway in melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res** 2009; 22:435-44.
- Crucioli V, Stilwell J. The histogenesis of malignant melanoma in relation to pre-existing pigmented lesions. **J Cutan Pathol** 1982; 9:396-404.
- Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **N Engl J Med** 2005; 353:2135-47.
- Curtin JA., Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. **J ClinOncol** 2006; 24:4340-6.
- Cust AE, Goumas C, Holland E A., et al. MC1R genotypes and risk of melanoma before age 40 years: A population-based case-control-family study. **Int J Cancer** 2012; 131:E269-81.
- Czene K, Lichtenstein P, Hemminki K. Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish family-cancer database. **Int J Cancer** 2002; 99:260-6.
- Dahl C, Abildgaard C, Riber-Hansen R, Steiniche T, Lade-Keller J, Guldberg P. KIT is a frequent target for epigenetic silencing in cutaneous melanoma. **J Invest Dermatol** 2015; 135:516-24.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature** 2002; 417:949-54.
- de Araújo ESS, Marchi FA, Rodrigues TC, et al. Genome-wide DNA methylation profile of leukocytes from melanoma patients with and without CDKN2A mutations. **Exp Mol Pathol** 2014; 97:425-32.

de Araújo ESS, Pramio DT, Kashiwabara AY, et al. DNA Methylation Levels of Melanoma Risk Genes Are Associated with Clinical Characteristics of Melanoma Patients. **Biomed Res Int** 2015; 2015:376423.

de Ávila ALR, Krepischi ACV, Moredo LF, et al. Germline CDKN2A mutations in Brazilian patients of hereditary cutaneous melanoma. **Fam Cancer** 2014; 13:645-9.

de Snoo F A., Bishop DT, Bergman W, et al. Increased risk of cancer other than melanoma in CDKN2A founder mutation (p16-Leiden)-positive melanoma families. **Clin Cancer Res** 2008; 14:7151-7.

Dedeurwaerder S, Defrance M, Bizet M, Calonne E, Bontempi G, Fuks F. A comprehensive overview of Infinium HumanMethylation450 data processing. **Brief Bioinform** 2013; 15:929-41.

Di J, Han X, Gu W, et al. Association of hypomethylation of LINE-1 repetitive element in blood leukocyte DNA with an increased risk of hepatocellular carcinoma. **J Zhejiang Univ Sci B** 2011; 12:805-11.

Dickson PV, Gershenwald JE. Staging and prognosis of cutaneous melanoma. **Surg Oncol Clin N Am** 2011; 20:1-17.

Dobrovic A, Simpfendorfer D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. **Cancer Res** 1997; 57:3347-50.

Du P, Zhang X, Huang C-C, et al. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. **BMC Bioinformatics** 2010; 11:587.

Duro D, Bernard O, Della Valle V, Berger R, Larsen CJ. A new type of p16INK4/MTS1 gene transcript expressed in B-cell malignancies. **Oncogene** 1995; 11:21-9.

Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. **Nat Genet** 2006; 38:1378-85.

Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. **Science** 2003; 300:455.

- Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Carreira LH, Ljungdahl LG, Kuo KC, Gehrke CW. DNA methylation in thermophilic bacteria: N4-methylcytosine, 5-methylcytosine, and N6-methyladenine. **Nucleic Acids Res** 1985; 13:1399-412.
- Elder DE, Goldman LI, Goldman SC, Greene MH, Clark WH. Dysplastic nevus syndrome: a phenotypic association of sporadic cutaneous melanoma. **Cancer** 1980; 46:1787-94.
- Elder DE. Pathological staging of melanoma. **Methods Mol Biol** 2014; 1102:325-51.
- Eletr ZM, Wilkinson KD. An emerging model for BAP1's role in regulating cell cycle progression. **Cell Biochem Biophys** 2011; 60:3-11.
- El-Maarri O, Walier M, Behne F, et al. Methylation at global LINE-1 repeats in human blood are affected by gender but not by age or natural hormone cycles. **PLoS One** 2011; 6:e16252.
- Ennen M, Keime C, Kobi D, et al. Single-cell gene expression signatures reveal melanoma cell heterogeneity. **Oncogene** 2015; 34:3251-63.
- Erlandson A, Appelqvist F, Enerbäck C. Epigenetic mutations in CDKN2A in western Swedish families with hereditary malignant melanoma. **Mol Med Rep** 2008; 1:89-91.
- Esteller M, Silva JM, Dominguez G, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:564-9.
- Fang S, Han J, Zhang M, et al. Joint effect of multiple common SNPs predicts melanoma susceptibility. **PLoS One** 2013; 8:1-9.
- Fargnoli MC, Gandini S, Peris K, Maisonneuve P, Raimondi S. MC1R variants increase melanoma risk in families with CDKN2A mutations: a meta-analysis. **Eur J Cancer** 2010; 46:1413-20.
- Fedorenko I V, Gibney GT, Smalley KSM. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. **Oncogene** 2013; 32:3009-18.

Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature** 1983a; 301:89-92.

Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. **Biochem Biophys Res Commun** 1983b; 111:47-54.

Finegersh A, Rompala GR, Martin DIK, Homanics GE. Drinking beyond a lifetime: New and emerging insights into paternal alcohol exposure on subsequent generations. **Alcohol** 2015; 49:461-70.

Flanagan JM, Munoz-alegre M, Henderson S, et al. Gene-body hypermethylation of ATM in peripheral blood DNA of bilateral breast cancer patients. **Hum Mol Genet** 2009; 18:1332-42.

Florell SR. Population-Based Analysis of Prognostic Factors and Survival in Familial Melanoma. **J Clin Oncol** 2005; 23:7168-77.

Fraga MF, Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. **Trends Genet** 2007; 23:413-8.

Friso S, Udali S, Guarini P, et al. Global DNA hypomethylation in peripheral blood mononuclear cells as a biomarker of cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2013; 22:348-55.

Furney SJ, Turajlic S, Stamp G, et al. The mutational burden of acral melanoma revealed by whole-genome sequencing and comparative analysis. **Pigment Cell Melanoma Res** 2014; 27:835-8.

Gao F, Shi L, Russin J, et al. DNA methylation in the malignant transformation of meningiomas. **PLoS One** 2013; 8:e54114.

Gao L, Thakur A, Liang Y, et al. Polymorphisms in the TERT gene are associated with lung cancer risk in the Chinese Han population. **Eur J Cancer Prev** 2014; 23:497-501.

Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. **J Mol Biol** 1987; 196:261-82.

Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. **Nature** 2005; 436:117-22.

Gazzoli I, Loda M, Garber J, Syngal S, Kolodner RD. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. **Cancer Res** 2002; 62:3925-8.

Ghiorzo P, Pastorino L, Queirolo P, et al. Prevalence of the E318K MITF germline mutation in Italian melanoma patients: associations with histological subtypes and family cancer history. **Pigment Cell Melanoma Res** 2013; 26:259-62.

Giallongo C, Tibullo D, La Cava P, et al. BRIT1/MCPH1 expression in chronic myeloid leukemia and its regulation of the G2/M checkpoint. **Acta Haematol** 2011; 126:205-10.

Goldstein AM, Fraser MC, Struewing JP, et al. Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16INK4 mutations. **N Engl J Med** 1995; 333:970-4.

Goldstein AM, Tucker MA. Genetic epidemiology of familial melanoma. **Dermatol Clin** 1995; 13:605-12.

Goldstein AM, Chan M, Harland M, et al. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. **J Med Genet** 2007; 44:99-106.

Greger V, Passarge E, Höpping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. **Hum Genet** 1989; 83:155-8.

Gromowski T, Masojć B, Scott RJ, et al. Prevalence of the E318K and V320I MITF germline mutations in Polish cancer patients and multiorgan cancer risk-a population-based study. **Cancer Genet** 2014; 207:128-32.

Grottke C, Mantwill K, Dietel M, Schadendorf D, Lage H. Identification of differentially expressed genes in human melanoma cells with acquired resistance to various antineoplastic drugs. **Int J Cancer** 2000; 88:535-46.

Gruber SB, Barnhill RL, Stenn KS, Roush GC. Nevomelanocytic proliferations in association with cutaneous malignant melanoma: a multivariate analysis. **J Am Acad Dermatol** 1989; 21:773-80.

Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming G, Song H. Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. **Cell Cycle** 2011; 10:2662-8.

Haass NK, Herlyn M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. **J Invest Dermatol Symp Proc** 2005; 10:153-63.

Hackett J A, Surani MA. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 2013; 368:20110328.

Handolias D, Salemi R, Murray W, et al. Mutations in KIT occur at low frequency in melanomas arising from anatomical sites associated with chronic and intermittent sun exposure. **Pigment Cell Melanoma Res** 2010; 23:210-5.

Hartman ML, Czyz M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. **Cell Mol Life Sci** 2015; 72:1249-60.

Hayward NK. The current situation with regard to human melanoma and genetic inferences. **Curr Opin Oncol** 1996; 8:136-42.

Hearing VJ. Determination of melanin synthetic pathways. **J Invest Dermatol** 2011; 131:E8-E11.

Hendrix MJ, Seftor E A, Meltzer PS, et al. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:8018-23.

Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1994; 91:9700-4.

Heyn H, Sayols S, Moutinho C, et al. Linkage of DNA methylation quantitative trait loci to human cancer risk. **Cell Rep** 2014; 7:331-8.

Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, et al. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. **Cell** 1993; 74:395-404.

- Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. **Cell** 2012; 150:251-63.
- Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. **Science** 1975; 187:226-32.
- Hoon DSB, Spugnardi M, Kuo C, Huang SK, Morton DL, Taback B. Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients. **Oncogene** 2004; 23:4014-22.
- Horn S, Figl A, Rachakonda PS, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. **Science** 2013; 339:959-61.
- Hou L, Wang H, Sartori S, et al. Blood leukocyte DNA hypomethylation and gastric cancer risk in a high-risk Polish population. **Int J Cancer** 2010; 127:1866-74.
- Hou P, Liu D, Xing M. Genome-wide alterations in gene methylation by the BRAF V600E mutation in papillary thyroid cancer cells. **Endocr Relat Cancer** 2011; 18:687-97.
- Hou P, Liu D, Dong J, Xing M. The BRAF V600E causes widespread alterations in gene methylation in the genome of melanoma cells. **Cell Cycle** 2012; 11:286-95.
- Houseman EA, Christensen BC, Karagas MR, et al. Copy number variation has little impact on bead-array-based measures of DNA methylation. **Bioinformatics** 2009; 25:1999-2005.
- Howard G, Eiges R, Gaudet F, Jaenisch R, Eden A. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. **Oncogene** 2008; 27:404-8.
- Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. **J Invest Dermatol Symp Proc** 1996; 1:188-94.
- Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov G V, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. **Science** 2013; 339:957-9.

Hughes AE, Newton VE, Liu XZ, Read AP. A gene for Waardenburg Syndrome type 2 maps close to the human homologue of the microphthalmia gene at chromosome 3p12-p14.1. **Nat Genet** 1994; 7:509-12.

Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. **Nat Genet** 1994; 8:15-21.

Hyland PL, Burke LS, Pfeiffer RM, et al. LINE-1 methylation in peripheral blood and the risk of melanoma in melanoma-prone families with and without CDKN2A mutations. **Melanoma Res** 2013; 23:55-60.

Hyland PL, Burke LS, Pfeiffer RM, et al. Constitutional promoter methylation and risk of familial melanoma. **Epigenetics** 2014; 9:685-92.

Iles MM, Law MH, Stacey SN, et al. A variant in FTO shows association with melanoma risk not due to BMI. **Nat Genet** 2013; 45:428-32, 432e1.

Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, et al. Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. **PLoS Genetics** 2010; 6:e1001134.

Inno A, Fanetti G, Di Bartolomeo M, et al. Role of MGMT as biomarker in colorectal cancer. **World J Clin Cases** 2014; 2:835-9.

Jaffe AE, Irizarry RA. Accounting for cellular heterogeneity is critical in epigenome-wide association studies. **Genome Biology** 2014; 15:R31.

Jensen DE, Proctor M, Marquis ST, et al. BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. **Oncogene** 1998; 16:1097-112.

Jjingo D, Conley AB, Yi SV, Lunyak VV, King I. On the presence and role of human gene-body DNA methylation. **Oncotarget** 2012; 3:462-74.

Jones PA, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. **Nat Rev Genet** 2009; 10:805-11.

Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nat Rev Genet** 2012; 13:484-92.



Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. **Science** 1994a; 264:436-40.

Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, et al. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. **Nat Genet** 1994b; 8:23-6.

Kambara T, Simms LA, Whitehall VLJ, et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. **Gut** 2004; 53:1137-44.

Karpf AR, Lasek AW, Ririe TO, Hanks AN, Grossman D, Jones DA. Limited gene activation in tumor and normal epithelial cells treated with the DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. **Mol Pharmacol** 2004; 65:18-27.

Kefford RF, Newton Bishop JA, Bergman W, Tucker MA. Counseling and DNA testing for individuals perceived to be genetically predisposed to melanoma: A consensus statement of the Melanoma Genetics Consortium. **J Clin Oncol** 1999; 17:3245-51.

Khalkhali-Ellis Z. Maspin: the new frontier. **Clin Cancer Res** 2006; 12:7279-83.

Killian JK, Miettinen M, Walker RL, et al. Recurrent epimutation of SDHC in gastrointestinal stromal tumors. **Sci Transl Med** 2014; 6:268ra177.

Kimura J, Kudoh T, Miki Y, Yoshida K. Identification of dihydropyrimidinase-related protein 4 as a novel target of the p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. **Int J Cancer** 2011; 128:1524-31.

Koestler DC, Marsit CJ, Christensen BC, Accomando W, Langevin SM. Peripheral blood immune cell methylation profiles are associated with nonhematopoietic cancers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2012; 21:1293-302.

Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, Harlow E. Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. **Nature** 1995; 375:506-10.

Kostaki M, Manona AD, Stavrika I, et al. High-frequency p16(INK) (4A) promoter methylation is associated with histone methyltransferase SETDB1 expression in sporadic cutaneous melanoma. **Exp Dermatol** 2014; 23:332-8.

Kriaucionis S, Tahiliani M. Expanding the epigenetic landscape: novel modifications of cytosine in genomic DNA. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2014; 6:a018630.

Kristensen LS, Nielsen HM, Hansen LL. Epigenetics and cancer treatment. **Eur J of Pharmacol** 2009; 625:131-42.

Kulis M, Queirós AC, Beekman R, Martín-Subero JI. Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer. **Biochim Biophys Acta** 2013; 1829:1161-74.

Lage H, Helmbach H, Grottke C, Dietel M, Schadendorf D. DFNA5 (ICERE-1) contributes to acquired etoposide resistance in melanoma cells. **FEBS letters** 2001; 494:54-9.

Lahtz C, Stranzenbach R, Fiedler E, Helmbold P, Dammann RH. Methylation of PTEN as a prognostic factor in malignant melanoma of the skin. **J Invest Dermatol** 2010; 130:620-2.

Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:253-66.

Lauss M, Haq R, Cirenajwis H, et al. Genome-Wide DNA Methylation Analysis in Melanoma Reveals the Importance of CpG Methylation in MITF Regulation. **J Invest Dermatol** 2015; 135:1820-8.

Law MH, Montgomery GW, Brown KM, et al. Meta-Analysis Combining New and Existing Data Sets Confirms that the TERT-CLPTM1L Locus Influences Melanoma Risk. **J Invest Dermatol** 2011; 132:485-7.

Law MH, Macgregor S, Hayward NK. Melanoma genetics: recent findings take us beyond well-traveled pathways. **J Invest Dermatol** 2012; 132:1763-74.

Lee JH, Choi J-W, Kim Y-S. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. **Br J Dermatol** 2011; 164:776-84.

Lee K, Kunkeaw N, Jeon SH, et al. Precursor miR-886, a novel noncoding RNA repressed in cancer, associates with PKR and modulates its activity. **RNA** 2011; 17:1076-89.

- Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D, Shivakrupa R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. **Stem Cells** 2005; 23:16-43.
- Leong SPL, Mihm MC, Murphy GF, et al. Progression of cutaneous melanoma: implications for treatment. **Clin Exp Metastasis** 2012; 29:775-96.
- Lerner AB, Fitzpatrick TB. Biochemistry of melanin formation. **Physiol Rev** 1950; 30:91-126.
- Li W, Sanki A, Karim RZ, et al. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. **Pathology** 2006; 38:287-301.
- Liao LM, Brennan P, Van Bommel DM, et al. LINE-1 methylation levels in leukocyte DNA and risk of renal cell cancer. **PLoS One** 2011; 6:e27361.
- Ligtenberg MJL, Kuiper RP, Chan TL, et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. **Nat Genet** 2009; 41:112-7.
- Lokk K, Modhukur V, Rajashekar B, et al. DNA methylome profiling of human tissues identifies global and tissue-specific methylation patterns. **Genome Biology** 2014; 15:R54.
- Loriot A, De Plaen E, Boon T, De Smet C. Transient down-regulation of DNMT1 methyltransferase leads to activation and stable hypomethylation of MAGE-A1 in melanoma cells. **J Biol Chem** 2006; 281:10118-26.
- Lukas J, Parry D, Aagaard L, et al. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. **Nature** 1995; 375:503-6.
- Lynch HT, Fritchot BC, Lynch JF. Familial atypical multiple mole-melanoma syndrome. **J Med Genet** 1978; 15:352-6.
- Macgregor S, Montgomery GW, Liu JZ, et al. Genome-wide association study identifies a new melanoma susceptibility locus at 1q21.3. **Nat Genet** 2011; 43:1114-8.
- Marini A, Mirmohammadsadegh A, Nambiar S, Gustrau A, Ruzicka T, Hengge UR. Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma. **J Invest Dermatol** 2006; 126:422-31.

Marks MS, Seabra MC. The melanosome: membrane dynamics in black and white. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2001; 2:738-48.

Marks R, Dorevitch AP, Mason G. Do all melanomas come from “moles”? A study of the histological association between melanocytic naevi and melanoma. **Australas J Dermatol** 1990; 31:77-80.

Marsit C, Christensen B. Blood-derived DNA methylation markers of cancer risk. **Adv Exp Medicine Biol** 2013; 754:233-52.

Marzuka-Alcalá A, Gabree MJ, Tsao H. Molecular Diagnostics for Melanoma. **Methods Mol Biol** 2014; 1102:381-3.

Mikeska T, Bock C, Do H, Dobrovic A. DNA methylation biomarkers in cancer: progress towards clinical implementation. **Expert Rev Mol Diagn** 2012; 12:473-87.

Mikeska T, Craig JM. DNA Methylation Biomarkers: Cancer and Beyond. **Genes (Basel)** 2014; 5:821-64.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Mollereau C, Mazarguil H, Zajac J-M, Roumy M. Neuropeptide FF (NPFF) analogs functionally antagonize opioid activities in NPFF2 receptor-transfected SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Mol Pharmacol** 2005; 67:965-75.

Molognoni F, Cruz AT, Meliso FM, et al. Epigenetic reprogramming as a key contributor to melanocyte malignant transformation. **Epigenetics** 2011; 6:450-64.

Moore LE, Pfeiff RM, Poscablo C, et al. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study : a case - control study. **Lancet Oncol** 2008; 359-66.

Morris TJ, Butcher LM, Feber A, et al. ChAMP: 450k Chip Analysis Methylation Pipeline. **Bioinformatics** 2014; 30:428-30.

Morris TJ, Beck S. Analysis pipelines and packages for Infinium HumanMethylation450 BeadChip (450k) data. **Methods** 2015; 72:3-8.

Moscovich M, LeDoux MS, Xiao J, et al. Dystonia, facial dysmorphism, intellectual disability and breast cancer associated with a chromosome 13q34 duplication and overexpression of TFDP1: case report. **BMC Med Genet** 2013; 14:70.

Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. **Science** 1992; 257:1248-51.

Nestor CE, Ottaviano R, Reinhardt D, et al. Rapid reprogramming of epigenetic and transcriptional profiles in mammalian culture systems. **Genome Biology** 2015; 16:11.

Nguyen T, Kuo C, Nicholl MB, et al. Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma. **Epigenetics** 2011; 6:388-94.

Njauw C-NJ, Kim I, Piris A, et al. Germline BAP1 inactivation is preferentially associated with metastatic ocular melanoma and cutaneous-ocular melanoma families. **PLoS One** 2012; 7:e35295.

Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. **Nature** 1994; 368:753-6.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell** 1999; 99:247-57.

Olsen CM, Carroll HJ, Whiteman DC. Familial melanoma: a meta-analysis and estimates of attributable fraction. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2010a; 19:65-73.

Olsen CM, Carroll HJ, Whiteman DC. Estimating the attributable fraction for cancer: A meta-analysis of nevi and melanoma. **Cancer Prev Res (Phila)** 2010b; 3:233-45.

Otsuka T, Takayama H, Sharp R, et al. c-Met autocrine activation induces development of malignant melanoma and acquisition of the metastatic phenotype. **Cancer Res** 1998; 58:5157-67.

Paliwal A, Temkin AM, Kerkel K, et al. Comparative anatomy of chromosomal domains with imprinted and non-imprinted allele-specific DNA methylation. **PLoS Genet** 2013; 9:e1003622.

Palmer JS, Duffy DL, Box NF, et al. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? **Am J Hum Genet** 2000; 66:176-86.

Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrest BA. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. **Cell Mol Life Sci** 2009; 66:1493-506.

Park JL, Kwon O-H, Kim JH, et al. Identification of body fluid-specific DNA methylation markers for use in forensic science. **Forensic Sci Int Genet** 2014; 13:147-53.

Patthey C, Gunhaga L. Signaling pathways regulating ectodermal cell fate choices. **Exp Cell Res** 2014; 321:11-6.

Pedersen KS, Bamlet WR, Oberg AL, et al. Leukocyte DNA methylation signature differentiates pancreatic cancer patients from healthy controls. **PLoS One** 2011; 6:e18223.

Pergoli L, Favero C, Pfeiffer RM, et al. Blood DNA methylation, nevi number, and the risk of melanoma. **Melanoma Res** 2014; 24:480-7.

Petty EM, Bologna JL, Bale AE, Yang-Feng T. Cutaneous malignant melanoma and atypical moles associated with a constitutional rearrangement of chromosomes 5 and 9. **Am J Med Genet** 1993; 45:77-80.

Piccolo FM, Fisher AG. Getting rid of DNA methylation. **Trends Cell Biol** 2014; 24:136-43.

Pidsley R, Y Wong CC, Volta M, Lunnon K, Mill J, Schalkwyk LC. A data-driven approach to preprocessing Illumina 450K methylation array data. **BMC Genomics** 2013; 14:293.

Pieper HC, Evert BO, Kaut O, Riederer PF, Waha A, Wüllner U. Different methylation of the TNF-alpha promoter in cortex and substantia nigra: Implications for selective neuronal vulnerability. **Neurobiol Dis** 2008; 32:521-7.

Piepkorn MW. Genetic basis of susceptibility to melanoma. **JAMA** 1994; 31:1022-39.

Pinheiro H, Bordeira-Carriço R, Seixas S, et al. Allele-specific CDH1 downregulation and hereditary diffuse gastric cancer. **Hum Mol Genet** 2010; 19:943-52.

Plongthongkum N, Diep DH, Zhang K. Advances in the profiling of DNA and beyond. **Nat Rev Genet** 2014; 15:647-61.

Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. **Nat Genet** 2003; 33:19-20.

Potapova A, Hoffman AM, Godwin AK, Al-Saleem T, Cairns P. Promoter hypermethylation of the PALB2 susceptibility gene in inherited and sporadic breast and ovarian cancer. **Cancer Res** 2008; 68:998-1002.

Potter C, McKay J, Groom A, et al. Influence of DNMT genotype on global and site specific DNA methylation patterns in neonates and pregnant women. **PLoS One** 2013; 8:e76506.

Pramio DT, Aguiar T, de Araujo ESS, et al. Low frequency of germline TERT and MITF mutations in Brazilian melanoma-prone patients. **Hereditary Genetics** 2014; 3:3-4.

Pramio DT. **Investigação do perfil mutacional em melanomas cutâneos e impacto no padrão global de metilação do DNA**. São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Price ME, Cotton AM, Lam LL, et al. Additional annotation enhances potential for biologically-relevant analysis of the Illumina Infinium HumanMethylation450 beadchip array. **Epigenetics Chromatin** 2013; 6:4.

Prickett TD, Samuels Y. Molecular pathways: dysregulated glutamatergic signaling pathways in cancer. **Clin Cancer Res** 2012; 18:4240-6.

Puntervoll HE, Yang XR, Vetti HH, et al. Melanoma prone families with CDK4 germline mutation: phenotypic profile and associations with MC1R variants. **J Med Genet** 2013; 50:264-70.

Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. **Cell** 1995; 83:993-1000.

Rahman N. Realizing the promise of cancer predisposition genes. **Nature** 2014; 505:302-8.

Rancourt RC, Harris HR, Michels KB. Methylation levels at imprinting control regions are not altered with ovulation induction or in vitro fertilization in a birth cohort. **Hum Reprod** 2012; 27:2208-16.

Rastetter M, Schagdarsurengin U, Lahtz C. Frequent intra-tumoural heterogeneity of promoter hypermethylation in malignant melanoma. **Histol Histopathol** 2007; 1005-15.

Ratel D, Ravanat J-L, Berger F, Wion D. N6-methyladenine: the other methylated base of DNA. **Bioessays** 2006; 28:309-15.

Rebecca VW, Sondak VK, Smalley KSM. A brief history of melanoma: from mummies to mutations. **Melanoma Res** 2012; 22:114-22.

Reed JA, Loganzo F, Shea CR, et al. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. **Cancer Res** 1995; 55:2713-8.

Reed J A, Lin Q, Chen D, Mian IS, Medrano EE. SKI pathways inducing progression of human melanoma. **Cancer Metastasis Rev** 2005; 24:265-72.

Richards EJ. Inherited epigenetic variation--revisiting soft inheritance. **Nat Rev Genet** 2006; 7:395-401.

Rigel DS. Epidemiology of melanoma. **Semin Cutan Med Surg** 2010; 29:204-9.

Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. **Cytogenet Cell Genet** 1975; 14:9-25.

Rivers JK, Kelly MC, Kopf AW, Welkovich B, Bart RS. Age and malignant melanoma: comparison of variables in different age-groups. **JAMA** 1989; 21:717-22.



Robles-Espinoza CD, Del Castillo Velasco-Herrera M, Hayward NK, Adams DJ. Telomere-Regulating Genes and the Telomere Interactome in Familial Cancers. **Mol Cancer Res** 2014a; 13:211-22.

Robles-Espinoza CD, Harland M, Ramsay AJ, et al. POT1 loss-of-function variants predispose to familial melanoma. **Nat Genet** 2014b; 46:478-81.

Roguin A. Rene Theophile Hyacinthe Laënnec (1781-1826): the man behind the stethoscope. **Clin Med Res** 2006; 4:230-5.

Romanelli V, Nakabayashi K, Vizoso M, et al. Variable maternal methylation overlapping the nc886/vtRNA2-1 locus is locked between hypermethylated repeats and is frequently altered in cancer. **Epigenetics** 2014; 9:83-90.

Rönn T, Volkov P, Davegårdh C, et al. A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. **PLoS Genet** 2013; 9:e1003572.

Russak JE, Rigel DS. Risk factors for the development of primary cutaneous melanoma. **Dermatol Clin** 2012; 30:363-8.

Sandoval J, Heyn H A., Moran S, et al. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. **Epigenetics** 2011; 6:692-702.

Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2006; 103:1412-7.

Schinke C, Mo Y, Yu Y, et al. Aberrant DNA methylation in malignant melanoma. **Melanoma Res** 2010; 20:253-65.

Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. **Nature** 2015; 517:321-6.

Schultz MD, He Y, Whitaker JW, et al. Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation. **Nature** 2015; 523:212-6.

Scott G A, McClelland L A, Fricke AF, Fender A. Plexin C1, a receptor for semaphorin 7a, inactivates cofilin and is a potential tumor suppressor for melanoma progression. **J. Invest Dermatol** 2009; 129:954-63.

Shadrina AS, Boyarskikh UA, Oskina NA, et al. TERT polymorphisms rs2853669 and rs7726159 influence on prostate cancer risk in Russian population. **Tumour Biol** 2015; 36:841-7.

Shekar SN, Duffy DL, Youl P, et al. A population-based study of Australian twins with melanoma suggests a strong genetic contribution to liability. **J Invest Dermatol** 2009; 129:2211-9.

Shi J, Yang XR, Ballew B, et al. Rare missense variants in POT1 predispose to familial cutaneous malignant melanoma. **Nat Genet** 2014; 46:482-6.

Sigalotti L, Fratta E, Bidoli E, et al. Methylation levels of the “long interspersed nucleotide element-1” repetitive sequences predict survival of melanoma patients. **J Transl Med** 2011; 9:78.

Silva JM, Bulman C, McMahon M. BRAFV600E cooperates with PI3K signaling, independent of AKT, to regulate melanoma cell proliferation. **Mol Cancer Res** 2014; 12:447-63.

Slieker RC, Bos SD, Goeman JJ, et al. Identification and systematic annotation of tissue-specific differentially methylated regions using the Illumina 450k array. **Epigenetics Chromatin** 2013; 6:26.

Smith FE, Henly WS, Knox JM, Lane M. Familial melanoma. **Arch Intern Med** 1966; 117:820-3.

Song F, Amos CI, Lee JE, et al. Identification of a melanoma susceptibility locus and somatic mutation in TET2. **Carcinogenesis** 2014; 35:2097-101.

Soufir N, Avril MF, Chompret A, et al. Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. **Hum Mol Genet** 1998; 7:209-16.

Spruijt CG, Vermeulen M. DNA methylation: old dog, new tricks? **Nat Struct Mol Biol** 2014; 21:949-54.

Stirzaker C, Taberlay PC, Statham AL, Clark SJ. Mining cancer methylomes: Prospects and challenges. **Trends Genet** 2014; 30:75-84.

Stone S, Jiang P, Dayananth P, et al. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. **Cancer Res** 1995; 55:2988-94.

Straume O, Smeds J, Kumar R, Hemminki K, Akslen LA. Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C>T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. **Am J Pathol** 2002; 161:229-37.

Stubblefield J, Kelly B. Melanoma in non-caucasian populations. **Surg Clin North Am** 2014; 94:1115-26, ix.

Sung CO, Kim SC, Karnan S, et al. Genomic profiling combined with gene expression profiling in primary central nervous system lymphoma. **Blood** 2011; 117:1291-300.

Swan EJ, Maxwell AP, McKnight AJ. Distinct methylation patterns in genes that affect mitochondrial function are associated with kidney disease in blood-derived DNA from individuals with Type 1 diabetes. **Diabet Med** 2015; 32:1110-5.

Takeuchi T, Adachi Y, Sonobe H, Furihata M, Ohtsuki Y. A ubiquitin ligase, skeletrophin, is a negative regulator of melanoma invasion. **Oncogene** 2006; 25:7059-69.

Talve L, Sauroja I, Collan Y, Punnonen K, Ekfors T. Loss of expression of the p16INK4/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage. **Int J Cancer** 1997; 74:255-9.

Tassabehji M, Newton VE, Read AP. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. **Nat Genet** 1994; 8:251-5.

Teerlink C, Farnham J, Allen-Brady K, et al. A unique genome-wide association analysis in extended Utah high-risk pedigrees identifies a novel melanoma risk variant on chromosome arm 10q. **Hum Genet** 2012; 131:77-85.

Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A, et al. An epigenetic signature in peripheral blood predicts active ovarian cancer. **PLoS One** 2009; 4:e8274.

Teschendorff AE, Marabita F, Lechner M, et al. A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data. **Bioinformatics** 2013; 29:189-96.

Testa JR, Cheung M, Pei J, et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. **Nat Genet** 2011; 43:1022-5.

Touleimat N, Tost J. Complete pipeline for Infinium ® Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. **Epigenomics** 2012; 4:325-41.

Treppendahl MB, Qiu X, Sogaard A, et al. Allelic methylation levels of the noncoding VTRNA2-1 located on chromosome 5q31.1 predict outcome in AML. **Blood** 2012; 119:206-16.

Triche TJ, Weisenberger DJ, Van Den Berg D, Laird PW, Siegmund KD. Low-level processing of Illumina Infinium DNA Methylation BeadArrays. **Nucleic Acids Res** 2013; 41:e90.

Tsao H, Bevona C, Goggins W, Quinn T. The transformation rate of moles (melanocytic nevi) into cutaneous melanoma: a population-based estimate. **Arch Dermatol** 2003; 139:282-8.

Ulahannan N, Grealley JM. Genome-wide assays that identify and quantify modified cytosines in human disease studies. **Epigenetics Chromatin** 2015; 8:5.

Unternaehrer E, Meyer AH, Burkhardt SCA, et al. Childhood maternal care is associated with DNA methylation of the genes for brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and oxytocin receptor (OXTR) in peripheral blood cells in adult men and women. **Stress** 2015; 18:461-62.

Uong A, Zon LI. Melanocytes in development and cancer. **J Cell Physiol** 2010; 222:38-41.

Urteaga O, Pack GT. On the antiquity of melanoma. **Cancer** 1966; 19:607-10.

Usher-Smith J A, Emery J, Kassianos AP, Walter FM. Risk prediction models for melanoma: a systematic review. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2014; 23:1450-63.

Valverde P, Healy E, Sikkink S, et al. The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with melanoma. **Hum Mol Genet** 1996; 5:1663-6.

van der Velden PA, Metzelaar-Blok J, Bergman W, et al. Promoter hypermethylation: a common cause of reduced p16 (INK4a) expression in uveal melanoma. **Cancer Res** 2001; 61:5303.

van Doorn R, Zoutman WH, Gruis NA. Absence of germline epimutation of the CDKN2A gene in familial melanoma. **J Invest Dermatol** 2009; 129:781-4.

Venkatachalam R, Ligtenberg MJL, Hoogerbrugge N, et al. Germline epigenetic silencing of the tumor suppressor gene PTPRJ in early-onset familial colorectal cancer. **Gastroenterology** 2010; 139:2221-4.

Venkatesh T, Suresh PS. Emerging roles of MCPH1: expedition from primary microcephaly to cancer. **Eur J Cell Biol** 2014; 93:98-105.

Vinagre J, Almeida A, Pópulo H, et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. **Nat Commun** 2013; 4:2185.

Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Lin AH, Markl ID, Fountain JW. Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. **Genes Chromosomes Cancer** 1998; 22:157-63.

Walker GJ, Indsto JO, Sood R, et al. Deletion mapping suggests that the 1p22 melanoma susceptibility gene is a tumor suppressor localized to a 9-Mb interval. **Genes Chromosomes Cancer** 2004; 41:56-64.

Walters RJ, Williamson EJ, English DR, et al. Association between hypermethylation of DNA repetitive elements in white blood cell DNA and early-onset colorectal cancer. **Epigenetics** 2013; 8:748-55.

Walton E, Hass J, Liu J, et al. Correspondence of DNA Methylation Between Blood and Brain Tissue and its Application to Schizophrenia Research. **Schizophr Bull** 2015; Jun 8. pii: sbv074.

Wang D, Yan L, Hu Q, et al. IMA: an R package for high-throughput analysis of Illumina's 450K Infinium methylation data. **Bioinformatics** 2012; 28:729-30.

Wang N, Lu H, Chen W, et al. Primary microcephaly gene MCPH1 shows a novel molecular biomarker of human renal carcinoma and is regulated by miR-27a. **Int J Clin Exp Pathol** 2014; 7:4895-903.

Wei X, Walia V, Lin JC, et al. Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. **Nat Genet** 2011; 43:442-6.

Weisenberger DJ. Characterizing DNA methylation alterations from the cancer genome atlas. **J Clin Invest** 2014; 124:17-23.

White AE, Harper JW. Cancer. emerging anatomy of the BAP1 tumor suppressor system. **Science** 2012; 337:1463-4.

Wiesner T, Obenaus AC, Murali R, et al. Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. **Nat Genet** 2011; 43:1018-21.

Williams PF, Olsen CM, Hayward NK, Whiteman DC. Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: a meta-analysis and estimates of population burden. **Int J Cancer** 2011; 129:1730-40.

Winter S, Fischle W. Epigenetic markers and their cross-talk. **Essays Biochem** 2010; 48:45-61.

Wölfel T, Hauer M, Schneider J, et al. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. **Science** 1995; 269:1281-4.

Wong EM, Southey MC, Fox SB, et al. Constitutional methylation of the BRCA1 promoter is specifically associated with BRCA1 mutation-associated pathology in early-onset breast cancer. **Cancer Prev Res (Phila)** 2011; 4:23-33.

Woo HD, Kim J. Global DNA hypomethylation in peripheral blood leukocytes as a biomarker for cancer risk: a meta-analysis. **PLoS One** 2012; 7:e34615.

Wu H, Caffo B, Jaffee HA, Irizarry RA, Feinberg AP. Redefining CpG islands using hidden Markov models. **Biostatistics** 2010; 11:499-514.

Xiang Y, Zhang J, Li Q, et al. DNA methylome profiling of maternal peripheral blood and placentas reveal potential fetal DNA markers for non-invasive prenatal testing. **Mol Hum Reprod** 2014; 20:875-84.

Xiong Y, Zhang L, Holloway AK, Wu X, Su L, Kebebew E. MiR-886-3p regulates cell proliferation and migration, and is dysregulated in familial non-medullary thyroid cancer. **PLoS One** 2011; 6:e24717.

Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. **Nature** 2011; 480:99-103.

You Y, Ma L, You M, et al. TSLC1 gene silencing in cutaneous melanoma. **Melanoma Res** 2010; 20:179-83.

Young RJ, Waldeck K, Martin C, et al. Loss of CDKN2A expression is a frequent event in primary invasive melanoma and correlates with sensitivity to the CDK4/6 inhibitor PD0332991 in melanoma cell lines. **Pigment Cell Melanoma Res** 2014; 27:590-600.

Yu H, Pak H, Hammond-Martel I, et al. Tumor suppressor and deubiquitinase BAP1 promotes DNA double-strand break repair. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2013; 111:285-90.

Zendman AJ, De Wit NJ, Van Kraats AA, Weidle UH, Ruitter DJ, Van Muijen GN. Expression profile of genes coding for melanoma differentiation antigens and cancer/testis antigens in metastatic lesions of human cutaneous melanoma. **Melanoma Res** 2001; 11:451-9.

Zhang H, Weng X, Ye J, He L, Zhou D, Liu Y. Promoter hypermethylation of TERT is associated with hepatocellular carcinoma in the Han Chinese population. **Clin Res Hepatol Gastroenterol** 2015; pii:S2210-740

Zhang J, Wu XB, Fan JJ, et al. MCPH1 Protein Expression in Normal and Neoplastic Lung Tissues. **Asian Pac J Cancer Prev** 2013; 14:7295-300.

Zhang LL, Wu J, Liu Q, Zhang Y, Sun Z, Jing H. MiR-886-5p inhibition inhibits growth and induces apoptosis of MCF7 Cells. **Asian Pac J Cancer Prev** 2014; 15:1511-5.

Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. **Cell** 1998; 92:725-34.

Zhang Y, Schöttker B, Florath I, et al. Smoking-associated DNA methylation biomarkers and their predictive value for all-cause and cardiovascular mortality. **Environ Health Perspect** 2015 May 27. [Epub ahead of print].

Zhuang J, Widschwendter M, Teschendorff AE. A comparison of feature selection and classification methods in DNA methylation studies using the Illumina Infinium platform. **BMC Bioinformatics** 2012; 13:59.

Zou J, Lippert C, Heckerman D, Aryee M, Listgarten J. Epigenome-wide association studies without the need for cell-type composition. **Nat Methods** 2014; 11:309-11.

Zuo L, Weger J, Yang Q, et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. **Nat Genet** 1996; 12:97-9.



Anexo 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center-CEP



Centro de Tratamento, Ensino e Pesquisa em Câncer

Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP

São Paulo, 10 de Agosto de 2012.

A

Dra. Ana Cristina Victorino Krepisch.

Aluna: Érica Sara Souza de Araújo (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 1695/12

“Perfil global de metilação do genoma na síndrome do melanoma familiar”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 28/08/2012, **aprovaram** a realização do projeto do estudo em referência, datado de 23 de julho de 2012 e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco do Hospital AC Camargo;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas Pelo Biobanco do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Núcleo de Câncer de Pele e Dermatologia do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE);
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Solicitação de inclusão da Dra. Maria Isabel Alves Waddington Achatz como colaboradora do projeto em referência; em carta datada de 05 de setembro de 2012.

**Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.**

Atenciosamente,

Dr. Jefferson Luiz Gross  
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

**Anexo 2** - Identificação de algumas amostras da casuística no banco de dados Gene Expression Omnibus

<b>Tese*</b>	<b>GEO (GSE54939)</b>
MeLM1	GSM1326822
MeLM2	GSM1326823
MeLM3	GSM1326824
MeLM4	GSM1326825
MeLM5	GSM1326826
MeLM6	GSM1326827
MeLM7	GSM1326828
MeLM8	GSM1326829
Me11	GSM1326830
Me13	GSM1326831
Me14	GSM1326832
Me15	GSM1326833
Me17	GSM1326834
Me18	GSM1326835
Me111	GSM1326836
Me113	GSM1326837
C1	GSM1326838
C2	GSM1326839
C3	GSM1326840
C4	GSM1326841
C5	GSM1326842
C6	GSM1326843
C7	GSM1326844
C8	GSM1326845

\*Demais amostras utilizadas na tese serão disponibilizadas no banco após publicação integral dos resultados.

GEO= Gene Expression Omnibus

## Research Article

# DNA Methylation Levels of Melanoma Risk Genes Are Associated with Clinical Characteristics of Melanoma Patients

Érica S. S. de Araújo,<sup>1</sup> Dimitrius T. Pramio,<sup>1</sup> André Y. Kashiwabara,<sup>2</sup> Paula C. Pennacchi,<sup>3</sup> Silvy S. Maria-Engler,<sup>3</sup> Maria I. Achatz,<sup>1,4</sup> Antonio H. J. F. M. Campos,<sup>5</sup> João P. Duprat,<sup>6</sup> Carla Rosenberg,<sup>7</sup> Dirce M. Carraro,<sup>1</sup> and Ana C. V. Krepschi<sup>1,7</sup>

<sup>1</sup>International Research Center, A.C. Camargo Cancer Center, Rua Taguá 440, 01508010 São Paulo, SP, Brazil

<sup>2</sup>Federal Technological University of Paraná, Avenida Alberto Carazzai 1640, 86300000 Cornélio Procopio, PR, Brazil

<sup>3</sup>School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes 580, 05508000 São Paulo, SP, Brazil

<sup>4</sup>Department of Oncogenetics, A.C. Camargo Cancer Center, Rua Professor Antônio Prudente 211, 01509010 São Paulo, SP, Brazil

<sup>5</sup>Department of Pathology, A.C. Camargo Cancer Center, Rua Professor Antônio Prudente 211, 01509010 São Paulo, SP, Brazil

<sup>6</sup>Skin Cancer Department, A.C. Camargo Cancer Center, Rua Professor Antônio Prudente 211, 01509010 São Paulo, SP, Brazil

<sup>7</sup>Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, Rua do Matão 277, 05508090 São Paulo, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Ana C. V. Krepschi; [ana.krepischi@ib.usp.br](mailto:ana.krepischi@ib.usp.br)

Received 21 January 2015; Accepted 23 March 2015

Academic Editor: Rajiv Kumar

Copyright © 2015 Érica S. S. de Araújo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

In melanoma development, oncogenic process is mediated by genetic and epigenetic mutations, and few studies have so far explored the role of DNA methylation either as predisposition factor or biomarker. We tested patient samples for germline *CDKN2A* methylation status and found no evidence of inactivation by promoter hypermethylation. We have also investigated the association of clinical characteristics of samples with the DNA methylation pattern of twelve genes relevant for melanomagenesis. Five genes (*BAP1*, *MGMT*, *MITF*, *PALB2*, and *POT1*) presented statistical association between blood DNA methylation levels and either *CDKN2A*-mutation status, number of lesions, or Breslow thickness. In tumors, five genes (*KIT*, *MGMT*, *MITF*, *TERT*, and *TNF*) exhibited methylation levels significantly different between tumor groups including acral compared to nonacral melanomas and matched primary lesions and metastases. Our data pinpoint that the methylation level of eight melanoma-associated genes could potentially represent markers for this disease both in peripheral blood and in tumor samples.

## 1. Introduction

Cutaneous melanoma has an increasing incidence rate worldwide [1]. The occurrence of this type of cancer is associated with skin color, geographic localization, and intermittent exposure to sunlight, and the former is probably the major cause of the increase in melanoma cases [2].

The risk of melanoma development rises 30- to 70-fold in individuals with family history of the disease [3]. Two genes harboring high-risk germline mutations have been recognized: *CDKN2A* [4–6] and *CDK4* [7]. Germline mutations in additional genes were recently associated with melanoma occurrence: *MITF* [8], *BAP1* [9], *TERT* promoter [10], *POT1*

[11], and *MGMT* [12]. In addition, some alterations in genes known to be related to melanin synthesis, such as *MC1R* [13, 14], have been reported as low-risk variants for melanoma development. The implication of other candidate genes in melanoma predisposition is supported by less conclusive evidence, such as *PALB2*, in which a deleterious mutation has been detected in a single individual affected by four kinds of cancer, including melanoma [15].

In addition to genetic mutations, early events of anomalous DNA methylation at specific *loci* (epimutations) can eventually result in cancer predisposition, as already reported for colorectal [16, 17], gastric [18], and breast cancers [19]. Although melanoma epimutations have not been identified

so far [20, 21], abnormal methylation levels of *TNF* and *TNFRSF10C* genes have been associated with melanoma risk [22, 23]. Moreover, somatic DNA methylation changes are crucial for skin melanoma progression [24]. Recently, the occurrence of *KIT* epigenetic silencing in cutaneous melanomas has been demonstrated [25], supporting earlier studies that had shown decrease of *KIT* expression associated with melanoma progression [26].

In this work, we investigated the methylation pattern of germline *CDKN2A* and other 10 melanoma-related genes in leukocytes of melanoma patients (familial and sporadic cases), relating these findings to melanoma occurrence and clinical characteristics. The methylation profile of these genes and *KIT* was also investigated in a group of cutaneous melanomas.

## 2. Material and Methods

This was a retrospective study based on samples from melanoma patients retrieved from the A.C.Camargo Cancer Center Biobank, São Paulo, Brazil, and approved by the Institutional Ethics Committee Board (1695/12 and 1765/13).

**2.1. Peripheral Blood Samples of Melanoma Patient and Control Groups.** Melanoma patients were treated at the A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil. DNA samples were extracted from peripheral blood obtained from 69 unrelated cutaneous melanoma patients who had not previously received chemotherapy, most of them being stage I (58.0%). The patients were classified into three groups: hereditary melanoma carrying pathogenic *CDKN2A*-mutations ( $n = 8$ ), familial history of melanoma without *CDKN2A*-mutations ( $n = 20$ ), and sporadic cases (without family history of the disease;  $n = 41$ ). The 20 hereditary melanoma patients who had previously tested negative for *CDKN2A*-mutations [27] fulfilled at least one of the following criteria: (a) familial melanoma (family history of three or more relatives of two consecutive generations with melanomas, at least one case before 50 years old;  $n = 9$ ) or (b) multiple primary melanomas ( $\geq 3$  primary lesions,  $n = 8$ ; or  $\geq 2$  primary melanomas, one of which before 35 years old,  $n = 3$ ).

The control group was composed of 12 individuals without cancer history, matched by age (range for each being 10 years) and gender to the subset of melanoma patients who were analyzed by DNA methylation array.

**2.2. Cutaneous Melanoma and Melanocyte Samples.** Frozen tissues from 18 unrelated primary skin melanomas (five acral and thirteen nonacral subtypes) were retrieved from the A.C.Camargo Tissue Bank. DNA extraction was processed at A.C.Camargo DNA and RNA Bank [28]. Paired metastases were available for seven tumors. The majority of tumors were classified as stage III (66.7%), but this information was missing for the remaining samples.

The primary cultures of melanocytes were provided by the School of Pharmaceutical Sciences (University of São Paulo). Primary skin cell cultures (melanocytes) were obtained from foreskin samples of three healthy donors [29]

under approval of the local ethics committee (CEP HU/USP 943/09).

**2.3. Pyrosequencing.** Quantitative bisulfite pyrosequencing for *CDKN2A* promoter was performed using PyroMark Q96 CpG p16 (Qiagen), which analyzes seven CpG sites of p16 isoform (position +148 to +174 of the ENSG00000147889). A total of 68 peripheral blood samples from patients were analyzed: seven *CDKN2A*-mutation carriers, 20 hereditary melanoma patients without *CDKN2A*-mutations, and 41 sporadic melanoma patients. The methylation levels were obtained using PyroMark Q96-CpG Software (Qiagen), which provides the percentage of methylated cytosines relative to the sum of methylated and unmethylated cytosines.

**2.4. HM450K Genome-Wide Methylation Analysis.** DNA methylation array was performed in samples from 18 cutaneous melanomas, three melanocyte primary cultures, and leukocyte samples from 12 control individuals and from a subset of 39 melanoma patients (eight *CDKN2A*-mutation carriers, 19 hereditary melanoma patients without *CDKN2A*-mutations, and 12 sporadic melanoma patients).

Bisulfite modification was performed on  $1\ \mu\text{g}$  of DNA using EZ DNA methylation kit (Zymo Research). The DNA methylation levels of CpG sites were obtained using the Infinium HumanMethylation450K BeadChips (HM450K, Illumina), according to the manufacturer's instructions. Bioconductor IMA package was applied for quality control of array methylation data [30]. We removed from further analyses probes that were lacking beta-values, containing SNPs, mapped at chromosomes X and Y, or with detection  $P$  values  $> 0.01$ . Probe type bias adjustment was achieved by Beta Mixture Quantile dilation (BMIQ) using ChAMP package [31].

The level of methylation of each CpG probe was calculated as a beta-value ranging from 0 to 1 (0 for totally unmethylated CpG sites and 1 for fully methylated sites). Beta-values were retrieved for all CpG probes mapped within DNA sequences associated with the *BAP1*, *CDK4*, *CDKN2A*, *KIT*, *MC1R*, *MGMT*, *MIF*, *PALB2*, *POT1*, *TERT*, *TNF*, and *TNFRSF10C* genes (see Supplementary Tables 1 and 2 in Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2015/376423>). CpG sites were grouped into two categories, according to the annotation of the transcripts provided by Illumina, which is based on the UCSC database: "promoter" region (CpG probes mapped at TSS1500, TSS200, 5'UTR, or 1st exon) and "gene body" (remaining exons and intron probes). Methylation levels for promoters and bodies were obtained using the beta-value means of the corresponding CpG probes.

Microarray methylation data from peripheral blood were deposited into NCBI's Gene Expression Omnibus under accession number GSE54939 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE54939>).

**2.5. Statistical Analysis of HM450K Data.** DNA methylation differences between groups were tested for significance using either Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis with Dunn's

Multiple Comparison Post-test. The analysis comparing primary cutaneous melanoma and paired metastasis was performed using paired *t*-test.

### 3. Results

The quantitative bisulfite pyrosequencing of *CDKN2A* promoter was investigated to determine if any of the melanoma patients exhibited inactivation of this gene by hypermethylation. Data showed no evidence of *CDKN2A* hypermethylation in leukocytes of these patients. Among *CDKN2A*-mutation carriers, the methylation mean was 0.63% (ranging from 0 up to 1.5%), hereditary melanoma patients without *CDKN2A*-mutations showed a mean of 0.52% (0–3.0%), and sporadic melanoma patients presented a mean of 0.35% (0–1.5%). Statistical association between the clinical characteristics of melanoma patients and the methylation levels of p16 encode region was not detected (Breslow thickness  $P = 0.78$ ; number of melanomas  $P = 0.84$ ).

Next, we compared the levels of DNA methylation for CpG sites mapped in eleven melanoma-associated genes (*BAP1*, *CDK4*, *CDKN2A*, *MC1R*, *MGMT*, *MITF*, *PALB2*, *POT1*, *TERT*, *TNF*, and *TNFRSF10C*) between melanoma patients and controls. Only the gene body of *MGMT* showed a low level of methylation increase in *CDKN2A*-mutated patients compared to sporadic melanoma patients (2% increase in the methylation level,  $P = 0.02$ , Supplementary Table 3). Additionally, DNA methylation levels at the promoter regions of *BAP1*, *MITF*, and *PALB2* genes were statistically associated with the number of melanomas presented by the individual and a hypermethylation of *POT1* promoter was associated with Breslow thickness of the tumors (Table 1).

We also investigated the DNA methylation levels of twelve melanoma-associated genes (*BAP1*, *CDK4*, *CDKN2A*, *KIT*, *MC1R*, *MGMT*, *MITF*, *PALB2*, *POT1*, *TERT*, *TNF*, and *TNFRSF10C*) by comparing melanoma samples with cultured melanocytes. The methylation levels at the gene bodies of *MGMT*, *TERT*, and *TNF* were significantly lower in tumors, while both body and promoter of *KIT* were hypermethylated (Table 2). Acral melanomas exhibited differential methylation at the gene bodies of *MGMT* (4% hypomethylation in acral melanoma group,  $P = 7e - 3$ , Supplementary Table 4) and *TERT* (9% hypermethylation in acral melanoma group,  $P < 1e - 3$ , Supplementary Table 4) compared to nonacral tumors. We did not find significant differences comparing tumors from patients who did develop or not metastases (Supplementary Table 5); however, in the analysis of the seven paired primary-metastasis melanoma samples, the gene body of *MITF* was found to be hypomethylated in metastasis (8% of decreased methylation in relation to primary tumor,  $P = 0.02$ , Supplementary Table 6).

### 4. Discussion

Aberrant DNA methylation is usually an early and stable event in tumorigenesis and could be used for detecting and monitoring diseases [32]. Previous studies in melanoma and surrogate samples have revealed epigenetic markers based on

methylation patterns of *LINE-1* [33, 34], *RASSF1A* [35], *TSLC1* [36], and *MGMT* [37]. In this study, we have investigated the methylation levels of twelve melanoma genes to evaluate their potential role as predisposition factors and/or biomarkers. In fact, control of gene expression by DNA methylation has already been described for half of these investigated genes in different types of cancer [38–43]. Considering that the functional impact of DNA methylation in gene expression is better understood for CpGs mapped at gene promoters, we analyzed separately the probes mapped at promoters and gene bodies. Most of the genes here analyzed exhibited CpG islands in their promoter sequences, except for *MITF* and *TNF*.

Independent cohorts of patient peripheral blood and melanoma samples were analyzed. Overall, the detected DNA methylation differences in blood were very small (<5%), while tumors exhibited higher (>10%) differences. Indeed, previous studies have shown that epigenetic biomarkers in peripheral blood exhibit very small differences [44–47]. Significant DNA methylation changes were identified in peripheral blood mainly at gene promoters, while in tumors they appeared to cluster at gene bodies. Also, melanomas were mainly hypomethylated when compared to the control melanocytes; however, we cannot exclude the possibility that the DNA methylation pattern of the melanocytes could be altered because of *in vitro* conditions [48].

*MGMT* encodes a repair protein which removes alkyl groups from the O<sub>6</sub>-position of guanine residues [49] and its promoter methylation has been described as a biomarker in several studies, especially for glioblastoma [50] and colorectal cancer [51]. In melanoma, epigenetic silencing of this gene has been demonstrated in tumors and serum of patients [52, 53], suggesting that this event would be important for tumor development. In our study, we detected methylation differences at *MGMT* body both in peripheral blood and in tumor samples: *CDKN2A*-mutated patients showed a low-level hypermethylation in leukocytes compared to other melanoma patients, while tumors showed hypomethylation compared to melanocytes. Even though gene body methylation is a yet poorly explored mechanism, it has been reported in association with increased gene expression [54]. However, the relationship between intragenic methylation and gene expression appears not to be linear, since low body methylation levels have been associated with both low and high expression, and high body methylation levels have been already reported linked to intermediate expression [55]. Additional studies in melanomas are necessary to clarify the role of the observed methylation changes in the expression of the *MGMT* gene.

*MITF* is a transcription factor that controls genes of cell cycle and melanogenesis [56, 57]. Hypermethylation of the *MITF* promoter was detected in peripheral blood of those melanoma patients who developed more than one lesion (multiple primary melanomas), and *MITF* gene body was found to be somehow hypermethylated in primary tumors compared to metastasis. Interestingly, *MITF* expression was reported as variable among melanoma specimens and even intratumor [58], with high expression levels being associated with either differentiation or proliferation while low

TABLE 1: Methylation levels of melanoma susceptibility genes in peripheral blood of melanoma patients and association with clinical characteristics.

Clinical characteristics of patients		BAP1		CDK4		CDKN2A		MC1R		MGMT	
	N	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)
<i>Melanomas number</i>											
1	18	0.04 (7e-3)	0.59 (0.01)	0.25 (7e-3)	0.32 (0.06)	7.4e-2 (0.01)	0.36 (0.01)	0.36 (0.01)	0.45 (8e-3)	0.87 (0.02)	
>1	21	0.03 (6e-3)	0.59 (0.01)	0.25 (8.4e-3)	0.33 (0.04)	7.6e-2 (0.01)	0.36 (0.01)	0.36 (0.01)	0.45 (9e-3)	0.88 (0.02)	
<i>P value</i>		<b>2e-4</b>	0.60	0.16	0.97	0.62	0.42		0.85	0.11	
<i>Breslow thickness*</i>											
<1	24	0.04 (9.5e-3)	0.59 (0.02)	0.25 (8e-3)	0.33 (0.04)	0.08 (0.01)	0.36 (0.01)	0.36 (0.01)	0.45 (8e-3)	0.87 (0.02)	
≥1	13	4.5e-3 (6.7e-3)	0.59 (0.01)	0.25 (7e-3)	0.33 (0.03)	0.07 (0.01)	0.36 (0.01)	0.36 (0.01)	0.45 (9e-3)	0.87 (0.01)	
<i>P value</i>		0.84	0.36	0.69	0.69	0.36	0.45	0.19	0.19	0.45	
<i>Methylation levels (Promoter mean (SD) / Body mean (SD))</i>											
		MITF (NM_000248 and NM_198158)		MITF (NM_006722)		MITF (NM_198159)		MITF (NM_198177)			
<i>Clinical characteristics of patients</i>											
	N	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)
<i>Number of melanomas</i>											
1	18	0.93 (0.03)	0.94 (0.02)	0.78 (0.03)	0.87 (0.02)	0.08 (0.03)	0.73 (0.01)	0.73 (0.01)	0.79 (0.03)	0.91 (0.02)	
>1	21	0.95 (0.02)	0.95 (0.02)	0.80 (0.03)	0.88 (0.01)	0.08 (0.03)	0.73 (0.01)	0.73 (0.01)	0.80 (0.02)	0.92 (0.01)	
<i>P value</i>		<b>0.01</b>	0.83	<b>0.02</b>	0.10	1.00	5.4e-2		<b>0.02</b>	0.20	
<i>Breslow thickness*</i>											
<1	24	0.95 (0.03)	0.95 (0.02)	0.80 (0.03)	0.88 (0.02)	0.08 (0.02)	0.73 (0.01)	0.73 (0.01)	0.80 (0.03)	0.91 (0.02)	
≥1	13	0.95 (0.02)	0.94 (0.02)	0.79 (0.03)	0.87 (0.01)	0.08 (0.03)	0.73 (0.01)	0.73 (0.01)	0.79 (0.02)	0.91 (0.01)	
<i>P value</i>		0.99	0.19	0.42	0.44	0.94	0.44	0.54	0.54	0.51	
<i>Methylation levels (Promoter mean (SD) / Body mean (SD))</i>											
		MITF (NM_198178)		PALB2		POT1 (NM_001042594)		POT1 (NM_015450)			
<i>Clinical characteristics of patients</i>											
	N	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)
<i>Number of melanomas</i>											
1	18	0.94 (0.02)	0.92 (0.02)	0.24 (9e-3)	0.06 (0.01)	0.95 (0.01)	0.23 (0.01)	0.23 (0.01)	0.17 (0.01)	0.95 (0.02)	
>1	21	0.93 (0.02)	0.93 (0.01)	0.23 (9e-3)	0.07 (0.01)	0.96 (0.02)	0.23 (0.01)	0.23 (0.01)	0.16 (0.01)	0.96 (0.01)	
<i>P value</i>		0.68	0.09	<b>0.01</b>	0.47	0.18	0.68		0.54	0.10	
<i>Breslow thickness*</i>											
<1	24	0.94 (0.02)	0.92 (0.02)	0.24 (9e-3)	0.07 (0.01)	0.95 (0.02)	0.23 (0.01)	0.23 (0.01)	0.16 (0.01)	0.96 (0.01)	
≥1	13	0.92 (0.03)	0.92 (0.01)	0.23 (9e-3)	0.06 (0.01)	0.96 (0.01)	0.24 (0.01)	0.24 (0.01)	0.17 (0.01)	0.96 (0.01)	
<i>P value</i>		0.26	0.76	0.81	0.26	0.58	0.06	<b>0.04</b>	<b>0.04</b>	0.76	
<i>Methylation levels (Promoter mean (SD) / Body mean (SD))</i>											
		POT1 (NR_003102, NR_003103 and NR_003104)		TERT		TNFRSF10C		TNF			
<i>Clinical characteristics of patients</i>											
	N	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)	Promoter mean (SD)	Body mean (SD)
<i>Melanomas number</i>											
1	18	0.17 (0.01)	0.50 (0.01)	0.58 (0.039)	0.86 (0.02)	0.38 (0.01)	0.12 (0.02)	0.21 (0.03)	0.67 (0.05)		
>1	21	0.17 (0.01)	0.50 (0.02)	0.58 (0.043)	0.86 (0.01)	0.38 (0.01)	0.11 (0.02)	0.22 (0.03)	0.69 (0.07)		
<i>P value</i>		0.75	0.72	0.75	0.13	0.15	0.94	0.32	0.33		
<i>Breslow thickness*</i>											
<1	24	0.16 (0.01)	0.50 (0.02)	0.58 (0.046)	0.86 (0.02)	0.38 (0.01)	0.11 (0.02)	0.22 (0.03)	0.69 (0.07)		
≥1	13	0.17 (0.01)	0.51 (0.01)	0.58 (0.028)	0.86 (0.01)	0.38 (0.01)	0.12 (0.02)	0.21 (0.03)	0.66 (0.05)		
<i>P value</i>		0.07	0.12	0.54	0.35	0.79	0.54	0.74	0.35		

N: number of samples; promoter: probes mapped at TSS1500, TSS200, 5'UTR, or 1st exon; mean of DNA methylation levels; SD: standard deviation; \* Breslow thickness of high melanoma stages; values highlighted in bold are statistically significant ( $P < 0.05$ , Mann-Whitney test).

TABLE 2: Methylation levels of melanoma susceptibility genes in primary melanomas and melanocyte primary cultures from healthy donors.

Gene name	Chromosome	UCSC accession (transcripts)	Genic region	CpG loci number	Melanomas (SD)	Melanocytes (SD)	<i>P</i> value
<i>BAP1</i>	3	NM_004656	Body	5	0.52 (0.44)	0.44 (0.46)	1.00
		NM_004656	Promoter	10	0.04 (0.01)	0.05 (0.02)	0.16
<i>CDK4</i>	12	NM_000075	Body	2	0.18 (0.09)	0.06 (0.02)	—
		NM_000075	Promoter	13	0.22 (0.30)	0.22 (0.30)	0.54
<i>CDKN2A</i>	9	NM_058195	Promoter	4	0.12 (0.03)	0.08 (0.05)	0.20
<i>KIT</i>	4	NM_000222, NM_001093772	Body	9	0.50 (0.30)	0.17 (0.28)	<b>0.01</b>
			Promoter	5	0.32 (0.24)	0.08 (0.08)	<b>0.03</b>
<i>MC1R</i>	16	NM_002386	Promoter	9	0.27 (0.32)	0.07 (0.05)	0.67
<i>MGMT</i>	10	NM_002412	Promoter	14	0.42 (0.35)	0.44 (0.42)	0.99
		NM_002412	Body	99	0.74 (0.15)	0.83 (0.20)	<b>&lt;1e - 4</b>
<i>MITF</i>	3	NM_000248	Promoter	3	0.53 (0.09)	0.06 (0.05)	0.1
		NM_000248	Body	5	0.79 (0.20)	0.57 (0.45)	0.42
		NM_006722	Promoter	4	0.79 (0.10)	0.80 (0.16)	0.89
		NM_006722	Body	20	0.78 (0.17)	0.64 (0.38)	0.78
		NM_198158	Promoter	3	0.53 (0.09)	0.06 (0.05)	0.10
		NM_198158	Body	5	0.79 (0.20)	0.57 (0.45)	0.42
		NM_198159	Promoter	5	0.04 (8.4e - 3)	0.04 (1.1e - 3)	0.55
		NM_198159	Body	29	0.67 (0.29)	0.56 (0.39)	0.77
		NM_198177	Promoter	4	0.77 (0.16)	0.59 (0.29)	0.20
		NM_198177	Body	14	0.77 (0.19)	0.61 (0.42)	0.84
<i>PALB2</i>	16	NM_024675	Body	5	0.22 (0.40)	0.22 (0.39)	0.84
		NM_024675	Promoter	12	0.07 (0.08)	0.08 (0.09)	0.37
<i>POT1</i>	7	NM_001042594	Body	1	0.95 (0.04)	0.94 (0.01)	—
		NM_001042594	Promoter	10	0.12 (0.23)	0.14 (0.26)	0.31
		NM_015450	Body	1	0.95 (0.04)	0.94 (0.01)	—
		NM_015450	Promoter	10	0.12 (0.23)	0.14 (0.26)	0.31
		NR_003102, NR_003103, NR_003104	Body	3	0.33 (0.53)	0.33 (0.52)	0.70
<i>TERT</i>	5	NR_003102, NR_003103, NR_003104	Promoter	7	0.16 (0.27)	0.19 (0.30)	0.71
<i>TERT</i>	5	NM_198255, NM_198253	Body	61	0.67 (0.13)	0.71 (0.19)	<b>0.03</b>
		NM_198253, NM_198255	Promoter	6	0.52 (0.24)	0.38 (0.24)	0.49
<i>TNFRSF10C</i>	8	NM_003841	Promoter	13	0.54 (0.17)	0.47 (0.32)	0.64
		NM_003841	Body	3	0.47 (0.13)	0.34 (0.38)	0.70
<i>TNF</i>	6	NM_000594	Body	5	0.76 (0.06)	0.89 (0.07)	<b>0.01</b>
		NM_000594	Promoter	13	0.54 (0.17)	0.47 (0.32)	0.64

SD: standard deviation; promoter: probes mapped at TSS1500, TSS200, 5' UTR, or 1st exon; values highlighted in bold are statistically significant ( $P < 0.05$ , Mann-Whitney test).

expression is related to an invasive potential [59]. This dual role of *MITF* according to its expression level could be involved in the different patterns of methylation observed in peripheral blood and tumors, suggesting that (a) high methylation levels at *MITF* promoter in leukocytes could be linked to a more aggressive disease and (b) higher methylation level at *MITF* gene body of primary tumors compared to metastasis would have a controlling role in cell cycle. Lauss and colleagues [60] have recently shown

that *MITF* expression in melanomas is controlled by DNA methylation, but unfortunately RNA was unavailable to investigate whether the low DNA methylation changes here detected would impact *MITF* expression.

We also detected DNA methylation differences between acral and nonacral melanoma subtypes at *MGMT* and *TERT* bodies. Acral melanoma is an uncommon subtype not associated with sunburn and occurs more frequently in older and non-Caucasian individuals [61]. Additionally, acral driver

mutations are distinct compared to cutaneous melanomas. For instance, *KIT* mutations are more common in acral than in the other melanomas [62, 63]. We did not observe significant difference in *KIT* methylation levels between acral and nonacral subtypes, but melanomas as a group were hypermethylated compared to melanocytes. The detection of *KIT* hypermethylation in the advanced tumors of this study (mostly stage III melanomas) was not unexpected and had already been described [25, 64].

The *CDKN2A* methylation level was analyzed by the use of microarray (HM450K) and pyrosequencing. This gene encodes p16 and p14 proteins, the p16 isoform harboring the majority of the germline mutations that confer a high melanoma risk [65]. Since the array platform contains *CDKN2A* CpGs not specifically associated with p16, we investigated additional *CDKN2A* promoter CpGs by pyrosequencing. The melanoma patients exhibited low methylation levels for *CDKN2A*, similar to the pattern already reported for healthy individuals [23]. Our data in this Brazilian cohort of patients are in accordance with previous studies that described absence of *CDKN2A* epimutation in hereditary melanoma patients [20, 21].

## 5. Conclusion

Here we investigated the potential role of twelve melanoma-associated genes as predisposition factors and epigenetic biomarkers for melanoma, using both peripheral blood and tumor samples. We did not find germline *CDKN2A* hypermethylation in our cohort of Brazilian melanoma patients. However, we detected low-level albeit significant DNA methylation differences in a gene subset both in leukocytes and in tumors (*BAP1*, *KIT*, *MGMT*, *MITF*, *PALB2*, *POT1*, *TERT*, and *TNF*). Additional studies in a large melanoma cohort are necessary to validate these candidate genes as epigenetic biomarkers in melanoma.

## Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the A.C. Camargo Cancer Center Biobank for providing patient samples. This work was supported by grants from FAPESP (2012/13963-9, 2013/10785-5, and 2013/07480-8) and CNPq (470446.2013-7).

## References

- [1] J. A. Usher-Smith, J. Emery, A. P. Kassianos, and F. M. Walter, "Risk prediction models for melanoma: a systematic review," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 23, no. 8, pp. 1450–1463, 2014.
- [2] U. Leiter, T. Eigentler, and C. Garbe, "Epidemiology of skin cancer," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 810, pp. 120–140, 2014.
- [3] R. F. Kefford, J. A. N. Bishop, W. Bergman, and M. A. Tucker, "Counseling and DNA testing for individuals perceived to be genetically predisposed to melanoma: a consensus statement of the melanoma genetics consortium," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 17, no. 10, pp. 3245–3251, 1999.
- [4] L. A. Cannon-Albright, D. E. Goldgar, L. J. Meyer et al., "Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22," *Science*, vol. 258, no. 5085, pp. 1148–1152, 1992.
- [5] A. Kamb, D. Shattuck-Eidens, R. Eeles et al., "Analysis of the p16 gene (*CDKN2*) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus," *Nature Genetics*, vol. 8, no. 1, pp. 22–26, 1994.
- [6] D. E. Quelle, F. Zindy, R. A. Ashmun, and C. J. Sherr, "Alternative reading frames of the *INK4a* tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest," *Cell*, vol. 83, no. 6, pp. 993–1000, 1995.
- [7] L. Zuo, J. Weger, Q. Yang et al., "Germline mutations in the p16<sup>INK4a</sup> binding domain of CDK4 in familial melanoma," *Nature Genetics*, vol. 12, no. 1, pp. 97–99, 1996.
- [8] S. Yokoyama, S. L. Woods, G. M. Boyle et al., "A novel recurrent mutation in *MITF* predisposes to familial and sporadic melanoma," *Nature*, vol. 480, no. 7375, pp. 99–103, 2011.
- [9] C.-N. J. Njauw, I. Kim, A. Piris et al., "Germline *BAP1* inactivation is preferentially associated with metastatic ocular melanoma and cutaneous-ocular melanoma families," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 4, Article ID e35295, 2012.
- [10] S. Horn, A. Figl, P. S. Rachakonda et al., "TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma," *Science*, vol. 339, no. 6122, pp. 959–961, 2013.
- [11] C. D. Robles-Espinoza, M. Harland, A. J. Ramsay et al., "*POT1* loss-of-function variants predispose to familial melanoma," *Nature Genetics*, vol. 46, no. 5, pp. 478–481, 2014.
- [12] F. Appelqvist, M. Yhr, A. Erlandson, T. Martinsson, and C. Enerbäck, "Deletion of the *MGMT* gene in familial melanoma," *Genes, Chromosomes & Cancer*, vol. 53, no. 8, pp. 703–711, 2014.
- [13] J. S. Palmer, D. L. Duffy, N. F. Box et al., "Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype?" *American Journal of Human Genetics*, vol. 66, no. 1, pp. 176–186, 2000.
- [14] A. Marzuka-Alcalá, M. J. Gabree, and H. Tsao, "Melanoma susceptibility genes and risk assessment," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1102, pp. 381–393, 2014.
- [15] L. G. Aoude, M. Xu, Z. Z. Zhao et al., "Assessment of *PALB2* as a candidate melanoma susceptibility gene," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 6, 2014.
- [16] I. Gazzoli, M. Loda, J. Garber, S. Syngal, and R. D. Kolodner, "A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the *MLH1* gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor," *Cancer Research*, vol. 62, no. 14, pp. 3925–3928, 2002.
- [17] R. Venkatachalam, M. J. L. Ligtenberg, N. Hoogerbrugge et al., "Germline epigenetic silencing of the tumor suppressor gene *PTPRJ* in early-onset familial colorectal cancer," *Gastroenterology*, vol. 139, no. 6, pp. 2221–2224, 2010.
- [18] H. Pinheiro, R. Bordeira-Carriço, S. Seixas et al., "Allele-specific *CDH1* downregulation and hereditary diffuse gastric cancer," *Human Molecular Genetics*, vol. 19, no. 5, pp. 943–952, 2010.
- [19] E. M. Wong, M. C. Southey, S. B. Fox et al., "Constitutional methylation of the *BRCA1* promoter is specifically associated with *BRCA1* mutation-associated pathology in early-onset



- breast cancer," *Cancer Prevention Research*, vol. 4, no. 1, pp. 23–33, 2011.
- [20] A. Erlandson, F. Appelqvist, and C. Enerbäck, "Epigenetic mutations in CDKN2A in western Swedish families with hereditary malignant melanoma," *Molecular Medicine Reports*, vol. 1, no. 1, pp. 89–91, 2008.
- [21] R. van Doorn, W. H. Zoutman, and N. A. Gruis, "Absence of germline epimutation of the CDKN2A gene in familial melanoma," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 129, no. 3, pp. 781–784, 2009.
- [22] L. Pergoli, C. Favero, R. M. Pfeiffer et al., "Blood DNA methylation, nevi number, and the risk of melanoma," *Melanoma Research*, vol. 24, no. 5, pp. 480–487, 2014.
- [23] P. L. Hyland, L. S. Burke, R. M. Pfeiffer et al., "Constitutional promoter methylation and risk of familial melanoma," *Epigenetics*, vol. 9, no. 5, pp. 685–692, 2014.
- [24] S. Ecsedi, H. Hernandez-Vargas, S. C. Lima et al., "DNA methylation characteristics of primary melanomas with distinct biological behaviour," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 5, Article ID e96612, 2014.
- [25] C. Dahl, C. Abildgaard, R. Riber-Hansen, T. Steiniche, J. Lade-Keller, and P. Guldberg, "KIT is a frequent target for epigenetic silencing in cutaneous melanoma," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 135, no. 2, pp. 516–524, 2014.
- [26] Y. Isabel Zhu and J. E. Fitzpatrick, "Expression of c-kit (CD117) in Spitz nevus and malignant melanoma," *Journal of Cutaneous Pathology*, vol. 33, no. 1, pp. 33–37, 2006.
- [27] A. L. R. de Ávila, A. C. V. Krepischi, L. F. Moredo et al., "Germline CDKN2A mutations in Brazilian patients of hereditary cutaneous melanoma," *Familial Cancer*, vol. 13, no. 4, pp. 645–649, 2014.
- [28] A. H. J. F. M. Campos, A. A. Silva, L. D. D. C. Mota et al., "The value of a tumor bank in the development of cancer research in Brazil: 13 years of experience at the A C Camargo Hospital," *Biopreservation and Biobanking*, vol. 10, no. 2, pp. 168–173, 2012.
- [29] C. A. Brohem, R. R. Massaro, M. Tiago et al., "Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death," *Pigment Cell & Melanoma Research*, vol. 25, no. 3, pp. 354–369, 2012.
- [30] D. Wang, L. Yan, Q. Hu et al., "IMA: an R package for high-throughput analysis of Illumina's 450K Infinium methylation data," *Bioinformatics*, vol. 28, no. 5, pp. 729–730, 2012.
- [31] T. J. Morris, L. M. Butcher, A. Feber et al., "ChAMP: 450k chip analysis methylation pipeline," *Bioinformatics*, vol. 30, no. 3, pp. 428–430, 2014.
- [32] H. Heyn and M. Esteller, "DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges," *Nature reviews. Genetics*, vol. 13, no. 10, pp. 679–692, 2012.
- [33] L. Sigalotti, E. Fratta, E. Bidoli et al., "Methylation levels of the 'long interspersed nucleotide element-1' repetitive sequences predict survival of melanoma patients," *Journal of Translational Medicine*, vol. 9, article 78, 2011.
- [34] É. S. de Araújo, A. Y. Kashiwabara, M. I. Achatz et al., "LINE-1 hypermethylation in peripheral blood of cutaneous melanoma patients is associated with metastasis," *Melanoma Research*, vol. 25, no. 2, pp. 173–177, 2015.
- [35] A. Tanemura, A. M. Terando, M.-S. Sim et al., "CpG Island methylator phenotype predicts progression of malignant melanoma," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 5, pp. 1801–1807, 2009.
- [36] Y. You, L. Ma, M. You et al., "TSLC1 gene silencing in cutaneous melanoma," *Melanoma Research*, vol. 20, no. 3, pp. 179–183, 2010.
- [37] P. Schraml, A. von Teichman, D. Mihic-Probst et al., "Predictive value of the MGMT promoter methylation status in metastatic melanoma patients receiving first-line temozolomide plus bevacizumab in the trial SAKK 50/07," *Oncology Reports*, vol. 28, no. 2, pp. 654–658, 2012.
- [38] Y. Cheng, J. W. Kim, W. Liu et al., "Genetic and epigenetic inactivation of TNFRSF10C in human prostate cancer," *Prostate*, vol. 69, no. 3, pp. 327–335, 2009.
- [39] H. C. Pieper, B. O. Evert, O. Kaut, P. F. Riederer, A. Waha, and U. Wüllner, "Different methylation of the TNF-alpha promoter in cortex and substantia nigra: implications for selective neuronal vulnerability," *Neurobiology of Disease*, vol. 32, no. 3, pp. 521–527, 2008.
- [40] A. Potapova, A. M. Hoffman, A. K. Godwin, T. Al-Saleem, and P. Cairns, "Promoter hypermethylation of the PALB2 susceptibility gene in inherited and sporadic breast and ovarian cancer," *Cancer Research*, vol. 68, no. 4, pp. 998–1002, 2008.
- [41] R. Tuominen, R. Jewell, J. J. van den Oord et al., "MGMT promoter methylation is associated with temozolomide response and prolonged progression-free survival in disseminated cutaneous melanoma," *International Journal of Cancer*, 2014.
- [42] P. A. van der Veiden, J. A. W. Metzelaar-Blok, W. Bergman et al., "Promoter hypermethylation: a common cause of reduced p16INK4a expression in uveal melanoma," *Cancer Research*, vol. 61, no. 13, pp. 5303–5306, 2001.
- [43] H. Zhang, X. Weng, J. Ye, L. He, D. Zhou, and Y. Liu, "Promoter hypermethylation of TERT is associated with hepatocellular carcinoma in the Han Chinese population," *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, pp. 1–10, 2015.
- [44] L. E. Moore, R. M. Pfeiffer, C. Poscablo et al., "Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study," *The Lancet Oncology*, vol. 9, no. 4, pp. 359–366, 2008.
- [45] J. M. Flanagan, M. Munoz-Alegre, S. Henderson et al., "Gene-body hypermethylation of ATM in peripheral blood DNA of bilateral breast cancer patients," *Human Molecular Genetics*, vol. 18, no. 7, pp. 1332–1342, 2009.
- [46] A. E. Teschendorff, U. Menon, A. Gentry-Maharaj et al., "An epigenetic signature in peripheral blood predicts active ovarian cancer," *PLoS ONE*, vol. 4, no. 12, Article ID e8274, 2009.
- [47] K. S. Pedersen, W. R. Bamlet, A. L. Oberg et al., "Leukocyte DNA methylation signature differentiates pancreatic cancer patients from healthy controls," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 3, Article ID e18223, 2011.
- [48] C. E. Nestor, R. Ottaviano, D. Reinhardt et al., "Rapid reprogramming of epigenetic and transcriptional profiles in mammalian culture systems," *Genome Biology*, vol. 16, article 11, 2015.
- [49] T. Mikeska, C. Bock, H. Do, and A. Dobrovic, "DNA methylation biomarkers in cancer: progress towards clinical implementation," *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 12, no. 5, pp. 473–487, 2012.
- [50] M. Cankovic, M. N. Nikiforova, M. Snuderl et al., "The role of MGMT testing in clinical practice: a report of the association for molecular pathology," *The Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 15, no. 5, pp. 539–555, 2013.
- [51] A. Inno, G. Fanetti, M. Di Bartolomeo et al., "Role of MGMT as biomarker in colorectal cancer," *World Journal of Clinical Cases*, vol. 2, no. 12, pp. 835–839, 2014.

- [52] A. Marini, A. Mirmohammadsadegh, S. Nambiar, A. Gustrau, T. Ruzicka, and U. R. Hengge, "Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 126, no. 2, pp. 422–431, 2006.
- [53] M. Rastetter, U. Schagdarsurengin, C. Lahtz et al., "Frequent intra-tumoural heterogeneity of promoter hypermethylation in malignant melanoma," *Histology and histopathology*, vol. 22, no. 9, pp. 1005–1015, 2007.
- [54] M. Kulis, A. C. Queirós, R. Beekman, and J. I. Martín-Subero, "Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1829, no. 11, pp. 1161–1174, 2013.
- [55] D. Jjingo, A. B. Conley, S. V. Yi, V. V. Lunyak, and I. King Jordan, "On the presence and role of human gene-body DNA methylation," *Oncotarget*, vol. 3, no. 4, pp. 462–474, 2012.
- [56] Y. Cheli, M. Ohanna, R. Ballotti, and C. Bertolotto, "Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes," *Pigment Cell and Melanoma Research*, vol. 23, no. 1, pp. 27–40, 2010.
- [57] M. H. Law, S. MacGregor, and N. K. Hayward, "Melanoma genetics: recent findings take us beyond well-traveled pathways," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 132, no. 7, pp. 1763–1774, 2012.
- [58] M. Ennen, C. Keime, D. Kobi et al., "Single-cell gene expression signatures reveal melanoma cell heterogeneity," *Oncogene*, 2014.
- [59] M. L. Hartman and M. Czyz, "MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 72, no. 7, pp. 1249–1260, 2015.
- [60] M. Lauss, R. Haq, H. Cirenajwis et al., "Genome-wide DNA methylation analysis in melanoma reveals the importance of CpG methylation in MITF regulation," *Journal of Investigative Dermatology*, 2015.
- [61] J. Stubblefield and B. Kelly, "Melanoma in non-caucasian populations," *Surgical Clinics of North America*, vol. 94, pp. 1115–1126, 2014.
- [62] S. J. Furney, S. Turajlic, G. Stamp et al., "The mutational burden of acral melanoma revealed by whole-genome sequencing and comparative analysis," *Pigment Cell & Melanoma Research*, vol. 27, no. 5, pp. 835–838, 2014.
- [63] C. Beadling, E. Jacobson-Dunlop, F. S. Hodi et al., "KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 21, pp. 6821–6828, 2008.
- [64] J. A. Curtin, K. Busam, D. Pinkel, and B. C. Bastian, "Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 24, no. 26, pp. 4340–4346, 2006.
- [65] H. Tsao, L. Chin, L. A. Garraway, and D. E. Fisher, "Melanoma: from mutations to medicine," *Genes & Development*, vol. 26, no. 11, pp. 1131–1155, 2012.

# ***LINE-1* hypermethylation in peripheral blood of cutaneous melanoma patients is associated with metastasis**

Érica S.S. De Araújo<sup>a</sup>, André Y. Kashiwabara<sup>e</sup>, Maria I.W. Achatz<sup>a,b</sup>,  
Luciana F. Moredo<sup>c</sup>, Bianca C.S. De Sá<sup>c</sup>, João P. Duprat<sup>c</sup>, Carla Rosenberg<sup>d</sup>,  
Dirce M. Carraro<sup>a</sup> and Ana C.V. Krepschi<sup>a,d</sup>

Aberrant DNA methylation pattern is a well-known epigenetic marker of cancer cells. Recently, aberrant methylation was also reported in the peripheral blood of cancer patients and it could potentially serve as a biomarker for cancer risk. We investigated the methylation pattern of *LINE-1* and other repetitive DNA elements in peripheral blood of cutaneous melanoma patients in order to search for an association with clinical characteristics. The patient cohort was composed by 69 unrelated melanoma patients, 28 of whom were hereditary cases (with or without *CDKN2A* mutations) and 41 were isolated (sporadic) melanoma cases. Methylation of *LINE-1* was evaluated by pyrosequencing, whereas additional repetitive DNA sequences were assessed using Illumina 450K methylation microarray. Melanoma patients exhibited a higher, albeit heterogeneous, *LINE-1* methylation level compared with controls. Hereditary melanoma patients carrying *CDKN2A* mutations showed a hypermethylated pattern of both *LINE-1* and repetitive DNA elements compared with other patients. In particular, the methylation level at one specific

CpG of *LINE-1* was found to be correlated with the occurrence of metastasis. Our data suggest that *LINE-1* hypermethylation in peripheral blood of melanoma patients is a potential epigenetic biomarker for metastasis occurrence. *Melanoma Res* 25:173–177 Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

*Melanoma Research* 2015, 25:173–177

**Keywords:** biomarkers, DNA methylation, leukocytes, *LINE-1* elements, melanoma, metastasis, repetitive sequences

<sup>a</sup>International Research Center, <sup>b</sup>Department of Oncogenetics, <sup>c</sup>Skin Cancer Department, A. C. Camargo Cancer Center, <sup>d</sup>Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo and <sup>e</sup>Federal Technological University of Paraná, Paraná, Brazil

Correspondence to Ana C. V. Krepschi, PhD, Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences – University of São Paulo, Rua do Matão, 277 CEP: 05508090, São Paulo, Brazil  
Tel: +55 11 2648 8258; fax: +55 11 31917573;  
e-mail: ana.krepischi@ib.usp.br

Received 30 June 2014 Accepted 17 December 2014

## **Introduction**

Methylation of cytosines in CpG dinucleotides is a covalent modification associated with transcriptional repression [1]. This epigenetic mark regulates several normal biological processes, such as cellular differentiation [2], and is also implicated in diseases, including cancer [3].

The transposable element *LINE-1* has been used as a surrogate marker for global methylation in several cancer studies [4,5]. The pattern of *LINE-1* methylation in peripheral blood has been associated with cancer risk and differs among different cancer types; whereas hypomethylation has been reported for hepatocellular carcinoma [6] and gastric [7] and bladder cancer [8], hypermethylation has been described for renal [9] and colorectal cancer [10]. Recently, a study was performed in leukocytes of melanoma patients, which did not detect differences in *LINE-1* methylation between patients and controls [11].

We analyzed the methylation patterns of *LINE-1* and other repetitive DNA elements as potential biomarkers for cutaneous melanoma in a cohort of Brazilian patients classified according to clinical characteristics.

## **Patients and methods**

### **Patients and control groups**

This retrospective study was performed at the A. C. Camargo Cancer Center (São Paulo, Brazil) after obtaining approval from the Internal Ethics Committee Board. Melanoma patients were referred to the Skin Cancer Department of the A. C. Camargo Cancer Center, which surveyed sex, age at blood draw, number of melanomas, Breslow thickness of melanoma high stage, and metastasis occurrence. Family history of cancer was assessed in the Oncogenetics Department, and genetic counseling was provided to all participants.

The study was based on blood samples from 69 unrelated cutaneous melanoma patients who had undergone no previous chemotherapy, who were classified in three groups: familial melanoma patients who were carriers of pathogenic *CDKN2A* mutations ( $n = 8$ ), familial melanoma patients with *CDKN2A*-wild type ( $n = 20$ ), and sporadic melanoma patients ( $n = 41$ ). The familial melanoma patients who were

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 3.0 License, where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially.

negative for *CDKN2A* mutations fulfilled at least one of the following criteria: they had at least three primary melanomas ( $n=8$ ); they had at least two primary melanomas, one of which was before 35 years of age ( $n=3$ ); and they had a family history in three or more relatives of two consecutive generations, one of whom was under 50 years of age ( $n=9$ ). The control group was composed of 51 individuals without cancer history, who were matched for age (range for each 10 years) and sex with the melanoma patients.

DNA samples extracted from peripheral blood were retrieved from the A. C. Camargo Cancer Center Biobank.

### Pyrosequencing and HM450K genome-wide methylation analysis

Bisulfite modification was performed on 500 ng of DNA using the EZ DNA methylation kit (Zymo Research, Irvine, California, USA). Quantitative bisulfite pyrosequencing for *LINE-1* was performed in DNA blood samples from 69 melanoma patients and 51 controls using PyroMark Q96-CpG LINE-1 (Qiagen, Hilden, Germany), which analyzed four CpGs sites (position 305 to 331 – GenBank accession X58075). The methylation level was obtained using PyroMark Q96-CpG Software (Qiagen), which provides the percentage of methylated cytosines relative to the sum of methylated and unmethylated cytosines. All experiments were performed twice and samples with a variation coefficient greater than 10% were excluded.

The methylation profile of several repetitive DNA elements was performed in a subset of 39 melanoma patients (eight familial melanoma with *CDKN2A* mutations, 19 familial melanoma *CDKN2A*-wild type, and 12 sporadic cases) and 12 controls using Infinium HumanMethylation 450K BeadChips (Illumina, San Diego, California, USA), according to the manufacturer's instructions. The Bioconductor IMA package was applied for quality control of array methylation data. We removed from further analyses probes that (a) lacked  $\beta$ -values, (b) contained single-nucleotide polymorphisms, (c) mapped at sexual chromosomes, or (d) had detection  $P$ -values greater than  $1e-05$ . Normalization and probe type bias adjustment were achieved by beta mixture quantile dilation using the ChAMP package (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/ChAMP.html>). Information regarding HM450K probes mapped within repetitive sequences was obtained from the data set GSE42409 (available at the Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), and only probes with total overlap (50 mers) were retrieved.

We evaluated the influence of both sex and age on the methylation levels of *LINE-1* using Fisher's test. DNA methylation differences between groups were tested for significance using either the Mann–Whitney test or the Kruskal–Wallis with Dunn's multiple comparison post-test. After considering *LINE-1* as a continuous variable,

we also categorized the *LINE-1* methylation level based on the median of the methylation values of the control group: hypomethylated when patients exhibited *LINE-1* level lower than that of controls and hypermethylated when patients had *LINE-1* level at least the same level as controls; differences were tested for significance using Fisher's test. All statistical analyses were performed using the GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, USA) statistics software package.

## Results

Quantitative bisulfite pyrosequencing for evaluation of the methylation pattern of four *LINE-1* CpGs was performed for 69 patients and 51 control individuals. After exclusion of samples with variation coefficient above 10% between replicates, data from 48 melanoma patients and 42 controls were recovered. Considering all CpGs, neither controls nor melanoma patients exhibited significant differences in *LINE-1* methylation level according to sex (controls  $P=0.06$ ; patients  $P=0.17$ ) or age at blood draw ( $<40$  or  $\geq 40$  years; controls  $P=0.99$ ; patients  $P=0.17$ ). These two characteristics were not associated with *LINE-1* methylation level in either controls or melanoma patients (sex  $P=1$ ; age at blood draw  $P=0.38$ ). Therefore, statistical adjustments for these factors were not performed.

Table 1 presents the methylation data for the entire *LINE-1* sequence (average of the four investigated CpGs) and each CpG position, comparing melanoma patients with controls, and groups of patients with different clinical characteristics with each other. The  $P$ -values in Table 1 refer to the statistical analysis of the means of the methylation levels of compared categories. Methylation levels were slightly heterogeneous between controls and melanoma patients across the four analyzed CpGs (Fig. 1a), and the CpG position 1 showed a statistically significantly higher methylation level compared with the other CpG positions in both groups (controls  $P<0.01$ , patients  $P<0.01$ ). However, melanoma patients exhibited a significantly higher average *LINE-1* methylation level compared with controls, as well as at the CpG positions 2 and 4 (Fig. 1a; Table 1).

Methylation levels at CpG positions 2, 3, and 4 showed statistically significant differences among melanoma groups (Table 1): *CDKN2A* mutation carriers showed hypermethylation compared with both *CDKN2A*-wild-type melanoma patients (CpG positions 2 and 4) and sporadic melanoma patients (CpG position 4) (Fig. 1b).

Subsequently, patients and controls were categorized as hypomethylated or hypermethylated on the basis of the median *LINE-1* methylation levels of the control group (average *LINE-1* methylation = 76.26%; CpG position 1 methylation = 81.50%; CpG position 2 methylation = 74.20%; CpG position 3 methylation = 73.49%; CpG position 4 methylation = 75.59%). Considering the

**Table 1** *LINE-1* methylation levels of melanoma patients and association with clinical characteristics

	Overall <i>LINE-1</i> methylation		CpG position 1		CpG position 2		CpG position 3		CpG position 4	
	N (%)	Mean (SD)	N (%)	Mean (SD)	N (%)	Mean (SD)	N (%)	Mean (SD)	N (%)	Mean (SD)
<b>Study participants</b>										
Patients	48 (53.4)	77 (2.1)	47 (55.3)	81 (4.8)	47 (53.4)	76 (2.3)	47 (56.6)	74 (2.3)	46 (52.9)	78 (2.9)
Controls	42 (46.6)	76 (1.8)	38 (44.7)	82 (1.8)	41 (46.6)	77 (1.8)	36 (43.4)	75 (3.1)	41 (47.1)	76 (2.4)
<i>P</i> -value	<b>0.03</b>		0.77		<b>0.01</b>		0.11		< <b>0.01</b>	
<b>Melanoma groups</b>										
Sporadic	31 (64.6)	74 (1.9)	31 (65.9)	82 (4.4)	30 (63.8)	76 (1.9)	30 (63.8)	75 (3.1)	30 (65.2)	77 (2.7)
Hereditary <i>CDKN2A</i> -wild	13 (27.0)	74 (2.4)	12 (25.5)	81 (5.2)	13 (27.6)	74 (1.9)	13 (27.6)	73 (2.8)	12 (26.0)	77 (2.5)
Hereditary <i>CDKN2A</i> -mutated	4 (8.4)	78 (1.0)	4 (8.5)	77 (4.8)	4 (8.5)	79 (2.9)	4 (8.5)	77 (2.6)	4 (8.7)	82 (1.3)
<i>P</i> -value	0.09		0.10		< <b>0.01</b>		<b>0.05</b>		<b>0.01</b>	
<b>Clinical characteristics of patients</b>										
<b>Number of melanomas</b>										
1	34 (70.8)	77 (1.9)	34 (72.3)	82 (4.3)	34 (72.3)	76 (2.1)	34 (72.3)	75 (3.2)	33 (71.7)	78 (3.1)
> 1	14 (29.2)	77 (2.4)	13 (27.6)	80 (5.9)	13 (27.6)	76 (3.0)	13 (27.6)	74 (2.8)	13 (28.3)	78 (2.2)
<i>P</i> -value	0.79		0.20		0.74		0.37		0.71	
<b>Breslow thickness*</b>										
< 2 mm	35 (77.7)	77 (2.0)	34 (77.3)	81 (4.8)	34 (77.3)	76 (1.8)	34 (77.3)	75 (3.2)	33 (76.7)	78 (3.0)
≥ 2 mm	10 (22.3)	78 (2.1)	10 (22.7)	83 (4.9)	10 (22.7)	76 (3.7)	10 (22.7)	76 (2.1)	10 (23.2)	78 (2.7)
<i>P</i> -value	0.13		0.15		0.79		0.16		0.81	
<b>Metastasis</b>										
No	32 (72.7)	77 (2.1)	31 (72.1)	80 (5.0)	31 (72.1)	76 (2.4)	31 (72.1)	75 (3.0)	30 (71.4)	78 (2.8)
Yes	12 (27.3)	78 (2.2)	12 (27.9)	84 (3.8)	12 (27.9)	75 (2.6)	12 (27.9)	74 (3.3)	12 (28.6)	78 (2.2)
<i>P</i> -value	0.64		<b>0.02</b>		0.99		0.28		0.81	

%, percentage of group in relation to total; mean of methylation level; N, number of individuals.

\*Breslow thickness of high melanoma stage; the *P*-values refers to the difference in means between compared groups, the values highlighted in bold are statistically significant (*P* < 0.05).

average *LINE-1* methylation level, there was a significant association of methylation status with melanoma occurrence (*P* = 0.03), with a higher number of hypermethylated individuals in the melanoma group (72.9%); individual CpG positions did not show significant differences in this analysis.

To investigate the relevance of *LINE-1* methylation in peripheral blood as a potential biomarker for melanoma, we tested for significant differences in *LINE-1* methylation according to clinical characteristics (Table 1). In melanoma patients, there was a statistically significant association of CpG1 methylation level and metastasis occurrence. The status of *CDKN2A* (mutated or wild type) was not significantly associated with any of the analyzed clinical characteristics (number of melanomas *P* = 0.57; Breslow thickness *P* = 1.00; metastasis *P* = 0.56). However, the studied group was very small: among *CDKN2A* mutation carriers, only one patient showed Breslow thickness greater than 2 mm, two of them developed more than two melanomas, and metastases were not detected in this melanoma group.

Next, we investigated whether the methylation level of other repetitive DNA elements in addition to *LINE-1* could be associated with melanoma. The methylation levels of 22 436 CpG sites mapped within repetitive sequences (*LINE*, *SINE*, *LTR*, and others) were recovered from HM450K experiments of a subset of these patients (*n* = 39) and controls (*n* = 12). No significant differences were observed between melanoma patients and controls (Fig. 1c). However, there was a statistically significant difference among different melanoma

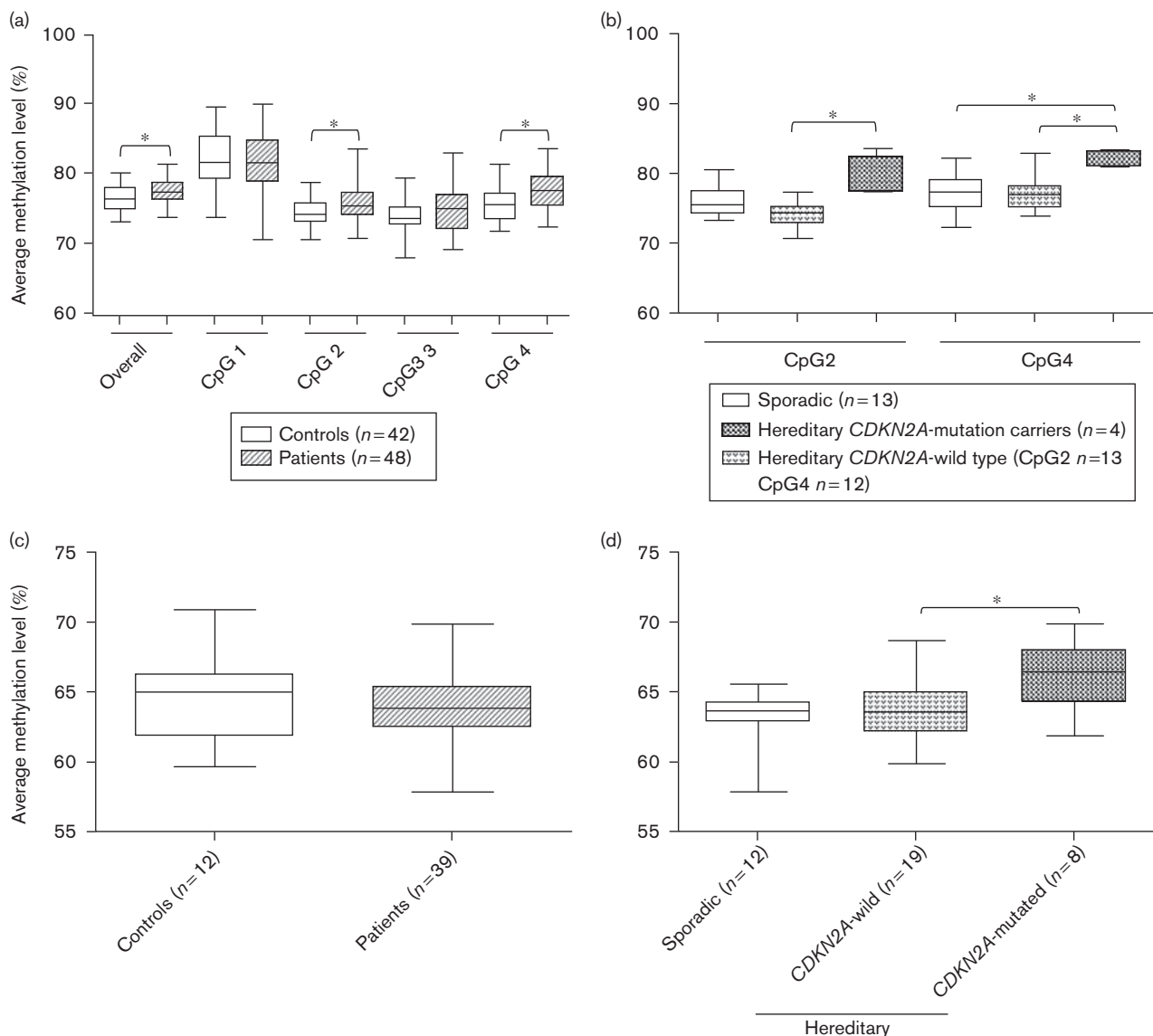
subgroups: patients carrying *CDKN2A* mutations showed hypermethylation at repetitive DNA elements compared with patients without *CDKN2A* mutations (Fig. 1d).

## Discussion

DNA hypomethylation in peripheral blood has been already suggested as a biomarker for cancer risk [12]. Genome-wide hypomethylation might induce activation of endogenous parasitic sequences, such as transposable elements, subsequent genomic instability, and oncogene expression [13,14]. Measurement of the methylation level of *LINE-1*, which represents 17% of the human genome, is an accurate method for evaluating the global DNA methylation pattern [15]. It is worth mentioning that two independent meta-analyses have confirmed that global hypomethylation in leukocytes could be used as a biomarker for cancer risk, although *LINE-1* in particular could not reflect this global methylation status [4,5]. The *LINE-1* methylation status associated with cancer risk appeared to vary between different cancer types, and both hypomethylation and hypermethylation were already reported [6–10]. Despite *LINE-1* being, or not being, a suitable indicator of global DNA methylation status, it may still be an independent biomarker for cancer.

We evaluated the possible correlation between changes in the pattern of DNA methylation in leukocytes of repetitive sequences, mainly *LINE-1*, and the presence of cutaneous melanoma. Our data suggest that *LINE-1* hypermethylation is associated with melanoma occurrence. In addition, a higher methylation level at one single *LINE-1* CpG was significantly associated with

Fig. 1



Methylation levels of *LINE-1* and repetitive DNA sequences in melanoma patients. (a, b) Methylation levels of four *LINE-1* CpGs (positions 331 to 305, GenBank accession X58075) obtained using quantitative bisulfite pyrosequencing. (c, d) Methylation levels of 22,436 CpGs mapped in repetitive DNA elements measured using the HM450K platform (Illumina). (a) Melanoma patients exhibited significantly higher overall and specific *LINE-1* methylations levels compared with controls (the Mann-Whitney test). (b) The methylation levels at *LINE-1* CpGs positions 2 and 4 were significantly different among the groups of melanoma patients (the Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison post-test). (c) Repetitive DNA elements did not show significant difference in methylation levels between melanoma patients and controls (the Mann-Whitney test). (d) Familial melanoma patients carrying *CDKN2A* mutations showed a hypermethylated pattern of repetitive DNA elements compared with melanoma patients without mutations (Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison post-test). \* $P < 0.05$ .

metastasis in melanoma patients. This could be partially explained by the relation between *LINE-1* hypermethylation and DNA double-stranded breaks [10]. Hyland *et al.* [11] investigated the same target *LINE-1* sequence in the only other methylation study in melanoma patients. In contrast to our findings, they did not find differences between melanoma patients and controls. This divergence can be because Hyland and colleagues studied a cohort composed of melanoma-prone families, whereas our melanoma group is heterogeneous with

respect to the etiology of melanoma development. In addition, Jaffe and Irizarry [16] demonstrated the importance of cell heterogeneity in the DNA methylation analysis of peripheral blood. Peripheral blood contains a mixture of lymphocyte types, and detected differences in DNA methylation levels can arise from differences in the relative proportion of lymphocyte populations. Therefore, differences in the blood cell composition could influence the contrasting findings, reinforcing the relevance of accounting for cellular

heterogeneity in clinical practice. Although some previous studies have reported differences in *LINE-1* methylation level according to sex [17] and age [18], they did not appear in our study.

Interestingly, melanoma patients carrying *CDKN2A* mutations exhibited higher methylation levels at *LINE-1* and repetitive DNA elements compared with those without *CDKN2A* mutations. Hyland and colleagues also analyzed melanoma patients with and without *CDKN2A* mutations, but they did not find methylation differences. *CDKN2A* is the most relevant known melanoma susceptibility gene, and mutations in this gene are more commonly detected in patients with a familial melanoma history [19] or with multiple primary melanomas [20]. In a preceding study, we investigated the genome-wide DNA methylation profile of *CDKN2A* mutation carriers, revealing in these melanoma patients few differentially methylated CpGs, which were mainly related to underlying single-nucleotide polymorphisms [21]. Thus, the hypermethylated pattern found in this group of *CDKN2A* mutation carriers appears to be restricted to repetitive sequences. Further studies using prospective large cohorts of melanoma patients are needed to substantiate our findings and elucidate whether *LINE-1* hypermethylation is a cause or a consequence of melanoma risk and metastasis occurrence.

### Acknowledgements

This work was supported by grants from FAPESP (2012/13963-9; 2013/07480-8).

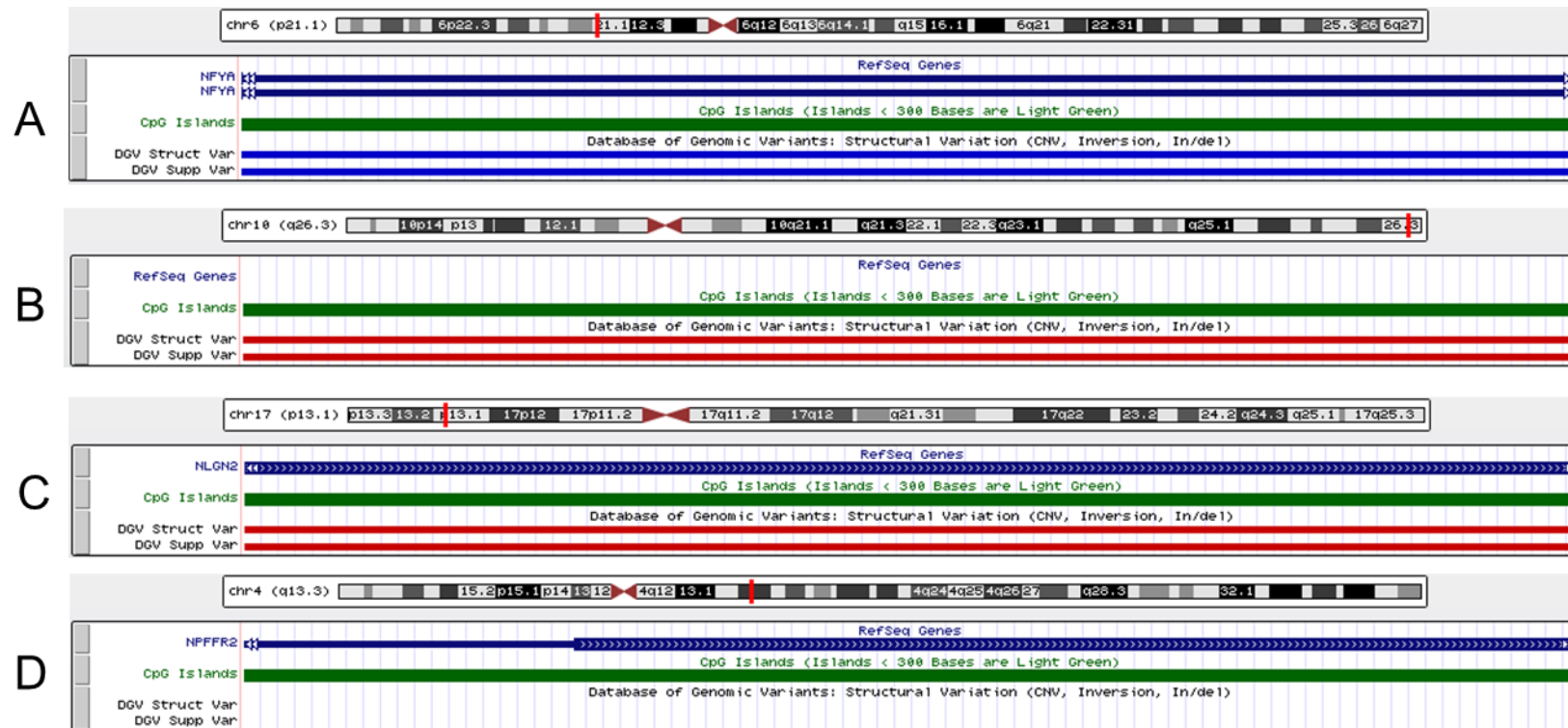
### Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

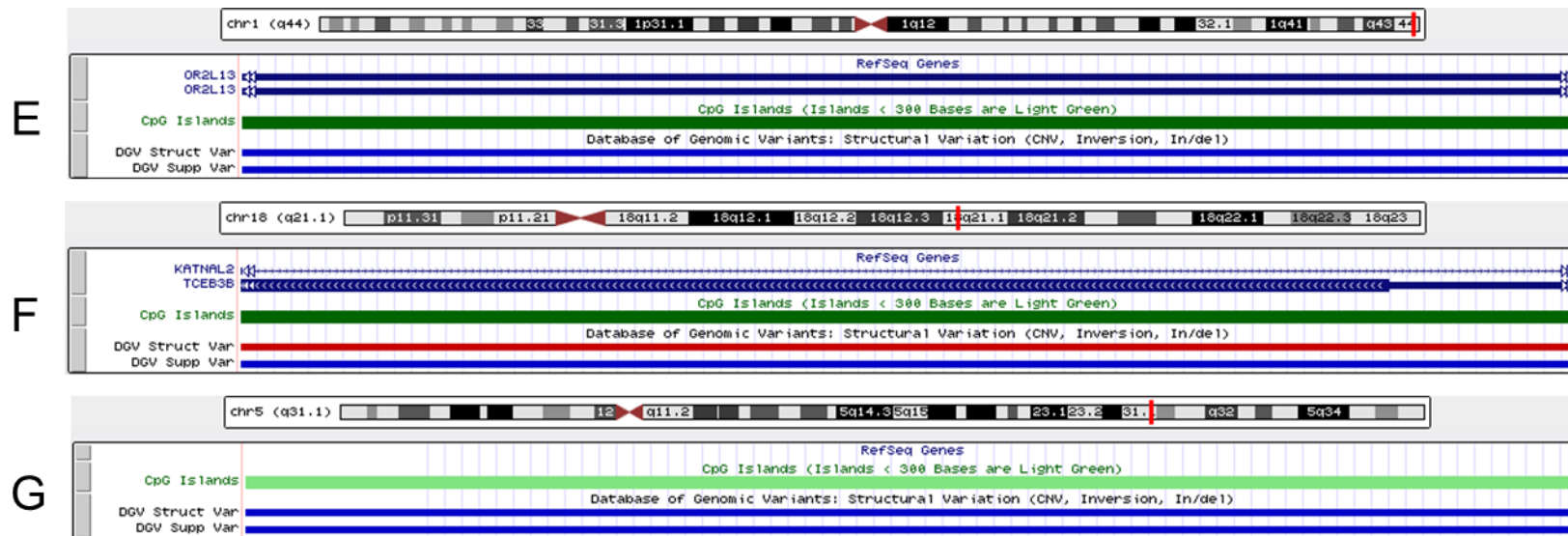
### References

- Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2005; **74**:481–514.
- Kar S, Parbin S, Deb M, Shilpi A, Sengupta D, Rath SK, *et al.* Epigenetic choreography of stem cells: the DNA demethylation episode of development. *Cell Mol Life Sci* 2014; **71**:1017–1032.
- Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 2010; **70**:27–56.
- Brennan K, Flanagan JM. Is there a link between genome-wide hypomethylation in blood and cancer risk? *Cancer Prev Res (Phila)* 2012; **5**:1345–1357.
- Woo HD, Kim J. Global DNA hypomethylation in peripheral blood leukocytes as a biomarker for cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One* 2012; **7**:e34615.
- Di JZ, Han XD, Gu WY, Wang Y, Zheng Q, Zhang P, *et al.* Association of hypomethylation of LINE-1 repetitive element in blood leukocyte DNA with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *J Zhejiang Univ Sci B* 2011; **12**:805–811.
- Hou L, Wang H, Sartori S, Gawron A, Lissowska J, Bollati V, *et al.* Blood leukocyte DNA hypomethylation and gastric cancer risk in a high-risk Polish population. *Int J Cancer* 2010; **127**:1866–1874.
- Cash HL, Tao L, Yuan JM, Marsit CJ, Houseman EA, Xiang YB, *et al.* LINE-1 hypomethylation is associated with bladder cancer risk among nonsmoking Chinese. *Int J Cancer* 2012; **130**:1151–1159.
- Liao LM, Brennan P, van Bommel DM, Zaridze D, Matveev V, Janout V, *et al.* LINE-1 methylation levels in leukocyte DNA and risk of renal cell cancer. *PLoS One* 2011; **6**:e27361.
- Walters RJ, Williamson EJ, English DR, Young JP, Rosty C, Clendenning M, *et al.* Association between hypermethylation of DNA repetitive elements in white blood cell DNA and early-onset colorectal cancer. *Epigenetics* 2013; **8**:748–755.
- Hyland PL, Burke LS, Pfeiffer RM, Mirabello L, Tucker MA, Goldstein AM, Yang XR. LINE-1 methylation in peripheral blood and the risk of melanoma in melanoma-prone families with and without CDKN2A mutations. *Melanoma Res* 2013; **23**:55–60.
- Friso S, Udali S, Guarini P, Pellegrini C, Pattini P, Moruzzi S, *et al.* Global DNA hypomethylation in peripheral blood mononuclear cells as a biomarker of cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013; **22**:348–355.
- Muñoz-Lopez M, Macia A, Garcia-Cañadas M, Badge RM, Garcia-Perez JL. An epigenetic battle: LINE-1 retrotransposons and intragenomic conflict in humans. *Mob Genet Elements* 2011; **1**:122–127.
- Sigalotti L, Fratta E, Parisi G, Coral S, Maio M. Epigenetic markers of prognosis in melanoma. *Methods Mol Biol* 2014; **1102**:481–499.
- Lisanti S, Omar WA, Tomaszewski B, De Prins S, Jacobs G, Koppen G, *et al.* Comparison of methods for quantification of global DNA methylation in human cells and tissues. *PLoS One* 2013; **8**:e79044.
- Jaffe AE, Irizarry RA. Accounting for cellular heterogeneity is critical in epigenome-wide association studies. *Genome Biol* 2014; **15**:R31.
- El-Maarri O, Walier M, Behne F, van Üin J, Singer H, Diaz-Lacava A, *et al.* Methylation at global LINE-1 repeats in human blood are affected by gender but not by age or natural hormone cycles. *PLoS One* 2011; **6**:e16252.
- Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, Zheng S, Wrensch MR, Wiemels JL, *et al.* Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genet* 2009; **5**:e1000602.
- Meyle KD, Guldberg P. Genetic risk factors for melanoma. *Hum Genet* 2009; **126**:499–510.
- Monzon J, Liu L, Brill H, Goldstein AM, Tucker MA, From L, *et al.* CDKN2A mutations in multiple primary melanomas. *N Engl J Med* 1998; **338**:879–887.
- De Araújo ES, Marchi FA, Rodrigues TC, Vieira HC, Kuasne H, Achatz MI, *et al.* Genome-wide DNA methylation profile of leukocytes from melanoma patients with and without CDKN2A mutations. *Exp Mol Pathol* 2014; **97**:425–432.

**Anexo 5:** Variação estrutural nos genes detectados com padrão aberrante de metilação em ilhas CpG mapeadas em regiões promotoras de pacientes de melanoma cutâneo.







São mostrados dados sobre a variação no número de cópias de seguimentos genômicos e ilha CpG na região promotora detectada com metilação aberrante dos genes **A**: *ADCY10P1* (chr6: 41068752-41068646), **B**: *DPYSL4* (chr10: 134000034-134000367), **C**: *NLGN2* (chr17: 7311868-7311742), **D**: *NPFRR2* (chr4: 72897565-72897782), **E**: *OR2L13* (chr1: 248100407-248100600), **F**: *TCEB3B* (chr18: 44561718-44561130), e **G**: *VTRNA2-1* (chr5: 135416412-135416405). Perda de cópias são representadas em vermelho, e ganho, em azul. Informação obtida no UCSC Genome Browser (hg19) usando dados do DVG (*Database of Genomic Variants*).

**Anexo 6:** Análise *in silico* da frequência de alterações genéticas em diferentes tipos tumorais utilizando listas aleatórias de genes.

Lista de genes <sup>#</sup>	Genes	Tumores relevantes*	Frequência de mutação em melanoma (%)
1	<i>NBL1</i> , <i>UQCRFS1</i> , <i>CUTA</i> , <i>KLK12</i> , <i>COX8C</i> , <i>MYBL1</i> e <i>FLOT1</i>	útero, mama, ovário, próstata e bexiga	17,6
2	<i>ATP1B2</i> , <i>CLDN23</i> , <i>HADHA</i> , <i>UPF3B</i> , <i>PCDHGA4</i> , <i>LMNA</i> e <i>RRAS</i>	mama, útero, bexiga, pulmão e próstata	16,2
3	<i>IGF2BP1</i> , <i>ATG101</i> , <i>RM12</i> , <i>FLVCR2</i> , <i>PTPN23</i> , <i>NKX6-2</i> e <i>KNNQ4</i>	mama, próstata, painel de diferentes tipos tumorais (NCI-60) e glândula salivar	14

Análise realizada utilizando dados de 91 estudos de câncer disponibilizados no cBioPortal. <sup>#</sup>Lista de genes construída aleatoriamente a partir da lista de genes com ilha CpG contemplados na plataforma HM450k (Illumina); \*Considerando os cinco primeiros tipos tumorais com maior frequência de alteração genética.



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental and Molecular Pathology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexmp](http://www.elsevier.com/locate/yexmp)

## Genome-wide DNA methylation profile of leukocytes from melanoma patients with and without *CDKN2A* mutations



Érica Sara Souza de Araújo<sup>a</sup>, Fabio Albuquerque Marchi<sup>a,b</sup>, Tatiane Cristina Rodrigues<sup>c</sup>, Henrique Cursino Vieira<sup>b</sup>, Hellen Kuasne<sup>a</sup>, Maria Isabel Waddington Achatz<sup>a,d</sup>, Luciana Facure Moredo<sup>e</sup>, Bianca Costa Soares de Sá<sup>e</sup>, João Pereira Duprat<sup>e</sup>, Helena Paula Brentani<sup>f</sup>, Carla Rosenberg<sup>c</sup>, Dirce Maria Carraro<sup>a</sup>, Ana Cristina Victorino Krepischi<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> International Center for Research, A. C. Camargo Cancer Center, Sao Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Institute of Mathematics and Statistics, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

<sup>d</sup> Department of Oncogenetics, A. C. Camargo Cancer Center, Sao Paulo, Brazil

<sup>e</sup> Department of Skin Cancer, A. C. Camargo Cancer Center, Sao Paulo, Brazil

<sup>f</sup> Department and Institute of Psychiatry, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 August 2014

Accepted 12 September 2014

Available online 16 September 2014

#### Keywords:

Melanoma

DNA methylation

Leukocytes

*CDKN2A*

melanoma epigenetics

### ABSTRACT

Melanoma is a highly aggressive cancer, accounting for up to 75% of skin cancer deaths. A small proportion of melanoma cases can be ascribed to the presence of highly penetrant germline mutations, and approximately 40% of hereditary melanoma cases are caused by *CDKN2A* mutations. The current study sought to investigate whether the presence of germline *CDKN2A* mutations or the occurrence of cutaneous melanoma would result in constitutive genome-wide DNA methylation changes. The leukocyte methylomes of two groups of melanoma patients (those with germline *CDKN2A* mutations and those without *CDKN2A* mutations) were analyzed together with the profile of a control group of individuals. A pattern of DNA hypomethylation was detected in the *CDKN2A*-negative patients relative to both *CDKN2A*-mutated patients and controls. Additionally, we delineated a panel of 90 CpG sites that were differentially methylated in *CDKN2A*-mutated patients relative to controls. Although we identified a possible constitutive epigenetic signature in *CDKN2A*-mutated patients, the occurrence of reported SNPs at the detected CpG sites complicated the data interpretation. Thus, further studies are required to elucidate the impact of these findings on melanoma predisposition and their possible effect on the penetrance of *CDKN2A* mutations.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

### 1. Introduction

Melanoma is a rare but highly aggressive cancer, accounting for 75% of skin cancer deaths (Schinke et al., 2010). The majority of melanoma cases is sporadic, but approximately 10% are hereditary and arise from highly penetrant germline mutations (Ward et al., 2012). The full genetic architecture underlying melanoma risk has not yet been elucidated, but *CDKN2A* is well established as a high-risk susceptibility gene, also known to increase the risk of pancreatic cancer (Udayakumar et al., 2010). *CDKN2A* encodes two different tumor suppressor proteins (p16<sup>INK4a</sup> and p14<sup>ARF</sup>), but the majority of the mutations affect p16<sup>INK4a</sup>, accounting for approximately 40% of familial cases, most of

which present with multiple melanomas. A few families were also reported to segregate germline mutations in either the p14<sup>ARF</sup> isoform of *CDKN2A* or the *CDK4* gene (Puntervoll et al., 2013; Tsao et al., 2012). The penetrance of *CDKN2A* mutations is incomplete, depending on age and geographic location; in addition, different clinical features have been reported in patients from the same family (Hyland et al., 2013). These observations indicate that additional genetic and environmental factors are relevant to cancer development and progression in individuals carrying *CDKN2A* mutations.

Epigenetic modifications can be defined as changes in chromatin that do not modify the underlying DNA sequence; these modifications are stable and heritable yet reversible (Bonasio et al., 2010). Epigenetic patterns serve as markers of gene activity as well as chromatin state (Srivastava et al., 2010). One major epigenetic process is DNA methylation, a chemical modification occurring mostly in CpG dinucleotides (Goll and Bestor, 2005). DNA methylation is an epigenetic mark controlling several biological processes, ranging from physiological conditions

\* Corresponding author at: Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of Sao Paulo, Rua do Matão, 277, CEP: 05508-090, Sao Paulo, Brazil.

E-mail address: [ana.krepischi@gmail.com](mailto:ana.krepischi@gmail.com) (A.C.V. Krepischi).

to responses to diseases such as cancer, in which aberrant profiles have been extensively documented (Hesson et al., 2010; Sharma et al., 2010). Epigenetic inactivation of *CDKN2A* is a common finding in melanomas (Freedberg et al., 2008), and aberrant methylation has also been reported for other genes (Schinke et al., 2010), with only a few of them exhibiting hypomethylation (Loriot et al., 2006).

It has been proposed that genetic mutations can lead to DNA methylation changes (Richards, 2006). The effects of mutations reach far beyond their aberrant genic product, as indicated by the genome-wide methylation changes driven by *BRAF* mutation in melanoma cells (Hou et al., 2011, 2012). In the scenario of cancer predisposition, the first example of germline epimutation was the *MSH2* methylation caused by deletion of the *EPCAM* gene in some Lynch syndrome patients (Ligtenberg et al., 2009). Epimutation in melanoma predisposition was investigated in some melanoma-prone families negative for *CDKN2A* mutations, but germline hypermethylation of the *CDKN2A* promoter was not detected (van Doorn et al., 2009).

Given the role of DNA methylation in tumorigenesis and the lack of epigenetic studies related to melanoma predisposition, our goal was to explore whether the presence of germline *CDKN2A* mutations or the occurrence of cutaneous melanoma would lead to constitutive genome-wide DNA methylation changes in melanoma patients. We identified a possible constitutive epigenetic signature in *CDKN2A*-mutated patients, and a pattern of DNA hypomethylation in *CDKN2A*-negative patients relative to both *CDKN2A*-mutated patients and controls.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Patients and control samples

This study was performed at the A. C. Camargo Cancer Center in Sao Paulo, Brazil, and the ethics committee of the institution approved the research protocol. Leukocyte DNA samples were obtained from peripheral blood, which was collected after the patients had signed informed consent forms.

Melanoma patients were referred to the Skin Cancer Department of the A. C. Camargo Cancer Center. The patients' personal and family histories of cancer were recorded. The group of hereditary melanoma patients comprised 8 unrelated probands previously found to carry pathogenic *CDKN2A* mutations (de Ávila et al., 2014; clinical data of these patients can be found in the Supplementary data 1). All *CDKN2A*-mutated patients were free of disease for at least one year when the peripheral blood samples were collected.

Eight leukocyte DNA samples from sporadic melanoma patients without detectable disease at the time of blood draw were also included in the study. This group of patients with sporadic melanoma was negative for *CDKN2A* mutations. We used eight unrelated healthy individuals as controls for the leukocyte methylome; these subjects were paired according to sex and age with the *CDKN2A*-mutated patients. Furthermore, additional sporadic melanoma patients ( $n=46$ ) and control individuals ( $n=95$ ) were genotyped for the SNP rs869047.

### 2.2. Genome-wide DNA methylation analysis

#### 2.2.1. Infinium HumanMethylation450K BeadChips

DNA methylation profiles of leukocytes were obtained using the Infinium HumanMethylation450K BeadChips (Illumina), following the manufacturer's instructions. These microarrays interrogate the DNA methylation status across 485,577 CpG loci distributed along the genome at single-nucleotide resolution. Briefly, a total of 500 ng bisulfite-converted DNA (EZ DNA methylation kit; Zymo Research) from each sample was amplified, fragmented and hybridized to BeadChips. Microarray images were captured using the iScan SQ scanner (Illumina), and only experiments exhibiting the recommended quality control parameters (call rate  $>0.98$  of probes with detection  $P$ -value  $\leq 0.01$ ) were used. Methylation data were

deposited into NCBI's Gene Expression Omnibus under the accession number GSE54939 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE54939>).

#### 2.2.2. Differential methylation analysis

Probes lacking  $\beta$ -values in any sample and those mapped to chromosomes X or Y were removed from the analysis. The raw data were normalized as proposed by Touleimat and Tost (2012), incorporating the correction of the Infinium II probe signals based on Infinium I.

To identify methylation differences among sporadic melanoma patients, *CDKN2A*-mutated patients and individuals without a personal history of cancer (controls), we performed statistical analysis with SAM (Significance Analysis of Microarrays, multi-class test with  $\delta = 0.5$ , 100 permutations, 90th percentile FDR = 0.49%), using the  $\beta$ -values of the top 1% of probes with the highest standard deviation across all samples (4708 CpGs), including sporadic melanoma patients, *CDKN2A*-mutated patients and controls.

In addition, we performed differential methylation analysis comparing *CDKN2A*-mutated patients and control subjects. This analysis was carried out after obtaining the  $\Delta\beta$  values ( $\Delta\beta$ ) for each CpG marker by subtracting the mean  $\beta$ -value of the *CDKN2A*-mutated group from the mean  $\beta$ -value of the control group. Next, a threshold of  $\Delta\beta \leq -0.20$  or  $\Delta\beta \geq 0.20$  was applied for selecting a set of CpGs, which were submitted to the Rank Product (RP) statistical test using the MultiExperiment Viewer (MeV) software (version 4.4.1), considering 100 permutations, a two-class test and FDR at 10%.

Hierarchical clusters were constructed for both analysis (SAM and RP) for statistically significant CpG sites using Euclidean distance and average linkage.

Information about differentially methylated CpG sites was retrieved from the dataset GSE42409 available at the Gene Expression Omnibus (Price et al., 2013), which reports SNPs and repetitive elements mapped either at CpG targets or probe sequences. In order to consider the effect of cellular heterogeneity of peripheral blood in the DNA methylation variability, differentially methylated CpG sites were matched with data provided by Jaffe and Irizarry (2014). Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software was used for in silico analysis of the set of differentially methylated genes. Networks were obtained using the core analysis tool, considering the Ingenuity knowledgebase (genes + endogenous chemicals), the human species, melanoma cell lines and all types of tissues and primary cells. We selected for presentation those networks with the highest scores.

### 2.3. Quantitative bisulfite pyrosequencing

Technical validation of the methylation level of a single CpG site (cg00631877; mapped to the *PLXNC1* gene) was performed by quantitative bisulfite pyrosequencing using PyroMark Q96 ID (Qiagen). PCR was performed using the PyroMark PCR kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The following primer sequences were used: *F-[Btm]AGGAGGTTGGTGGTTAG*, *R-CCACCAATTACTCTTCC*, Sequencing-*TATACTCTAATATCA*. After DNA bisulfite-converted amplification (input of 20–40 ng), biotinylated PCR products were precipitated using streptavidin-sepharose (GE Healthcare), and DNA strands were separated with PyroMark denaturation solution (Qiagen). Next, the samples were prepared in the PyroMark Q96 Vacuum Workstation for primer sequencing, annealed and submitted to pyrosequencing with PyroMark Gold Q96 reagents (Qiagen).

### 2.4. Genotyping of SNPs at CpG site

Four SNPs located at CpG sites were genotyped: cg00631877 (*PLXNC1*, rs869047), cg25709790 (*DFNA5*, rs2240005), cg13167158 (*MIB2*, rs11544452) and cg13078798 (*TGFBR3*, rs11165390). The list of primers and PCR conditions are available upon request. PCR products were sequenced using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing

Kit (Applied Biosystems). The capillary electrophoresis was performed in 3130xl Genetic Analyzer, following manufacturer's instructions (Applied Biosystems).

### 3. Results

SAM analysis comparing the top 1% most variable probes among sporadic melanoma patients, *CDKN2A*-mutated melanoma patients and controls resulted in 166 differentially methylated CpGs (Supplementary data 2). Hierarchical clustering showed that the group of sporadic melanoma patients had a distinctly hypomethylated methylome when compared to the two other groups (Fig. 1A). Part of this set of differentially methylated sites (115 CpGs) was mapped within sequences related to 110 genes, four of which had already been linked to melanoma: *NRAS*, *CDH5*, *SK1* and *GRIN2A*. The presence of SNPs and repetitive elements overlapping the full CpG dataset (166 CpGs) was investigated; 4.2% of the differentially methylated CpG sites were found to harbor SNPs at either cytosine or guanine, and 18.7% of the probes contained repetitive DNA in their sequences. Additionally, 130 of this set of 166 hypomethylated CpGs are sites that present methylation level varying according to the type of blood cells (see Supplementary data 2). In conclusion, this analysis showed that sporadic melanoma patients exhibit a global DNA hypomethylation profile compared to both *CDKN2A*-mutated patients and controls, which is mostly related to non-repetitive sequences.

This group of 110 hypomethylated genes was then evaluated using the network analysis tool of the IPA software. The top three canonical pathways among all differentially methylated genes included Telomere Extension by Telomerase, Molecular Mechanisms of Cancer and CDK5 Signaling. The most relevant of the created networks connected 21 of these genes harboring differentially methylated CpG sites with 10 additional genes, and this network was related to Embryonic Development, Organ Development and Organismal Development (Supplementary data 3, Figure S1A). In this network, the *NRAS* gene appeared to play a central role. Another network, involving 20 of the differentially methylated genes, was related to Hair and Skin Development and Function, Organ Morphology and Digestive System Development and Function (Supplementary data 3, Figure S1B).

To identify DNA methylation differences that might be driven by the presence of germline *CDKN2A* mutations, the methylation status of

*CDKN2A*-mutated patients was interrogated relative to that of the control group. We selected 589 differentially methylated CpGs ( $0.20 \leq \Delta\beta$  or  $\Delta\beta \leq -0.20$ ), which were submitted to Rank Products statistical analysis. Ninety CpG sites differed significantly between groups (47 hypomethylated and 43 hypermethylated, Table 1), and 63 of them mapped within 58 genes or their regulatory sequences. In the hierarchical clustering analysis, only the group of hypomethylated CpGs could distinguish the *CDKN2A*-mutated patients from the controls (Fig. 1B). The presence of SNPs and repetitive elements overlapping this CpG dataset was investigated, and the results indicated that 87.8% of the 90 CpG sites harbored a putative SNP at the cytosine or guanine, and 18.9% of the probes mapped fully or partially at repetitive DNA elements (Table 1). Using one of these CpG sites, we performed a technical validation by quantitative bisulfite pyrosequencing. The obtained methylation level of the cg00631877 probe, mapped within the *PLXNC1* gene, was highly correlated with 450 K microarray data (Spearman's correlation coefficient of 0.85; see Supplementary data 4). To investigate the presence of SNPs at the detected differentially methylated CpGs, we genotyped four sites in *CDKN2A*-mutated patients' and controls: the cg00631877, and three additional CpG sites (Table 2). Methylation levels measured using the 450K microarrays are directly associated with the genotype: the abolishment of CpG sites was associated to hypomethylation and, conversely, the hypermethylation was associated to the CpG site maintenance. We verify the allele frequency at rs869047 (cg00631877) in a larger group of melanoma patients ( $n = 62$ ) and controls ( $n = 95$ ), and no statistically significant difference was observed between groups (Fisher's exact test,  $P = 0.196$ ). In summary, we found a signature distinguishing *CDKN2A*-mutated patients from control subjects, which was mostly related to unique sites harboring putative SNPs.

The affected set of 58 differentially methylated genes was then evaluated using IPA. Two relevant networks were generated, one of which included 14 genes from our set, and was associated with Connective Tissue Disorders, Developmental Disorders and Hereditary Disorders; in this network, the gene *DYSF* was connected to several other genes. The second relevant network contained 14 genes from our dataset and showed functions related to Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function and Immune Cell Trafficking (Fig. 2). The top disease in this analysis was cancer, containing 26 genes from the group of detected differentially methylated genes (marked in Table 1).

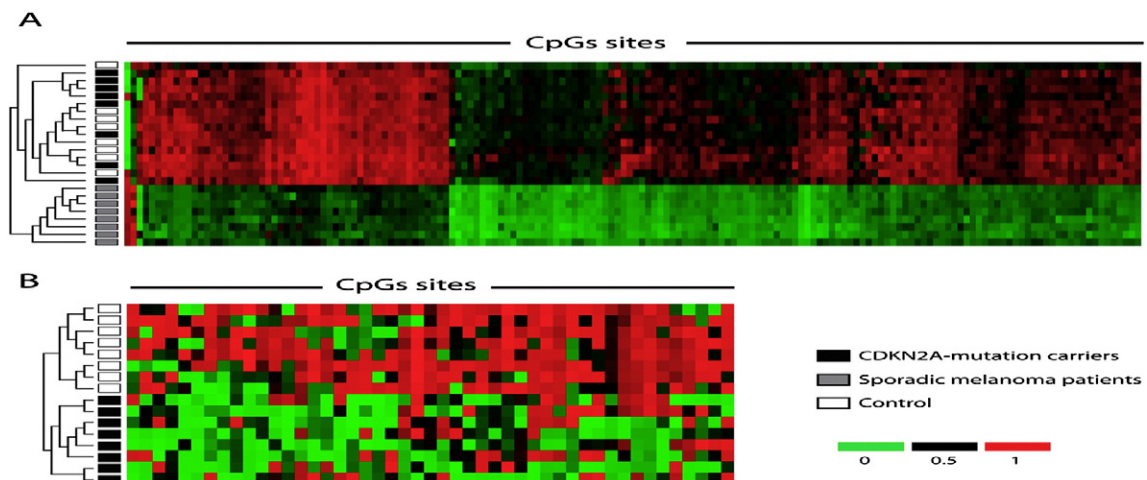


Fig. 1. Hierarchical clustering of the set of differentially methylated CpG sites in melanoma patients.

- (A) SAM statistical analysis revealed a panel of 166 hypomethylated CpG sites in sporadic melanoma patients compared to *CDKN2A*-mutated patients and controls.  
 (B) RP statistical analysis identified a set of 47 CpG sites that were hypomethylated in *CDKN2A*-mutated melanoma patients compared to controls. Color boxes at right indicate the methylation level.

**Table 1**  
Differentially methylated CpG sites in melanoma patients carrying *CDKN2A* mutations compared to the control group of healthy individuals.

llumina target ID	Chromosome	Genomic coordinates (Hg19)	$\Delta\beta$	P-value	Gene <sup>a</sup>	SNP at the target CpG site <sup>b</sup>	Repetitive elements <sup>a,b</sup>
cg15150396	2	71787431	-0.57	3.2e-4	<i>DYSF</i> <sup>c</sup>	rs11896175	-
cg12466610	1	220950205	-0.51	<1e-6	<i>MARC2</i>	rs12402066	-
cg00030117	2	119980249	-0.49	0.002	<i>STEAP3</i> <sup>c</sup>	rs838059	-
cg21927991	8	135494242	-0.48	0.002	<i>ZFAT</i> <sup>c</sup>	rs5025124	-
cg16377948	1	113221657	-0.46	0.002	<i>MOV10</i>	rs2999155	-
cg09866143	3	124861521	-0.46	0.003	<i>SLC12A8</i> <sup>c</sup>	rs11917613	MER5A1
cg00631877	12	94640673	-0.44	0.004	<i>PLXNC1</i> <sup>c</sup>	rs869047	-
cg26846609	16	20750043	-0.43	0.002	<i>THUMPDI</i>	rs1466770	-
cg03549208	2	203642154	-0.42	0.002	<i>ICA1L</i>	rs62194158	-
cg09636756	18	77134251	-0.42	4.2e-4	<i>ATP9B</i> <sup>c</sup>	rs3786181	-
cg02627240	7	144184387	-0.42	0.02	<i>TPK1</i>	rs41237	-
cg04515524	19	17489148	-0.39	0.009	<i>PLVAP</i>	rs73018403, rs7258084	-
cg07258715	3	12801785	-0.38	0.012	<i>TMEM40</i>	rs9865548	LINE
cg24051749	1	39340282	-0.38	8.65e-4	<i>GJA9</i> <sup>c</sup> ; <i>MYCBP</i>	rs880303	-
cg05308244	12	130968528	-0.37	0.009	<i>RIMBP2</i> <sup>c</sup>	rs4320987	-
cg04990378	20	61160996	-0.37	0.005	<i>C2orf166</i> <sup>c</sup> ; <i>MIR133A2</i>	rs6143047	-
cg04145681	6	30899162	-0.36	0.002	<i>SFTA2</i>	rs2532925	-
cg24407607	6	116753994	-0.35	0.008	<i>DSE</i>	rs549262	-
cg21589417	2	170834853	-0.34	0.009	<i>UBR3</i>	rs13017065	LINE
cg17040924	11	4565489	-0.33	0.015	<i>OR52M1</i> <sup>c</sup>	rs2641412	-
cg27341708	4	140952109	-0.33	0.015	<i>MAML3</i> <sup>c</sup>	rs11100449	-
cg24844518	5	156811669	-0.31	0.009	<i>CYFIP2</i>	rs4305634	-
cg13815695	12	104237895	-0.31	0.002	<i>GNN</i>	rs7966100	-
cg13653328	5	148520669	-0.31	0.007	<i>ABLIM3</i> <sup>c,d</sup>	rs11168092	-
cg04246708	1	246785611	-0.30	0.015	<i>CNST</i>	rs3129547	-
cg10776061	19	12768390	-0.30	0.004	<i>MAN2B1</i>	rs73002392	-
cg23803868	19	2340235	-0.26	0.004	<i>SPPL2B</i>	rs12460384	-
cg05809586	21	31709690	-0.22	0.007	<i>KRTAP27-1</i> <sup>c</sup>	rs2244485	-
cg24087071	14	94750291	0.51	<1e-6	<i>SERPINA10</i> <sup>c</sup>	rs1950641	LINE
cg25709790	7	24742552	0.51	4.1e-4	<i>DFNA5</i>	rs2240005	SINE
cg22142142	15	90891614	0.49	0.001	<i>GABARAPL3</i>	rs6496665	-
cg07157030	14	63671356	0.49	0.005	<i>RHOJ</i> <sup>f</sup>	-	-
cg13167158	1	1562535	0.46	0.001	<i>MIB2</i>	rs11544452	-
cg24086348	17	67138138	0.46	0.002	<i>ABCA6</i> <sup>c</sup>	rs3744489	-
cg18771300	14	63671737	0.46	0.011	<i>RHOJ</i> <sup>f</sup>	-	-
cg10926851	5	146253830	0.45	1.7e-5	<i>PPP2R2B</i> <sup>c</sup>	rs1835950	LINE
cg09167828	2	11286089	0.44	0.002	<i>C2orf50</i>	rs11903207	SINE
cg05751055	6	33036504	0.42	0.002	<i>HLA-DPA1</i> <sup>c</sup>	rs1042434	-
cg13078798	1	92203667	0.41	0.005	<i>TGFBR3</i> <sup>c</sup>	rs11165390	LTR
cg14302130	6	33032830	0.40	0.002	<i>HLA-DPA1</i> <sup>c</sup>	rs1042920	-
cg20981163	6	33049983	0.40	0.003	<i>HLA-DPB1</i>	rs9277358, rs75339520	-
cg10528826	7	157571460	0.39	0.006	<i>PTPRN2</i> <sup>c</sup>	rs28448886	-
cg12012426	4	1366463	0.39	0.002	<i>UVSSA</i> <sup>c</sup>	rs6856550	-
cg111716267	2	24367828	0.39	0.003	<i>LOC375190</i>	rs35331966	LINE
cg11437465	6	33036958	0.38	0.011	<i>HLA-DPA1</i> <sup>c</sup>	rs2308929	-
cg06484169	6	33052354	0.38	0.012	<i>HLA-DPB1</i>	rs9277441, rs80340467	SINE
cg14516100	4	186560083	0.37	0.012	<i>SORBS2</i> <sup>c</sup>	-	-
cg10500653	1	39407651	0.36	0.005	<i>RHBDL2</i>	-	-
cg05876883	16	58704495	0.36	0.006	<i>SLC38A7</i>	rs16960359	-
cg25283336	6	33033484	0.35	0.016	<i>HLA-DPA1</i> <sup>c</sup>	rs67640541	-
cg12858166	6	33033176	0.35	0.007	<i>HLA-DPA1</i> <sup>c</sup>	-	-
cg11738485	19	12877000	0.35	0.008	<i>HOOK2</i>	-	-
cg16523115	3	136675725	0.34	0.012	<i>IL20RB</i>	rs73864647	LINE
cg13431688	9	101869277	0.33	0.006	<i>TGFBR1</i> <sup>c</sup>	rs6478972	-
cg20550012	7	157370486	0.33	0.012	<i>PTPRN2</i> <sup>c</sup>	rs123779	-
cg10771931	19	34972145	0.30	0.0135	<i>WTIP</i>	rs7248847	-
cg07878625	7	148977647	0.30	0.008	<i>ZNF783</i>	rs10248661	-
cg10993865	13	111293846	0.29	0.011	<i>CARS2</i>	rs330570	-
cg01600516	17	6904263	0.27	0.015	<i>ALOX12</i> <sup>c</sup>	rs11571335	-
cg01543583	14	59947673	0.27	0.005	<i>C14orf149</i>	rs1253100	-
cg16652920	1	7432614	0.23	0.005	<i>CAMTA1</i> <sup>c</sup>	rs11579620	-
cg21598190	7	2099404	0.23	0.010	<i>MAD1L1</i> <sup>c</sup>	rs6953670	-
cg08136432	16	88902276	0.21	0.012	<i>GALNS</i>	rs12934499, rs17603837	-
cg02100397	19	646890	-0.50	1.9e-4	-	rs10403235	-
cg11331837	17	35161825	-0.44	0.001	-	rs295848	-
cg19373347	1	219634786	-0.42	0.005	-	rs12025363	-
cg06445586 <sup>d</sup>	11	49073835	-0.41	0.007	-	-	-
cg12074150	2	34128722	-0.41	3.2e-4	-	rs2103033, rs1705134	LTR
cg12479705	4	13893547	-0.37	0.007	-	rs962301	-
cg22849321	6	113128231	-0.37	0.011	-	rs3844153	LINE
cg08717807	16	85531414	-0.35	0.005	-	rs9931008	-
cg16032108	11	2286079	-0.33	0.007	-	-	MER45B
cg00727777	8	2337813	-0.32	0.010	-	-	-
cg22305850	2	100824103	-0.32	0.01	-	rs4851267	-
cg10470368	11	64146517	-0.31	0.011	-	rs61886927	MER45B

**Table 1** (continued)

Illumina target ID	Chromosome	Genomic coordinates (Hg19)	$\Delta\beta$	P-value	Gene <sup>a</sup>	SNP at the target CpG site <sup>b</sup>	Repetitive elements <sup>a,b</sup>
cg21070081	5	110105162	-0.31	0.001	-	rs244431	-
cg24643105	11	113928473	-0.30	0.007	-	rs34029763	-
cg19300401	6	16962712	-0.29	0.002	-	rs6903672	LINE
cg27452255	1	85686316	-0.29	0.01	-	rs12563295	-
cg19384241	2	55393977	-0.29	0.005	-	-	-
cg26941787	12	76023400	-0.28	0.006	-	rs7958760	LINE
cg25649515	3	177309023	-0.23	0.014	-	rs552757	-
cg27225663	6	169142715	0.51	0.003	-	rs909507	Simple repeat
cg16992599	15	28752121	0.44	0.004	-	-	-
cg14797147	5	124309096	0.41	8.5e-4	-	rs62372824	-
cg03965172	4	3683268	0.36	0.012	-	rs2880892	-
cg26465155	11	35611044	0.36	0.009	-	rs610680	LTR
cg11857805	14	100441223	0.34	0.004	-	rs1191030	-
cg18557837	3	39847605	0.28	0.009	-	rs9858242	-
cg21587006	10	839609	0.27	0.01	-	rs61831437	-

$\Delta\beta$  = [(mean  $\beta$ -value of *CDKN2A*-mutated group) - (mean  $\beta$ -value of control group)].

<sup>a</sup> UCSC Genome Browser.

<sup>b</sup> According to Price et al. (2013).

<sup>c</sup> Genes related to cancer (Ingenuity Pathway Analysis).

<sup>d</sup> Sites that present variable methylation level according to the type of blood cells Jaffe and Irizarry (2014).

#### 4. Discussion

This study reports the first genome-wide DNA methylation profiling of leukocytes in melanoma patients. In particular, the methylation profile of melanoma patients carrying *CDKN2A* mutations was analyzed relative to that of individuals without a personal history of cancer to determine whether germline mutations affecting a cancer gene could lead to epigenomic changes. Additionally, we included a group of *CDKN2A*-negative sporadic melanoma patients to identify DNA methylation marks possibly related to the occurrence of melanoma.

Our results showed that sporadic melanoma patients exhibited a hypomethylated profile relative to both *CDKN2A*-mutated patients and control subjects. The hypomethylation of this set of genes represents a possible epigenetic mark resulting from previous cancer occurrence and includes genes known to be relevant for melanoma. *NRAS*, an oncogene that is mutated in more than 20% of melanomas (Fedorenko et al., 2013), was highlighted in the identified network as playing a key role, similar to the *CDH5* gene, which is overexpressed in aggressive melanoma cells (Hendrix et al., 2001). In addition, previous studies have identified *SKI* as a tumor suppressor and tumor-promoting gene (Reed et al.,

2005), and *GRIN2A* as frequently mutated in melanoma and related to cancer progression (Prickett and Samuels, 2012; Wei et al., 2011).

Preceding studies have investigated the DNA methylation pattern of the peripheral blood in patients with several types of cancers, in an effort to search for relevant biomarkers (Koestler et al., 2012; Langevin et al., 2012; Marsit et al., 2011; Pedersen et al., 2011; Schinke et al., 2010; Teschendorff et al., 2009; Wang et al., 2010). Koestler and co-workers (2012) suggested that the detected methylation differences were due to changes in leukocyte subpopulations during the course of the disease. We did not detect differentially methylated CpG sites overlapping the top 50 sites proposed as a leukocyte signature of cancer patients. Therefore, melanoma patients may show a distinctive DNA methylation profile in their peripheral blood compared to other cancer patients.

In a meta-analysis study, Woo and Kim (2012) proposed that DNA hypomethylation may be a suitable biomarker for cancer risk. Accordingly, it was recently shown that this hypomethylation might be advantageous for cancer development (Friso et al., 2013). However, *CDKN2A*-mutated melanoma patients did not show extensive DNA hypomethylation, suggesting that the detected difference in methylation profiles may reflect differences in the genetic etiology of the melanoma between the two groups (sporadic versus hereditary melanoma). Alternatively, it is possible that the distinct hypomethylation patterns resulted from the different time periods that elapsed from the occurrence of the cancer until the leukocytes of the melanoma patients with and without *CDKN2A* mutations were collected. According to Jaffe and Irizarry (2014), the cellular composition of peripheral blood is a source of variability in DNA methylation. Thus, the occurrence of melanoma may lead to differences in the composition of blood cell populations, resulting in broad changes in the DNA methylation profile of leukocytes that would eventually decrease in frequency over time. In our study, although the group of sporadic melanoma patients was free of the disease at the time of blood draw, it still showed a hypomethylated DNA methylation profile. However, about 80% of the detected hypomethylated CpGs were sites highlighted as variable according to leukocyte cell composition (Jaffe and Irizarry, 2014), suggesting that the detected hypomethylated profile can represent differences in cell composition as a result of the short time elapsed from the occurrence of the disease.

We also delineated a panel of CpG sites that distinguished *CDKN2A*-mutated melanoma patients from controls, suggesting an epigenetic signature associated with the presence of germline *CDKN2A* mutations. The gene *SDC2* was suggested as an upstream regulator based on IPA analysis, and it is noteworthy that this gene is regulated by *MC1R*, a key gene involved in melanogenesis (Chung et al., 2012). Nevertheless, the majority of sites from the panel of differentially methylated CpGs

**Table 2**

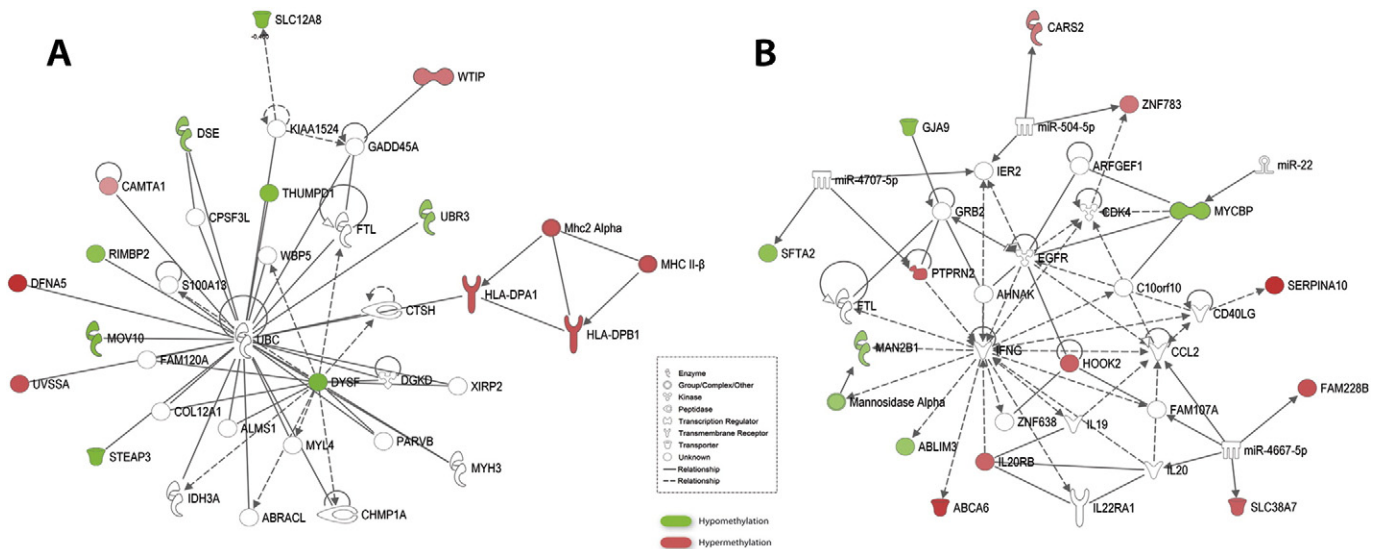
Genotyping of SNPs at differentially methylated CpG sites in melanoma patients carrying *CDKN2A* mutations relative to control group of healthy individuals.

Sample ID	<i>PLXNC1</i> rs869047 ( $\beta$ -value) [G; 0.441] <sup>a</sup>	<i>DFNA5</i> rs2240005 ( $\beta$ -value) [G; 0.425] <sup>a</sup>	<i>MIB2</i> rs11544452 ( $\beta$ -value) [G; 0.240] <sup>a</sup>	<i>TGFB3</i> rs11165390 ( $\beta$ -value) [G; 0.460] <sup>a</sup>
Mel.M1	NA (0.56)	NA (0.87)	NA (0.97)	NA (0.42)
Mel.M2	A/G (0.59)	A/G (0.44)	G (0.94)	G (0.83)
Mel.M3	A (0.06)	G (0.88)	G (0.95)	A/G (0.52)
Mel.M4	A/G (0.54)	G (0.89)	G (0.96)	G (0.86)
Mel.M5	A (0.05)	G (0.88)	G (0.96)	G (0.88)
Mel.M6	A/G (0.57)	G (0.90)	A/G (0.24)	G (0.84)
Mel.M7	A (0.06)	G (0.89)	G (0.96)	A (0.07)
Mel.M8	A/G (0.57)	G (0.92)	G (0.93)	G (0.82)
C1	A/G (0.63)	A/G (0.31)	G (0.95)	A/G (0.40)
C2	G (0.89)	A (0.02)	A/G (0.23)	A (0.06)
C3	G (0.92)	A (0.04)	A/G (0.22)	A (0.07)
C4	A/G (0.60)	A/G (0.39)	A/G (0.21)	A (0.07)
C5	G (0.92)	A (0.04)	G (0.95)	G (0.81)
C6	G (0.93)	A/G (0.44)	A/G (0.25)	A (0.05)
C7	A/G (0.68)	A/G (0.46)	A/G (0.21)	A (0.07)
C8	G (0.94)	G (0.89)	A/G (0.20)	A/G (0.46)

NA — information not available.

Mel.M1-8:melanoma patients carrying *CDKN2A* mutations C1-8: healthy individuals

<sup>a</sup> [Ancestral allele; heterozygosity] according to NCBI dbSNP BUILD 138.



**Fig. 2.** Networks created by IPA based on the interactions between the set of 58 differentially methylated genes in *CDKN2A*-mutated melanoma patients relative to control individuals. The two most relevant networks were associated with the following pathways:

- (A) Connective Tissue Disorders, Developmental Disorders and Hereditary Disorders, in which the gene *DYSF* appeared to play a central role;  
 (B) Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function and Immune Cell Trafficking. The intensity of the node color indicates the degree of DNA methylation. Uncolored nodes are genes incorporated by IPA based on scientific evidence

harbored putative SNPs, and this complicated the data interpretation. Because the performed methylation assay was based on the quantitative genotyping of C/T variation produced at CpG sites by bisulfite conversion, we were unable to distinguish non-methylated cytosine from thymine if there was a SNP at the interrogated CpG site. Likewise, if there was a SNP at the guanine of the dinucleotide CpG, the CpG site was lost. The 450K platform contains 4.3% of the interrogated CpG sites harboring SNPs (Price et al., 2013), and the CpG panel that was delineated in association with germline *CDKN2A* mutation displayed a great enrichment of these SNP sites. This either could represent an epigenetic signature of these hereditary melanoma patients or surrogate genetic markers. To answer this question, four of these CpGs harboring SNPs sites were genotyped, all of them mapped at genes previously associated with melanoma: *PLXNC1*, a suppressor of melanoma progression (Chen et al., 2013; Paliwal et al., 2013; Scott et al., 2009), *DFNA5*, a gene that contributes to resistance of melanoma to drug treatment (Lage et al., 2001), *MIB2*, reported as suppressor of melanoma invasion (Takeuchi et al., 2006), and *TGFBR3*, a candidate gene to melanoma susceptibility (Walker et al., 2004). Our data showed that the detected methylation level at these sites in melanoma patients and controls is directly associated with genetic variation.

To date, seven genome-wide association studies have investigated the etiology of *CDKN2A*-negative familial melanoma (Amos et al., 2011; Barrett et al., 2011; Bishop et al., 2009; Brown et al., 2008; Iles et al., 2013; Macgregor et al., 2011; Teerlink et al., 2012), and the reported SNPs do not overlap with our gene dataset. Genetic variants can also influence the penetrance of *CDKN2A* mutations, such as those mapped to the repair genes *POLN* and *PRKDC* (Liang et al., 2012), and *MC1R* (Fargnoli et al., 2010). Further investigation is needed to determine whether the panel of CpGs harboring SNPs detected in *CDKN2A*-mutated melanoma patients influences the penetrance of the *CDKN2A* mutations.

In conclusion, our results demonstrate that (a) the leukocytes of sporadic melanoma patients exhibit a DNA hypomethylation pattern, possibly related to the occurrence of cancer near the time of methylation investigation, and that (b) melanoma patients carrying *CDKN2A* mutations display an epigenomic signature, which probably results from

underlying SNPs. However, further studies in larger melanoma patient cohorts are warranted to clarify the etiology and importance of this signature.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.09.009>.

#### Disclosure/conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### Acknowledgments

We thank the Biobank of the A. C. Camargo Cancer Center for providing DNA samples, and Dr. Felipe C. Carneiro for technical assistance in *CDKN2A* genotyping. We are also indebted to the patients and their families included in this study. This work was supported by grants from the Brazilian National Institute of Science and Technology in Oncogenomics (FAPESP 2008/57887-9; CNPq 573589/08-9) and FAPESP (2007/04313-2; 2012/13963-9; 2013/07480-8).

#### References

- Amos, C.I., Wang, L.-E., Lee, J.E., Gershenwald, J.E., Chen, W.V., Fang, S., Kosoy, R., Zhang, M., Qureshi, A. a, Vattathil, S., Schacherer, C.W., Gardner, J.M., Wang, Y., Bishop, D.T., Barrett, J.H., MacGregor, S., Hayward, N.K., Martin, N.G., Duffy, D.L., Mann, G.J., Cust, A., Hopper, J., Brown, K.M., Grimm, E. a, Xu, Y., Han, Y., Jing, K., McHugh, C., Laurie, C.C., Doheny, K.F., Pugh, E.W., Seldin, M.F., Han, J., Wei, Q., 2011. Genome-wide association study identifies novel loci predisposing to cutaneous melanoma. *Hum. Mol. Genet.* 20, 5012–5023. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddr415>.
- Barrett, J.H., Iles, M.M., Harland, M., Taylor, J.C., Aitken, J.F., Andresen, P.A., Akslen, L. a, Armstrong, B.K., Avril, M.-F., Azizi, E., Bakker, B., Bergman, W., Bianchi-Scarrà, G., Bressac-de Paillerets, B., Calista, D., Cannon-Albright, L. a, Corda, E., Cust, A.E., Dębniak, T., Duffy, D., Dunning, A.M., Easton, D.F., Friedman, E., Galan, P., Ghiorzo, P., Giles, G.G., Hansson, J., Hocevar, M., Höiom, V., Hopper, J.L., Ingvar, C., Janssen, B., Jenkins, M. a, Jönsson, G., Kefferd, R.F., Landi, G., Landi, M.T., Lang, J., Lubiński, J., Mackie, R., Malvehy, J., Martin, N.G., Molven, A., Montgomery, G.W., van Nieuwpoort, F. a, Novakovic, S., Olsson, H., Pastorino, L., Puig, S., Puig-Butlle, J.A., Ransderson-Moor, J., Snowden, H., Tuominen, R., Van Belle, P., van der Stoep, N., Whiteman, D.C., Zelenika, D., Han, J., Fang, S., Lee, J.E., Wei, Q., Lathrop, G.M., Gillanders, E.M., Brown, K.M., Goldstein, A.M., Kanetsky, P. a, Mann, G.J., Macgregor, S., Elder, D.E., Amos, C.I., Hayward,



- N.K. Gruis, N. a. Demenais, F. Bishop, J. a. N. Bishop, D.T., 2011. Genome-wide association study identifies three new melanoma susceptibility loci. *Nat. Genet.* 43, 1108–1113. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.959>.
- Bishop, D.T., Demenais, F., Iles, M.M., Harland, M., Taylor, J.C., Corda, E., Randerson-Moor, J., Aitken, J.F., Avril, M.-F., Azizi, E., Bakker, B., Bianchi-Scarrà, G., Bressac-de Paillerets, B., Calista, D., Cannon-Albright, L.A., Chin-A-Woeng, T., Debniak, T., Galore-Haskel, G., Ghorzo, P., Gut, I., Hansson, J., Hocevar, M., Höiom, V., Hopper, J.L., Ingvar, C., Kanetsky, P.A., Kefford, R.F., Landi, M.T., Lang, J., Lubiński, J., Mackie, R., Malvey, J., Mann, G.J., Martin, N.G., Montgomery, G.W., van Nieuwpoort, F.A., Novakovic, S., Olsson, H., Puig, S., Weiss, M., van Workum, W., Zelenika, D., Brown, K.M., Goldstein, A.M., Gillanders, E.M., Boland, A., Galan, P., Elder, D.E., Gruis, N.A., Hayward, N.K., Lathrop, G.M., Barrett, J.H., Bishop, J.A.N., 2009. Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. *Nat. Genet.* 41, 920–925. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.411>.
- Bonasio, R., Tu, S., Reinberg, D., 2010. Molecular signals of epigenetic states. *Science* 330, 612–616. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1191078>.
- Brown, K.M., Macgregor, S., Montgomery, G.W., Craig, D.W., Zhao, Z.Z., Iyadurai, K., Henders, A.K., Homer, N., Campbell, M.J., Stark, M., Thomas, S., Schmid, H., Holland, E.A., Gillanders, E.M., Duffy, D.L., Maskiell, J.A., Jetann, J., Ferguson, M., Stephan, D.A., Cust, A.E., Whiteman, D., Green, A., Olsson, H., Puig, S., Ghorzo, P., Hansson, J., Demenais, F., Goldstein, A.M., Gruis, N.A., Elder, D.E., Bishop, J.N., Kefford, R.F., Giles, G.G., Armstrong, B.K., Aitken, J.F., Hopper, J.L., Martin, N.G., Trent, J.M., Mann, G.J., Hayward, N.K., 2008. Common sequence variants on 20q11.22 confer melanoma susceptibility. *Nat. Genet.* 40, 838–840. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.163>.
- Chen, Y., Soong, J., Mohanty, S., Xu, L., Scott, G., 2013. The neural guidance receptor Plexin C1 delays melanoma progression. *Oncogene* 32, 4941–4949. <http://dx.doi.org/10.1038/nc2012.511>.
- Chung, H., Lee, J., Jeong, D., Han, I.-O., Oh, E.-S., 2012. Melanocortin 1 receptor regulates melanoma cell migration by controlling syndecan-2 expression. *J. Biol. Chem.* 287, 19326–19335. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.334730>.
- De Ávila, A.L.R., Krepsich, A.C.V., Moredo, L.F., Aguiar, T.F.M., da Silva, F.C., de Sá, B.C.S., de Nóbrega, A.F., Achatz, M.I.W., Duprat, J.P., Landman, G., Carraro, D.M., 2014. Germline CDKN2A mutations in Brazilian patients of hereditary cutaneous melanoma. *Fam. Cancer* <http://dx.doi.org/10.1007/s10689-014-9736-1>.
- Fargnoli, M.C., Gandini, S., Peris, K., Maisonneuve, P., Raimondi, S., 2010. MC1R variants increase melanoma risk in families with CDKN2A mutations: a meta-analysis. *Eur. J. Cancer* 46, 1413–1420. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2010.01.027>.
- Fedorenko, I.V., Gibney, G.T., Smalley, K.S.M., 2013. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene* 32, 3009–3018. <http://dx.doi.org/10.1038/nc2012.453>.
- Frederberg, D.E., Rigas, S.H., Russak, J., Gai, W., Kaplow, M., Osman, I., Turner, F., Randerson-Moor, J., a. Houghton, A., Busam, K., Timothy Bishop, D., Bastian, B.C., Newton-Bishop, J. a. Polsky, D., 2008. Frequent p16-independent inactivation of p14ARF in human melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 784–795. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djn157>.
- Friso, S., Udali, S., Guarini, P., Pellegrini, C., Pattini, P., Moruzzi, S., Girelli, D., Pizzolo, F., Martinelli, N., Corrocher, R., Olivieri, O., Choi, S.-W., 2013. Global DNA hypomethylation in peripheral blood mononuclear cells as a biomarker of cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 22, 348–355. <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0859>.
- Goll, M.G., Bestor, T.H., 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 481–514. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721>.
- Hendrix, M.J., Seftor, E. a. Meltzer, P.S., Gardner, L.M., Hess, a. R., Kirschmann, D. a. Schatteman, G.C., Seftor, R.E., 2001. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 8018–8023. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.131209798>.
- Hesson, L.B., Hitchens, M.P., Ward, R.L., 2010. Epimutations and cancer predisposition: importance and mechanisms. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20, 290–298. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cde.2010.02.005>.
- Hou, P., Liu, D., Xing, M., 2011. Genome-wide alterations in gene methylation by the BRAF V600E mutation in papillary thyroid cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer* 18, 687–697. <http://dx.doi.org/10.1530/ERC-11-0212>.
- Hou, P., Liu, D., Dong, J., Xing, M., 2012. The BRAF(V600E) causes widespread alterations in gene methylation in the genome of melanoma cells. *Cell Cycle* 11, 286–295. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.11.2.18707>.
- Hyland, P.L., Burke, L.S., Pfeiffer, R.M., Mirabello, L., Tucker, M. a. Goldstein, A.M., Yang, X.R., 2013. LINE-1 methylation in peripheral blood and the risk of melanoma in melanoma-prone families with and without CDKN2A mutations. *Melanoma Res.* 23, 55–60. <http://dx.doi.org/10.1097/CMR.0b013e32835ad5c1>.
- Iles, M.M., Law, M.H., Stacey, S.N., Han, J., Fang, S., Pfeiffer, R., Harland, M., Macgregor, S., Taylor, J.C., Aben, K.K., Akslen, L. a. Avril, M.-F., Azizi, E., Bakker, B., Benediktsdottir, K.R., Bergman, V., Scarrà, G.B., Brown, K.M., Calista, D., Chaudru, V., Fargnoli, M.C., Cust, A.E., Demenais, F., de Waal, A.C., Debniak, T., Elder, D.E., Friedman, E., Galan, P., Ghorzo, P., Gillanders, E.M., Goldstein, A.M., Gruis, N. a. Hansson, J., Helsing, P., Hocevar, M., Höiom, V., Hopper, J.L., Ingvar, C., Janssen, M., Jenkins, M. a. Kanetsky, P. a. Kiemeny, L. a. Lang, J., Lathrop, G. M., Leachman, S., Lee, J.E., Lubiński, J., Mackie, R.M., Mann, G.J., Martin, N.G., Mayordomo, J.L., Molven, A., Mulder, S., Nagore, E., Novaković, S., Okamoto, I., Olafsson, J.H., Olsson, H., Pehamberger, H., Peris, K., Grasa, M.P., Planelles, D., Puig, S., Puig-Butille, J.A., Randerson-Moor, J., Requena, C., Rivoltini, L., Rodolfo, M., Santinami, M., Sigurgeirsson, B., Snowden, H., Song, F., Sulem, P., Thorisdottir, K., Tuominen, R., Van Belle, P., van der Stoep, N., van Rossum, M. M., Wei, Q., Wendt, J., Zelenika, D., Zhang, M., Landi, M.T., Thorleifsson, G., Bishop, D.T., Amos, C.I., Hayward, N.K., Stefansson, K., Bishop, J. a. N., Barrett, J. H., 2013. A variant in FTO shows association with melanoma risk not due to BMI. *Nat. Genet.* 45, 428–432. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2571> (432e1).
- Jaffe, A.E., Irizarry, R. a. 2014. Accounting for cellular heterogeneity is critical in epigenome-wide association studies. *Genome Biol.* 15, R31. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r31>.
- Koestler, D.C., Marsit, C.J., Christensen, B.C., Accomando, W., Langevin, S.M., 2012. Peripheral Blood Immune Cell Methylation Profiles Are Associated with Nonhematopoietic Cancers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 21, 1293–1302. <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0361>.
- Lage, H., Helmbach, H., Grottko, C., Dietel, M., Schadendorf, D., 2001. *DFNA5 (ICERE-1)* contributes to acquired etoposide resistance in melanoma cells. *FEBS Lett.* 494, 54–59.
- Langevin, S.M., Koestler, D.C., Christensen, B.C., Butler, R. a. Wiencke, J.K., Nelson, H.H., Houseman, E.A., Marsit, C.J., Kelsey, K.T., 2012. Peripheral blood DNA methylation profiles are indicative of head and neck squamous cell carcinoma: an epigenome-wide association study. *Epigenetics* 7, 291–299. <http://dx.doi.org/10.4161/epi.7.3.19134>.
- Liang, X.S., Pfeiffer, R.M., Wheeler, W., Maeder, D., Burdette, L., Yeager, M., Chanock, S., Tucker, M. a. Goldstein, A.M., Yang, X.R., 2012. Genetic variants in DNA repair genes and the risk of cutaneous malignant melanoma in melanoma-prone families with/without CDKN2A mutations. *Int. J. Cancer* 130, 2062–2066. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.26231>.
- Ligtenberg, M.J.L., Kuiper, R.P., Chan, T.L., Goossens, M., Hebeda, K.M., Voorendt, M., Lee, T. Y.H., Bodmer, D., Hoenselaar, E., Hendriks-Cornelissen, S.J.B., Tsui, W.Y., Kong, C.K., Brunner, H.G., van Kessel, A.G., Yuen, S.T., van Krieken, J.H.J.M., Leung, S.Y., Hoogerbrugge, N., 2009. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat. Genet.* 41, 112–117. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.283>.
- Loriot, A., De Plaen, E., Boon, T., De Smet, C., 2006. Transient down-regulation of DNMT1 methyltransferase leads to activation and stable hypomethylation of MAGE-A1 in melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 281, 10118–10126. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M510469200>.
- Macgregor, S., Montgomery, G.W., Liu, J.Z., Zhao, Z.Z., Henders, A.K., Stark, M., Schmid, H., Holland, E. a. Duffy, D.L., Zhang, M., Painter, J.N., Nyholt, D.R., Maskiell, J. a. Jetann, J., Ferguson, M., Cust, A.E., Jenkins, M. a. Whiteman, D.C., Olsson, H., Puig, S., Bianchi-Scarrà, G., Hansson, J., Demenais, F., Landi, M.T., Debniak, T., Mackie, R., Azizi, E., Bressac-de Paillerets, B., Goldstein, A.M., Kanetsky, P. a. Gruis, N. a. Elder, D.E., Newton-Bishop, J. a. Bishop, D.T., Iles, M. M., Helsing, P., Amos, C.I., Wei, Q., Wang, L.-E., Lee, J.E., Qureshi, A. a. Kefford, R. F., Giles, G.G., Armstrong, B.K., Aitken, J.F., Han, J., Hopper, J.L., Trent, J.M., Brown, K.M., Martin, N.G., Mann, G.J., Hayward, N.K., 2011. Genome-wide association study identifies a new melanoma susceptibility locus at 1q21.3. *Nat. Genet.* 43, 1114–1118. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.958>.
- Marsit, C.J., Koestler, D.C., Christensen, B.C., Karagas, M.R., Houseman, E.A., Kelsey, K.T., 2011. DNA methylation array analysis identifies profiles of blood-derived DNA methylation associated with bladder cancer. *J. Clin. Oncol.* 29, 1133–1139. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2010.31.3577>.
- Paliwal, A., Temkin, A.M., Kerkel, K., Yale, A., Yotova, I., Drost, N., Lax, S., Nhan-Chang, C.-L., Powell, C., Borczuk, A., Aviv, A., Wapner, R., Chen, X., Nagy, P.L., Schork, N., Do, C., Torkamani, A., Tycko, B., 2013. Comparative anatomy of chromosomal domains with imprinted and non-imprinted allele-specific DNA methylation. *PLoS Genet.* 9, e1003622. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1003622>.
- Pedersen, K.S., Bamlet, W.R., Oberg, A.L., de Andrade, M., Matsumoto, M.E., Tang, H., Thibodeau, S.N., Petersen, G.M., Wang, L., 2011. Leukocyte DNA methylation signature differentiates pancreatic cancer patients from healthy controls. *PLoS One* 6, e18223. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018223>.
- Price, M.E., Cotton, A.M., Lam, L.L., Farré, P., Emberly, E., Brown, C.J., Robinson, W.P., Kobor, M.S., 2013. Additional annotation enhances potential for biologically-relevant analysis of the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array. *Epigenetics Chromatin* 6, 4. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-8935-6-4>.
- Prickett, T.D., Samuels, Y., 2012. Molecular pathways: dysregulated glutamatergic signaling pathways in cancer. *Clin. Cancer Res.* 18, 4240–4246. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1217>.
- Puntervoll, H.E., Yang, X.R., Vetti, H.H., Bachmann, I.M., Avril, M.F., Benfodda, M., Catricalà, C., Dalle, S., Duval-Modeste, A.B., Ghorzo, P., Grammatico, P., Harland, M., Hayward, N.K., Hu, H.-H., Jouary, T., Martin-Denavit, T., Ozola, A., Palmer, J.M., Pastorino, L., Pjanova, D., Soufir, N., Steine, S.J., Stratigos, A.J., Thomas, L., Tinat, J., Tsao, H., Veinalde, R., Tucker, M. a. Bressac-de Paillerets, B., Newton-Bishop, J. a. Goldstein, A.M., Akslen, L. a. Molven, A., 2013. Melanoma prone families with CDK4 germline mutation: phenotypic profile and associations with MC1R variants. *J. Med. Genet.* 50, 264–270. <http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101455>.
- Reed, J. a. Lin, Q., Chen, D., Mian, I.S., Medrano, E.E., 2005. SKI pathways inducing progression of human melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 24, 265–272. <http://dx.doi.org/10.1007/s10555-005-1576-x>.
- Richards, E.J., 2006. Inherited epigenetic variation—revisiting soft inheritance. *Nat. Rev. Genet.* 7, 395–401. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1834>.
- Schinke, C., Mo, Y., Yu, Y., Amiri, K., Sosman, J., Grealley, J., Verma, A., 2010. Aberrant DNA methylation in malignant melanoma. *Melanoma Res.* 20, 253–265. <http://dx.doi.org/10.1097/CMR.0b013e328338a35a>.
- Scott, G. a. McClelland, L. a. Fricke, A.F., Fender, A., 2009. Plexin C1, a receptor for semaphorin 7a, inactivates cofilin and is a potential tumor suppressor for melanoma progression. *J. Invest. Dermatol.* 129, 954–963. <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2008.329>.
- Sharma, S., Kelly, T.K., Jones, P.A., 2010. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31, 27–36. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgp220>.
- Srivastava, S., Mishra, R.K., Dhawan, J., 2010. Regulation of cellular chromatin state: insights from quiescence and differentiation. *Organogenesis* 6, 37–47.
- Takeuchi, T., Adachi, Y., Sonobe, H., Furihata, M., Ohtsuki, Y., 2006. A ubiquitin ligase, skeletrophin, is a negative regulator of melanoma invasion. *Oncogene* 25, 7059–7069. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1209688>.

- Teerlink, C., Farnham, J., Allen-Brady, K., Camp, N.J., Thomas, A., Leachman, S., Cannon-Albright, L., 2012. A unique genome-wide association analysis in extended Utah high-risk pedigrees identifies a novel melanoma risk variant on chromosome arm 10q. *Hum. Genet.* 131, 77–85. <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-011-1048-z>.
- Teschendorff, A.E., Menon, U., Gentry-Maharaj, A., Ramus, S.J., Gayther, S. a., Apostolidou, S., Jones, A., Lechner, M., Beck, S., Jacobs, I.J., Widschwendter, M., 2009. An epigenetic signature in peripheral blood predicts active ovarian cancer. *PLoS One* 4, e8274. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008274>.
- Touleimat, N., Tost, J., 2012. Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics* 4, 325–341. <http://dx.doi.org/10.2217/epi.12.21>.
- Tsao, H., Chin, L., Garraway, L. a., Fisher, D.E., 2012. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev.* 26, 1131–1155. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.191999.112>.
- Udayakumar, D., Mahato, B., Gabree, M., Tsao, H., 2010. Genetic determinants of cutaneous melanoma predisposition. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 29, 190–195. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sder.2010.06.002>.
- Van Doorn, R., Zoutman, W.H., Gruis, N. a., 2009. Absence of germline epimutation of the CDKN2A gene in familial melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 129, 781–784. <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2008.287>.
- Walker, G.J., Indsto, J.O., Sood, R., Faruque, M.U., Hu, P., Pollock, P.M., Duray, P., Holland, E. a., Brown, K., Kefford, R.F., Trent, J.M., Mann, G.J., Hayward, N.K., 2004. Deletion mapping suggests that the 1p22 melanoma susceptibility gene is a tumor suppressor localized to a 9-Mb interval. *Gene Chromosome Cancer* 41, 56–64. <http://dx.doi.org/10.1002/gcc.20056>.
- Wang, L., Aakre, J.A., Jiang, R., Marks, R.S., Wu, Y., Chen, J., Thibodeau, S.N., Pankratz, V.S., Yang, P., 2010. Methylation markers for small cell lung cancer in peripheral blood leukocyte DNA. *J. Thorac. Oncol.* 5, 778–785. <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181d6e0b3>.
- Ward, K. a., Lazovich, D., Hordinsky, M.K., 2012. Germline melanoma susceptibility and prognostic genes: a review of the literature. *J. Am. Acad. Dermatol.* 67, 1055–1067. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2012.02.042>.
- Wei, X., Walia, V., Lin, J.C., Teer, J.K., Prickett, T.D., Gartner, J., Davis, S., Stemke-Hale, K., Davies, M. a., Gershenwald, J.E., Robinson, W., Robinson, S., Rosenberg, S. a., Samuels, Y., 2011. Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. *Nat. Genet.* 43, 442–446. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.810>.
- Woo, H.D., Kim, J., 2012. Global DNA hypomethylation in peripheral blood leukocytes as a biomarker for cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One* 7, e34615. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0034615>.