

ANÁLISE DO METILOMA EM CARCINOMAS PAPILÍFEROS DE TIREOIDE

CAROLINE MORAES BELTRAMI

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Prof. Dra Silvia Regina Rogatto

Co-Orientadora: Dra Hellen Kuasne

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Beltrami, Caroline Moraes

Análise do metiloma em carcinomas papilíferos de tireoide /

Caroline Moraes Beltrami – São Paulo, 2015.

110p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Silvia Regina Rogatto

Descritores: 1.PERFIL DE METILAÇÃO DE DNA. 2. CÂNCER
PAPILÍFERO DE TIREOIDE. 3. MUTAÇÃO *BRAF*.

“Ninguém pode ser escravo de sua identidade:
quando surge uma possibilidade de mudança, é preciso mudar”

Elliott Gould

DEDICATÓRIA

Não encontro alguém melhor à quem dedicar esta dissertação se não à DEUS. Se não fosse por este cuidado, amor e graça eu não estaria aqui hoje. Por isso me sinto como o rei Davi quando disse “Tú é o meu Deus, eu sempre te adorarei e louvarei o teu nome, pois tens feito coisas maravilhosas, tens cumprido fielmente os planos seguros que há muito tempo decidiste fazer” (Is 25:1). Essa etapa é apenas mais uma dessas coisas maravilhosas que o Senhor tem me levado a viver, que toda honra seja dada somente a Ti hoje e para sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus** por ter me conduzido e me sustentado até aqui, pela certeza do seu amor inabalável e por sua graça infinita. Obrigada pela oportunidade diária de aprender um pouco mais e conhecer a grandeza de quem Tu és.

Agradeço à meus pais, **Regina e Claudinei Beltrami**, pela estrutura familiar, emocional e espiritual ao longo de toda minha vida. Obrigada, especialmente, por apoiarem os meus sonhos e acreditarem nas promessas de Deus para mim e para nós. Obrigada por todo investimento, por todos os ensinamentos, por cada conversa e por nunca desanimarem diante das dificuldades. Obrigada por toda força que vocês me deram e pelas lições de vida que me incentivaram a nunca desistir. Obrigada por caminharmos juntos e por nos momentos difíceis, de desânimo e de tristeza para mim, serem os meus heróis prontos para me salvar. Obrigada por me ensinarem a buscar viver uma vida com propósito. Tudo até aqui só foi possível porque vocês com um amor transcendente estiveram comigo e tornaram a caminhada mais leve. Vocês são minha inspiração e a base sólida que sempre me manteve e ainda me mantêm em pé a cada dia.

Agradeço aos meus irmãos **Feline, Filipe e Elizabeth**, por estarem sempre presentes, por ouvirem meus desabafos e por despertarem em mim sentimentos múltiplos concomitantes. Obrigada pelas brigas e desavenças, elas são as experiências que nos fazem crescer e amadurecer. Obrigada pelo amor e cuidado, porque eu sei que pode acontecer o que for, seremos sempre uns pelos outros. Obrigada pelo investimento e pelo exagero em sempre acreditarem no meu potencial. Eu amo vocês mais do que eu imaginava.

Agradeço a maior riqueza da minha vida, **Eduarda Beltrami**, que me ensinou o amor Cristo. Esse amor que se entrega, que se doa, que abre mão de si pelo outro. Minha maior convicção é que se preciso fosse eu entregaria a minha vida por você. Obrigada por ser tão carinhosa, tão educada, tão gentil e tão amável. Quando você nasceu eu entendi o que era viver o melhor de Deus. Você foi um presente enviado por ele para nós cuidarmos e amarmos. Você é a jóia perfeita que dá brilho a minha vida e a coisa mais gostosa que existe. Desde o seu primeiro choro eu soube que você seria minha maior alegria e a cada sorriso seu eu sou feliz por você existir. Há três anos eu sou a tia mais coruja que existe e isso nunca vai mudar. Eu te amo do fundo do meu ser, minha princesa.

Agradeço à minha orientadora, **Dra Silvia Rogatto**, por cada segundo dedicado, pelas experiências compartilhadas e pelo convívio diário. Eu agradeço a Deus pelo nosso encontro, pela oportunidade de ter te conhecido e por hoje fazer parte desse time. De longe foi a minha melhor decisão. Embora em palavras seja difícil expressar tamanha gratidão, o sentimento de alegria e paz que eu vivo hoje transborda. Doutora, obrigada especialmente por ter acreditado em mim quando eu mesma não acreditava e por me mostrar que eu posso ir além. Obrigada pela rigidez e exigências que me fazem crescer, amadurecer, pensar e evoluir. Obrigada por sempre esperar mais e cobrar mais de nós, eu vejo isso como sinal de amor e cuidado. Você é sem dúvidas, um espelho o qual eu espero um dia refletir. Obrigada por tudo!

Agradeço à minha co-orientadora, **Dra Hellen Kuasne**, primeiramente por ter me aceitado como sua aluna, abraçado o projeto e pelas horas abdicadas em prol deste estudo. Eu agradeço a Deus por ter sido tão bom comigo nesse tempo todo. Eu não tenho dúvidas de que Ele sempre tem o melhor para cada um de nós e ao ver onde estou hoje eu reconheço esse cuidado e amor que vem Dele. Você é a expressão do amor de Deus. Eu agradeço não apenas pela co-orientação, mas pela pessoa excepcional que

você é, pelo coração grande que você tem, pela sua inteligência, sabedoria e bom humor. Obrigada por cada ensinamento acadêmico e pessoal, pela disposição em me ouvir, pelos conselhos, pela paz transmitida e por sempre tornar tudo tão mais simples. Estudar ciência com você é mais confortável, parece que não importa o quanto eu não saiba, você vai me ensinar com tanto amor e ânimo que torna tudo mais claro, e isso é incrível. Obrigada por cada desenho, por cada aula, por cada discussão, por cada cobrança e pelas várias correções. Eu não encontro palavras que expressem o quanto você significa para mim e muito menos para agradecer pelo feito até aqui. Obrigada pela paciência infindável, você é uma pessoa rara!

Agradeço à **Débora Aparecida Rodrigues** pelas melhores aulas de toda minha graduação, por ser sempre tão empolgada com a ciência e por ter me levado a redescobrir a beleza, curiosidade e complexidade de uma molécula tão pequena como o DNA. Obrigada por ter me instigado e contribuído em muito para eu estar onde estou hoje, talvez sem você isso não seria possível. Obrigada por sempre me ajudar e apoiar os meus sonhos.

Agradeço à **Priscila Randazzo de Moura** por ter sonhado os meus sonhos comigo e me incentivado a lutar por eles. Obrigada pela chefe que você foi, pela pesquisadora de excelência que você se tornou, pela pessoa incrível que você é e pelo caráter inigualável que você tem. Obrigada por me ensinar sobre liderança, como transmitir conhecimento, a valorizar a vida em todas as suas formas e cuidar de cada uma delas. Obrigada pelas muitas vezes que você abriu mão de seu tempo apenas para me ouvir e aconselhar, mesmo sem perceber você sempre me estimulou a sonhar alto e ir além. Eu gostaria de deixar registrado o quanto você tocou a minha vida e expressar minha admiração, gratidão e respeito por você. Muito obrigada!

Agradeço à **Equipe Neogene** pela parceria. Obrigada pela forma como vocês conseguem conduzir o grupo, pelas conversas, discussões, empenho

e dedicação. Obrigada por não olharem apenas para si próprios, mas sempre para o próximo buscando contribuir de alguma maneira. Sem o auxílio, respaldo e contribuição de vocês este estudo não passaria de um projeto.

Agradeço especialmente ao **Mateus** pelo empenho, pelas análises e disposição em sempre me ajudar, ensinar e escutar, à **Mariana** pela colaboração desde o início e por dividir cada momento de preocupação, desespero, ansiedade e alegria que esse projeto nos causou, e ao **Fábio** pelo coração enorme, bondade, humildade, por não ter desistido e por ter me ensinado tanto.

Agradeço aos **colegas do CIPE** pelos momentos compartilhados, risadas e cafés. Em especial à **Karina** e ao **Kelvin** que ao longo deste período contribuíram em diversas áreas da minha vida. Obrigada por cada conversa, por cada conselho, por me entenderem tão bem e não precisarem nem de palavras para saber como me sinto. Obrigada por vocês serem tão pacientes comigo e me ensinarem a ser uma pessoa melhor. Vocês sem dúvidas facilitaram o processo, obrigada por tudo!

Agradeço aos amigos que adquiri ao longo da vida, em especial a **NATA**, pela amizade que construímos e fortalecemos com o tempo. Obrigada pela paciência, pelo apoio em cada circunstância, pela parceria, por estarem sempre presente mesmo estando longe, pelas histórias que vivemos juntas e pelo prazer da companhia de vocês. Cada encontro nosso é tão bom e natural que parece que ainda vivemos juntas todos os dias. Obrigada por fazerem de cada momento único e especial. Conhecer vocês foi uma dádiva de Deus e permanecer com vocês nessa caminhada tem sido um privilégio para mim. Obrigada por serem as melhores em tudo!

Agradeço ao **Dr. Luiz Paulo Kowalski, Zdenko Herceg e Srikant Ambatipudi** pela colaboração e parceria neste projeto, por compartilharem o

conhecimento e serem tão prestativos.

Agradeço ao **Dr. Antonio Hugo Campos**, ao **Departamento Patologia**, aos **pesquisadores e funcionários do CIPE**, à **Biblioteca** e à **Pós-Graduação**.

Agradeço o apoio financeiro das agências de fomento **CAPES, CNPq, FAPESP** e **INCITO** – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Oncogenômica (FAPESP-CNPq).

RESUMO

Beltrami CM. **Análise do metiloma em carcinomas papilíferos de tireoide**. São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O carcinoma papilífero de tireoide (CPT) representa 85% dos casos de carcinomas da tireoide. A mutação *BRAFV600E* é descrita em 45% dos CPTs estando relacionada ao grau de agressividade tumoral e a um pior prognóstico. Embora o papel oncogênico de *BRAF* na proliferação celular, sobrevivência e desdiferenciação tumoral seja bem estabelecido, ainda é pouco compreendida sua relação como modificador de perfis de metilação do DNA em genes supressores tumorais. O perfil de metilação do DNA foi realizado em 42 amostras de CPT pareadas com o tecido adjacente não tumoral. O papel da mutação *BRAFV600E* neste processo também foi investigado, assim como os resultados da expressão gênica de um estudo prévio do grupo. Foi utilizada para esta proposta a plataforma *Infinium® Human Methylation450 BeadChip* (Illumina, San Diego, CA, USA). Alterações nos padrões de metilação foram observados em 4265 genes, sendo a maioria hipometilados em relação ao tecido não tumoral adjacente. Uma análise integrada entre os dados de metilação e de expressão gênica (resultante de outro estudo nas mesmas amostras) revelou 299 genes com correlação inversa. Os genes com níveis de metilação e de expressão alterados foram confirmados por análises *in silico* utilizando amostras de CPT do consórcio *The Cancer Genome Atlas*. Estas alterações foram submetidos a análises de vias e redes gênicas (*software* IPA e KOBAS) revelando as vias de sinalização de PDGF e de FGF como as principais envolvidas em PTC. Os genes *GABRB2*, *ERBB3*, *HMGA2*, *DNMT1* e *SOX14* foram avaliados e validados na análise de expressão (RT-qPCR) e metilação (pirosequenciamento) em amostras dependentes e independentes dos *arrays*. A metilação alterada do *GABRB2* foi associada com o tamanho tumoral e a presença da mutação *BRAFV600E*. Os achados deste estudo

mostraram que a presença da mutação *BRAFV600E* parece modificar o perfil de metilação do DNA. Alterações nos níveis de metilação de *DNMT1* e *SOX14* parecem estar envolvidas na tumorigênese da tireoide. As alterações em *HMGA2* e *ERBB3* confirmaram dados da literatura e do *GABRB2* revelou uma associação com pior prognóstico demonstrando seu papel como potencial biomarcador molecular.

SUMMARY

Beltrami CM. **[Methylome analysis of papillary thyroid cancer]**. Sao Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Papillary thyroid cancer (PTC) accounts for approximately 85% of all thyroid malignancies. The *BRAFV600E* mutation is described in 45% of PTCs and has been related to tumor aggressiveness and also with poor prognosis. Although the oncogenic involvement of the *BRAF* mutation in cell proliferation, survival and tumor dedifferentiation is well established, the association of this alteration as modifier of DNA methylation profile in tumor suppressor genes is poorly understood. DNA methylation profile was performed in 42 PTC and adjacent non-tumoral tissue samples. The role of *BRAF* mutation in this process was also investigated, as well the results of gene expression obtained from our previous study. To this purpose, the Infinium® Human Methylation450 BeadChip platform (Illumina, San Diego, CA, USA) was used. Abnormal methylation patterns were observed in 4,265 genes; most of the probes were hypomethylated compared to non-tumoral adjacent tissue. An integrative analysis between methylation and expression data (from our previous study) revealed 299 genes with inverse correlation. The genes with alterations in methylation and expression levels were further confirmed by *in silico* analysis using PTC data from The Cancer Genome Atlas Consortium. In addition, the data were submitted to pathway and network analysis (software IPA and KOBAS) revealing PDGF and FGF signaling pathways as the most relevant alterations. *GABRB2*, *ERBB3*, *HMGA2*, *DNMT1* and *SOX14* genes were selected and validated by gene expression (RT-qPCR) and DNA methylation analysis (pyrosequencing) in an array-dependent and independent set of samples. Altered *GABRB2* methylation pattern was associated with tumor size and *BRAFV600E*. Our data suggest that *BRAF* mutation modify the DNA methylation profile. Alteration of DNA methylation pattern of *DNMT1* and *SOX14* genes seems to

be involved in thyroid tumorigenesis process. Alterations in both, methylation and expression of the *HMGA2* and *ERBB3* genes confirmed previous data of the literature. *GABRB2* gene showed an association with poor prognosis and has the potential to be used as a molecular biomarker.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via MAPK associada ao câncer de tireoide.....	9
Figura 2	Processo de metilação do DNA em células normais e tumorais.....	14
Figura 3	Pirograma representativo do controle positivo.....	43
Figura 4	Desenho do estudo ilustrando todas as abordagens utilizadas.....	47
Figura 5	HeatMap indicando as 11.302 sondas diferencialmente metiladas nas amostras de CPT em relação ao tecido normal adjacente.....	49
Figura 6	Representação da distribuição genômica do contexto CpG da plataforma InfiniumHuman Methylation450K (Illumina) e das sondas identificadas com metilação diferencial neste estudo.....	51
Figura 7	Representação da distribuição no contexto CpG das 11.302 sondas com metilação diferencial.....	52
Figura 8	Estratégia utilizada para realização da análise integrada dos dados de metilação e expressão gênica (CPT <i>versus</i> TN).....	55
Figura 9	Análise de agrupamento não supervisionado.....	57
Figura 10	Ilustração das vias de sinalização potencialmente ativadas em CPT.....	62

Figura 11	Confirmação dos achados pelo método de pirosequenciamento (A) e RT-qPCR (B).....	66
Figura 12	Associação entre o perfil de metilação e a expressão de <i>GABRB2</i> com a presença de mutação em <i>BRAF</i> e tamanho do tumor primário.....	67
Figura 13	Estratégia utilizada para a realização da análise integrada dos dados de metilação e expressão do estudo na comparação <i>BRAF</i> WT e <i>BRAF</i> V600E.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Perfil clínico-patológico de 42 pacientes com CPT selecionados para o estudo.....	25
Tabela 2	Critérios utilizados para seleção de genes para validação...	36
Tabela 3	As 20 principais sondas hipometiladas e hipermetiladas, respectivamente, nas amostras de CPT.....	53
Tabela 4	Vinte principais sondas diferencialmente metiladas e genes diferencialmente expressos obtidos da análise integrada e confirmados como alterados pelo banco de dados TCGA.....	56
Tabela 5	Principais vias canônicas alteradas em CPT identificadas pelo programa IPA e KOBAS.....	59
Tabela 6	Sondas diferencialmente metiladas e genes diferencialmente expressos obtidos da análise integrada de <i>BRAF</i> e confirmados com dados do TCGA.....	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Dados em literatura sobre as alterações epigenéticas em carcinomas de tireoide.....	15
Quadro 2	Relatos da literatura utilizando métodos de análise global do metiloma em carcinomas de tireoide.....	20
Quadro 3	Grupos de amostras selecionados para validação.....	36
Quadro 4	Sequências e propriedades dos iniciadores avaliados para a metilação alvo-específica por pirosequenciamento.....	40
Quadro 5	Principais genes alterados nas vias MAPK e PI3K.....	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5mC	5 metil citosina
AFT	Adenoma Folicular de Tireoide
ATM*	Anti-Stain Two-color Master Mix
ATP	Adenosina Trisfosfato
BMIQ*	Beta Mixture Quantile Normalization
BRAF*	Human v-raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1
BRAFV600E	Mutação V600E no gene <i>BRAF</i>
BRAFWT*	BRAF wild-type
CAT	Carcinoma Anaplásico de Tireoide
cDNA*	Complementary DNA
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFT	Carcinoma Folicular de Tireoide
cm	Centímetro
CMT	Carcinoma Medular de Tireoide
COBRA*	Combined Bisulfite Restriction Analysis
CpG	Citosina-fosfato-Guanina
CPT	Câncer Papilífero de Tireoide
CT	Câncer de Tireoide
DMP*	Differentially Methylated Positions
DNA*	Deoxyribonucleic Acid
dNTP*	Deoxynucleotide Triphosphates
DTT*	Dithiothreitol
EDTA*	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
Exp	Expressão
FC*	Fold Change
FDR*	False Discovery Rate
FMS*	Fragmentation solution
GTP	Guanosina Trifosfato
hg*	Human genome

HRAS*	Human v-Ha-ras Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
IC	Intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPA*	Ingenuity Pathways Analysis
kB	Kilobase
KOBAS*	KEGG Orthology Based Annotation System
KRAS*	Human v-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
LBT	Lesões Benignas de Tireoide
MA1*	Multi-Sample Amplification 1 Mix
MAF*	Minor Allele Frequency
MAPK*	Mitogen Activated Protein Kinase
mCPT	Microcarcinoma Papilífero de Tireoide
MDS*	Multidimensional scalingplot
Metil	Metilação
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
MSM*	Multi-Sample Amplification Master Mix
MS-MLPA*	Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MS-PCR*	Methylation Specific PCR
Ni	Não Informado
NRAS*	Human Neuroblastoma Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
NT	Nódulos da Tireoide
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
pb	Pares de base
PB2*	Humidifying buffer
PCA*	Principal Component Analysis
PCR*	Polymerase Chain Reaction

PI3K*	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PM1*	Precipitation solution
PTC*	Papillary Thyroid Cancer
QMSP*	Quantitative Methylation Specific PCR
RA1*	Resuspension, hybridization and wash solution
Re	Recidiva
RET*	Proto-oncogene Ret
RI	Radioiodo
RNA*	Ribonucleic Acid
rpm	Rotações por minuto
RPM*	Random Primer Mix
RT-qPCR*	Reverse Transcription – quantitative PCR
Seq	Sequenciamento
SNP*	Single-nucleotide polymorphism
STM*	Superior Two-color Master Mix
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TCGA*	The Cancer Genome Atlas
TEM*	Two-color Extension Master Mix
TK*	Tyrosine Kinase
TN	Tecido tireoidiano não tumoral
TP	Tireoidectomia Parcial
TSH*	Thyroid-stimulating Hormone
TSS*	Transcription start site
TT	Tireoidectomia Total
U	Unidade
US	Ultra-sonografia
UTR*	Untranslated region
vcCPT	Variante clássica de CPT
vdeCPT	Variante difusa esclerosante de CPT
vfCPT	Variante folicular de CPT
XC1*	XStain Bead Chip solution 1

XC2* XStain Bead Chip solution 2

XC3* XStain Bead Chip solution 3

XC4* XStain Bead Chip solution 4

*siglas ou abreviaturas derivadas do inglês

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de tireoide (CT)	3
1.2	Câncer papilífero de tireoide (CPT)	5
1.3	Alterações genéticas no câncer de tireoide	7
1.4	Alterações epigenéticas no câncer de tireoide	11
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo Geral	22
2.2	Objetivos Específicos	22
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	23
3.1	Casuística	23
3.2	Processamento das amostras para análise do perfil de metilação do DNA	26
3.2.1	Extração de DNA	26
3.2.2	Detecção da mutação V600E em <i>BRAF</i> , <i>KRAS</i> (Códon 12/13), <i>HRAS</i> (Códon 61) e <i>NRAS</i> (Códon 61) e inversão <i>RET/PTC</i>	26
3.3	Análise do perfil de metilação do DNA	27
3.3.1	Modificação do DNA por bissulfito de sódio	27
3.3.2	Ensaio de <i>microarray</i>	28
3.4	Análise dos dados de <i>microarray</i>	32
3.4.1	Controle de qualidade dos dados brutos	32
3.4.2	Análise de sondas diferencialmente metiladas	33
3.4.3	Seleção das amostras e genes para validação	34
3.5	Comparação com dados externos (TCGA)	37
3.6	Análise integrada dos dados de metilação com os de expressão de transcritos	38
3.7	Análise de metilação alvo específica por pirosequenciamento	38
3.8	Processamento das amostras para análise de expressão gênica	43

3.9	Confirmação dos achados com os dados clínicos e histopatológicos.....	47
4	RESULTADOS.....	48
4.1	Análise dos dados de metilação: comparação entre as amostras tumorais e normais.....	48
4.2	Comparação com dados externos (TCGA).....	54
4.3	Análise integrada.....	54
4.4	Predição <i>in silico</i> de vias alteradas em carcinoma papilífero de tireoide.....	58
4.5	Genes alterados em CPT e relacionados com as vias MAPK e PI3K.....	63
4.6	Confirmação dos achados.....	64
4.6.1	Ensaio de metilação alvo-específica por Pirosequenciamento e RT-qPCR.....	64
4.6.2	Associação dos achados com dados clínicos e histopatológicos.....	66
4.7	Análise do perfil de metilação de acordo com a mutação V600E em <i>BRAF</i>	68
5	DISCUSSÃO.....	71
6	CONCLUSÃO.....	89
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	91

ANEXOS

- Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP
- Anexo 2** Metodologia utilizada para a detecção da mutação em *BRAFV600E*, *KRAS* (códon 12/13), *HRAS* (códon 61) e *NRAS* (códon 61).
- Anexo 3** Metodologia utilizada para a detecção das inversões RET/PTC1 e RET/PTC3.

- Anexo 4** Análise de agrupamento não supervisionado resultantes da análise de metilação.
- Anexo 5** Lista de sondas diferencialmente metiladas.
- Anexo 6** Lista de sondas diferencialmente metiladas confirmadas pelo banco de dados TCGA.
- Anexo 7** Resultados obtidos da análise de pirosequenciamento dos dinucleotídeos presentes nas regiões ricas em CpGs .
- Anexo 8** Sondas diferencialmente metiladas encontradas na análise integrada presente especialmente em corpo de genes e possivelmente associada com outras regiões.

1 INTRODUÇÃO

A tireoide é uma glândula endócrina cuja função é sintetizar, armazenar e liberar na corrente sanguínea os hormônios tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), os quais controlam a taxa de metabolismo do corpo. Esse órgão é extremamente vascularizado por uma extensa rede capilar e linfática que cerca os folículos que o compõe (DELELLIS e NIKIFOROV 2009).

Os principais reguladores da glândula tireoide são os hormônios tireotrópicos (TSH ou tireotropina) que são secretados pela hipófise e se ligam aos receptores na membrana celular da porção basal das células foliculares. O TSH estimula todas as etapas da produção de hormônios da tireoide, que por sua vez respondem a esse estímulo com um *feedback* negativo, ou seja, inibindo a síntese do TSH afim de estabelecer um equilíbrio que mantém o organismo com quantidades adequadas de T3 e T4 (DELELLIS e NIKIFOROV 2009).

Dentre as possíveis alterações na glândula da tireoide, é comum encontrar nódulos que são, em geral, pequenos e não aparentes (GHARIB e PAPINI 2007). Os nódulos palpáveis são encontrados em aproximadamente 7% da população adulta, principalmente em mulheres, enquanto as glândulas clinicamente normais, quando avaliadas por ultrassonografia, apresentam lesões focais em até 50% dos casos (SYRENICZ et al. 2014). Devido a sua alta prevalência não é economicamente viável ou clinicamente

necessário realizar uma avaliação estrutural e funcional completa para todos ou para a maioria dos nódulos tireoidianos, mesmo porque a maioria é de natureza benigna (GHARIB e PAPINI 2007; SYRENICZ et al. 2014).

O padrão ouro para a investigação diagnóstica inicial de nódulos tireoidianos é a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) guiada por US. A utilização simultânea desses métodos aumenta a precisão do diagnóstico, pois permite a visualização do local e do tamanho do nódulo a ser puncionado para posterior avaliação citológica (CRAMER 2000; RAVETTO et al. 2000; GILES et al. 2015). Além disso, a PAAF é uma técnica simples, segura e de baixo custo (SYRENICZ et al. 2014).

A avaliação citológica é baseada na classificação internacional de Bethesda a qual inclui seis categorias diagnósticas de acordo com o risco para doenças malignas, sendo I: Não diagnóstico/Insatisfatório, II: Benigno, III: Atipia de significado indeterminado/Lesão folicular de significado indeterminado, IV: Neoplasia folicular/Suspeito para neoplasia folicular, V: Suspeito para malignidade e VI: Maligno (CIBAS e ALI 2009).

Os resultados da PAAF são geralmente utilizados em conjunto com achados clínicos para orientar a conduta clínica (ELSHEIKH et al. 2009). Embora a maioria dos nódulos seja diagnosticado como benigno, 15 a 30% dos casos são classificados como indeterminados (grupos III, IV e V), e nestes casos é recomendada a realização da cirurgia mesmo que ao diagnóstico citológico pós-operatório a maioria das lesões seja detectada como benigna (GHARIB e PAPINI 2007; COOPER et al. 2009). Nestes casos os pacientes foram desnecessariamente submetidos aos riscos da

cirurgia e necessitarão de reposição do hormônio tireoidiano por toda vida. Por essa razão, é essencial desenvolver uma estratégia de baixo custo para o diagnóstico de nódulos com potencial maligno ou malignos não detectáveis por métodos PAAF, a fim de evitar cirurgias desnecessárias.

Os fatores clínicos associados com o aumento de risco para lesões malignas incluem a exposição à radiação ionizante, idade, sexo feminino e deficiência de iodo (KONDO et al. 2006; GHARIB e PAPINI 2007). Como exemplo, o acidente nuclear em Chernobyl ocorrido em 1986 expôs milhões de pessoas a partículas radioativas e foi observado um aumento na incidência do câncer de tireoide, principalmente em crianças (WILLIAMS 2008). Além disso, o amplo uso da radiação na terapia médica tem sido associado a esse aumento no risco de desenvolvimento do câncer (NIKIFOROV e NIKIFOROVA 2011).

1.1 CÂNCER DE TIREOIDE (CT)

O câncer de tireoide é o mais comum da região da cabeça e pescoço e é a neoplasia endócrina de maior incidência na população humana (NIKIFOROV e NIKIFOROVA 2011; SIEGEL 2014). Ao longo das últimas décadas tem-se notado, na maioria dos países, um aumento em torno de 1% ao ano na incidência deste câncer (GARCÍA-JIMÉNEZ e SANTISTEBAN 2007). No Brasil esta neoplasia já corresponde a aproximadamente 3% dos casos de câncer em mulheres, sendo o quinto com maior incidência no sexo feminino (Ministério da Saúde 2014).

Acredita-se que esse aumento na incidência seja devido a maior sensibilidade dos métodos de detecção da doença e a melhor caracterização dos critérios histopatológicos aplicados ao diagnóstico (NIKIFOROV e NIKIFOROVA 2011). Corroborando com essa hipótese, DAVIES e WELCH (2014) observaram que apesar do aumento da incidência do câncer de tireoide, a taxa de mortalidade se manteve estável. Praticamente todo o aumento da detecção do câncer de tireoide foi restrito a um tipo tumoral com características histológicas menos agressivas (câncer papilífero de tireoide) e com tamanho inferior a 2 cm (87% dos casos).

Os tumores de tireoide podem surgir a partir de dois tipos celulares de diferentes origens embrionárias: as células foliculares e as células parafoliculares ou células C (KONDO et al. 2006). Os diferentes tipos de tumores são classificados de acordo com sua histologia, sendo os derivados das células foliculares subdivididos em carcinomas bem diferenciados (papilífero e folicular), carcinomas mal diferenciados (insular) e carcinomas não diferenciados (anaplásico) e os derivados das células C representados pelo carcinoma medular (RODRÍGUEZ-RODERO et al. 2013; XING et al. 2013).

Existem também os tumores benignos da tireoide, que são os adenomas foliculares, bócio multinodulares, cistos e tireoidites crônicas (WANG et al. 2011). Os adenomas foliculares são muitas vezes precursores para os carcinomas foliculares (NIKIFOROV e NIKIFOROVA 2011) e a maior dificuldade é distingui-los citologicamente, pois são bastante semelhantes e, por isso, frequentemente agrupados como neoplasias foliculares

indeterminadas ou suspeitas. Neste caso, é necessária a realização do exame histológico para que seja possível diferenciá-los (SHERMAN 2003).

As células foliculares são responsáveis pela maioria dos tumores de tireoide abrangendo mais de 90% das neoplasias, representados principalmente pelos carcinomas bem diferenciados (XING 2013). Esses carcinomas são relativamente indolentes, podem ser efetivamente removidos com ressecção cirúrgica (tireoidectomia total ou parcial) e se necessário, posteriormente, o paciente pode ser tratado com terapia adjuvante com iodo radioativo (¹³¹I) (KONDO et al. 2006). Em geral, apresentam bom prognóstico e quando os pacientes são diagnosticados e tratados no estágio inicial da doença apresentam sobrevida comparável com a da população normal, sem sequelas ou alteração significativa na qualidade de vida (WARD et al. 2007).

1.2 CÂNCER PAPILÍFERO DE TIREOIDE (CPT)

Dentre os carcinomas bem diferenciados, os papilíferos são os mais frequentes e compreendem cerca de 85% dos casos (KARATZAS et al. 2013; XING 2013). Esses tumores podem surgir de nódulos antigos não tratados e são facilmente distinguidos dos demais tipos tumorais (MAITRA e ABBAS et al. 2005).

As características arquitetônicas incluem a presença de aglomerados papilares firmemente coesos de células neoplásicas, morfologia nuclear representada por núcleos volumosos e alongados, com aglomeração,

sobreposição de cromatina dispersa e invaginações do citoplasma (AL-BRAHIM e ASA 2006, ELSHEIKH et al. 2009).

As lesões papilíferas podem se apresentar de forma única ou multifocal, restrita e até mesmo encapsulada, embora a maioria seja infiltrativa do parênquima adjacente e apresente margens mal definidas (MAITRA e ABBAS et al. 2005). As metástases ocorrem por meio dos vasos linfáticos da tireoide para os linfonodos regionais e, menos frequentemente, para os pulmões (SCHLUMBERGER et al. 1998). Metástases fora da região do pescoço são menos frequentes (5-7%) (LIVOLSI 2011). Embora os CPT em geral apresentem bom prognóstico, uma pequena parte deles é agressiva, podendo recidivar e mesmo levar o paciente a óbito (SCHLUMBERGER et al. 1998, KONDO et al. 2006; MAZZAFERRI 2006; WARD et al. 2007).

Entre as características clínico-patológicas consideradas de alto risco estão a idade avançada ao diagnóstico, tamanho do tumor primário, invasão extratireoidiana, metástase linfonodal, metástase a distância e estágios avançados da doença (SECCO e CARVALHO 2010).

Os subtipos histológicos dos carcinomas papilíferos são fatores importantes a serem considerados na avaliação do risco. A variante de células altas é considerada a forma mais agressiva, a variante clássica é intermediária e a folicular é a menos agressiva (HU et al. 2006). Os critérios de agressividade também são válidos para os microcarcinomas (<1cm) (MAZZAFERRI 2006).

RAHBARI et al. (2010) relataram uma associação entre o gênero dos pacientes e a agressividade de CPT, sendo que o tumor tende a ser mais agressivo em pacientes do gênero masculino. Outros autores JARZAB e HANDKIEWICZ-JUNAK (2007); IYER e SHAHA (2010) relataram que pacientes diagnosticados entre 21 e 45 anos têm baixo risco de apresentar metástases, enquanto aqueles com idade superior a 45 anos têm maior probabilidade de metástases à distância, invasão extratireoidiana e principalmente metástases linfonodais.

1.3 ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO CÂNCER DE TIREOIDE

Há evidências indicando que a origem e a progressão do câncer de tireoide ocorrem pelo acúmulo gradual de várias alterações genéticas e epigenéticas, incluindo a ativação e a inativação de genes por mutações somáticas, alterações no padrão de expressão gênica e nos perfis de metilação do DNA (BAYLIN e JONES 2011; NIKIFOROV e NIKIFOROVA 2011; GOMBERAWALLA e ELARAJ 2014).

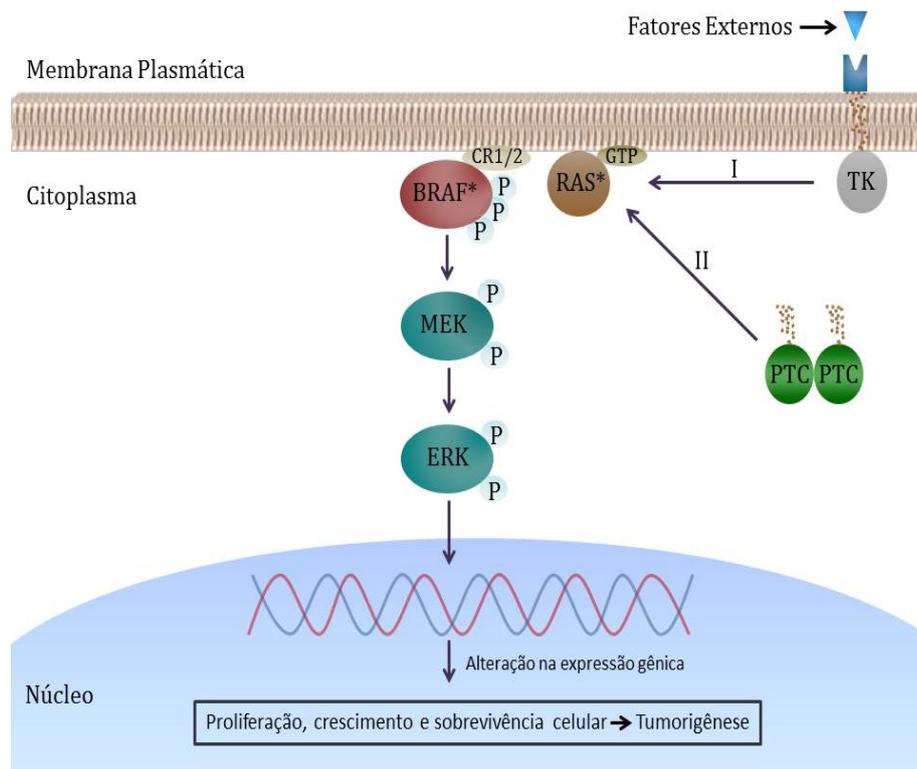
O câncer de tireoide frequentemente tem alguns genes críticos mutados por meio de dois mecanismos moleculares distintos: mutação em ponto ou rearranjo cromossômico (NIKIFOROV e NIKIFOROVA 2011; BANSAL et al. 2013). Estas alterações ativam de forma aberrante uma das duas principais vias de sinalização envolvidas na carcinogênese da tireoide, as quais são responsáveis por regular os processos celulares (GOMBERAWALLA e ELARAJ 2014).

As principais vias de sinalização alteradas em câncer de tireoide estão associadas à tirosina quinase e incluem a MAPK (*mitogen activated protein kinase*) e a PI3K (*phosphatidyl inositol-3-kinase*) (XING et al. 2013). Alterações nessas vias levam à desestruturação da organização celular e a perda de controle da proliferação, desencadeando assim o processo de carcinogênese (GRIFFITHS et al. 2008).

Nos carcinomas bem diferenciados a principal via de sinalização ativada por alterações genéticas é a MAPK (KONDO et al. 2006). Essa via tem um papel fundamental na regulação da proliferação, diferenciação, apoptose e sobrevivência celular (XING 2007a).

A ativação da MAPK é desencadeada por uma variedade de fatores externos por meio de seus receptores na membrana celular (XING 2007a). Em células normais, a ativação da proteína Raf quinase (serina/ treonina) (BRAF no esquema abaixo) ocorre pela ligação de Ras ao GTP, uma pequena proteína G ligada à membrana. Em seguida, Raf fosforila e ativa a proteína quinase MEK (serina/ treonina), que também fosforila e ativa ERK. A ERK ativada fosforila proteínas reguladoras no núcleo e altera a expressão gênica com consequentes alterações nas atividades biológicas da célula (NIKIFOROV 2008). A Figura 1 é representativa da ativação da via MAPK.

A ativação aberrante da via MAPK ocorre por mutações ativadoras nos genes *RAS* e *BRAF* e por meio do rearranjo *RET-PTC* (KONDO et al. 2006; BANSAL et al. 2013; XING et al. 2013).



Fonte: Esquema modificado baseado em FUSCO et al. (2005).

Figura 1 - Via MAPK associada ao câncer de tireoide. A via MAPK é estimulada por fatores exógenos que ativa um receptor tirosina quinase (TK) na membrana das células. I – A proteína RAS se liga a uma proteína GTP ligada à membrana e ativa a proteína BRAF. BRAF fosforila e ativa MEK que consequentemente fosforila e ativa ERK. A ERK ativada entra no núcleo e regula a transcrição de diversos genes relacionados à proliferação, crescimento e sobrevivência celular. *Mutações em ponto podem ocorrer em RAS e em BRAF, nesse caso a via permanece ativada constitutivamente e a ERK ativada regula positivamente oncogenes e diminui a expressão de genes supressores tumorais. II – A rearranjo RET/PTC também pode ativar constitutivamente a via MAPK.

Uma mutação em ponto do tipo *missense* localizada no éxon 15 do gene *BRAF* (cromossomo 7), é a causa mais frequente de ativação aberrante da via MAPK em cânceres humanos (DAVIES et al. 2002; WAKASA et al. 2014). Esta mutação é caracterizada pela troca de uma timina por uma adenina (T1799A), levando à substituição do aminoácido valina pelo ácido glutâmico na porção terminal da proteína RAF (V600E), resultando em uma proteína mutante (XING 2005). Esta mutação, ativa permanentemente a enzima BRAF quinase com a inserção de um resíduo com carga elétrica negativa adjacente a um sítio de fosforilação (Ser599), rompendo assim o seguimento de ativação na alça de ligação com o ATP que mantinha a conformação inativa (HUBBARD 2004).

A alteração V600E é responsável por 99% das mutações em *BRAF* encontradas nos carcinomas de tireoide (WITT et al. 2013) e ocorre em aproximadamente 45% dos CPT (XING 2005; GÓMEZ SÁEZ 2011). Segundo XING (2005), 17% dos CPT com citologia indeterminada podem ser diagnosticados pela análise da mutação em *BRAF*.

Quando esta mutação está presente não se sobrepõe à outras KIMURA et al. (2003); BANSAL et al. (2013) e parece ter maior prevalência nas variantes clássicas e de células altas, sugerindo uma associação entre a mutação e a agressividade do tumor (NIKIFOROVA et al. 2003; MACIEL et al. 2005).

A mutação em *BRAF* tende a ser mais frequente em adultos, portanto a idade do paciente no início de apresentação da doença também é um fator importante na determinação das alterações genéticas (MACIEL et al. 2005).

A alta prevalência e a especificidade da mutação no gene *BRAF* revela que esta alteração tem um papel patogênico fundamental no CPT. Alguns estudos sugerem que esta mutação tem importância no prognóstico do paciente, podendo estar associada com a invasão extratiroideana, metástase linfonodal, estágio avançado da doença e recorrência, além disso esta mutação tem sido relatada como um marcador diagnóstico em CPT (XING 2005; KIM et al. 2012; LI et al. 2012; BERTELLI et al. 2013). A mutação V600E tem sido associada com o padrão de metilação aberrante de vários genes supressores de tumor (RODRÍGUEZ-RODERO et al. 2013; XING 2007a). Segundo MANCIKOVA et al. (2013) e ELLIS et al. (2014) portadores da mutação em *BRAF* apresentam diferentes perfis de metilação do DNA quando comparados com amostras de CPT sem a mutação.

1.4 ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS NO CÂNCER DE TIREOIDE

Os eventos epigenéticos são alterações herdáveis capazes de modificar a expressão gênica sem afetar a sequência de nucleotídeos (EGGER et al. 2004). Eles desempenham um papel fundamental na regulação da expressão gênica e participam de vários processos biológicos importantes, em especial durante a embriogênese, inativação do cromossomo X e *imprinting* genômico (LAIRD 2003).

Os principais mecanismos epigenéticos incluem a metilação do DNA em dinucleotídeos CpG, as modificações covalentes das proteínas histonas

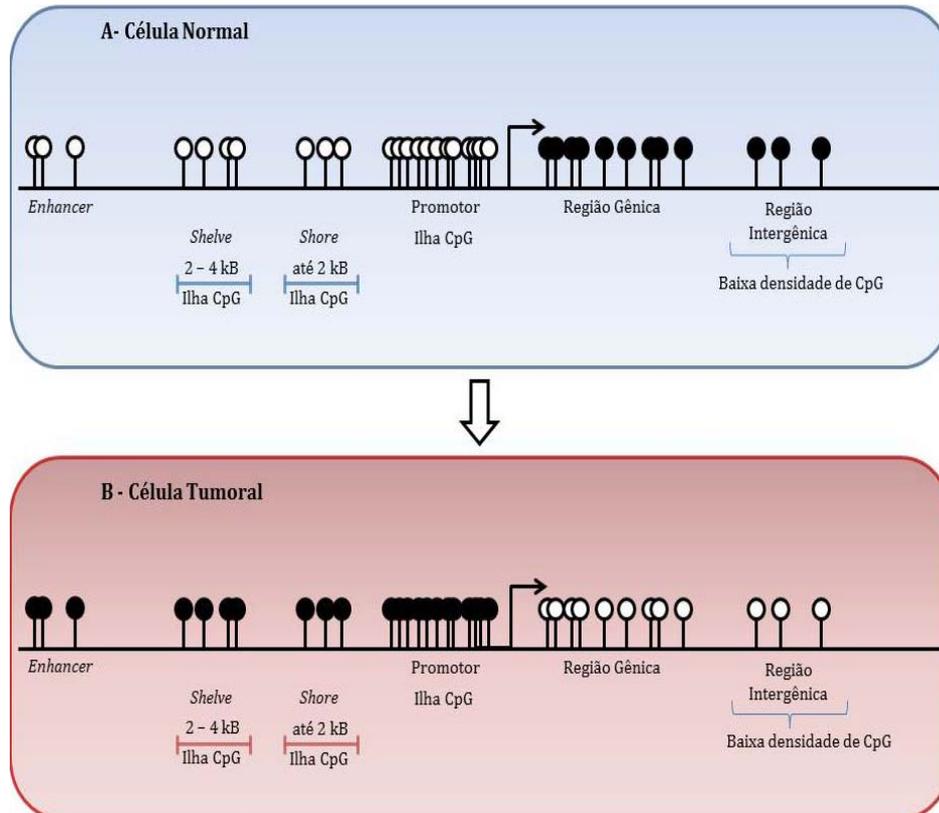
e a regulação por RNAs não codificantes, tais mecanismos atuam em conjunto para regular a expressão gênica (INBAR-FEINBERG et al. 2013).

O mecanismo epigenético mais estudado é a metilação do DNA, onde as enzimas DNA metiltransferases adicionam um grupo metil (CH_3) à quinta posição do carbono de uma citosina precedente de uma guanina, formando a 5-metilcitosina (5mC) (EGGER et al. 2004; HOQUE et al. 2005). Este é considerado um mecanismo de regulação da expressão gênica.

Existem aproximadamente 28 milhões de sítios CpG no genoma humano e a maior parte desses dinucleotídeos estão relacionados a regiões repetitivas do DNA. Entretanto os dinucleotídeos CpG também podem estar condensados em regiões não repetitivas, formando as “ilhas CpG” (STIRZAKER et al. 2014). Estima-se que 60% dos promotores de genes humanos apresentam ilhas CpG (ANTEQUERA 2003; NEPHEW e HUANG 2003). As ilhas CpG normalmente abrangem a região promotora dos genes e, de modo geral, permanecem não metiladas em células normais, permitindo a acessibilidade de fatores de transcrição e ativação da expressão gênica quando necessário (STIRZAKER et al. 2014). Por outro lado, quando há metilação nas ilhas CpG dentro de um promotor próximo ao sítio de início de transcrição, ocorre a repressão/silenciamento gênico por meio do bloqueio direto ou indireto da ligação dos fatores de transcrição ao DNA (XING 2007b). No genoma existem também os dinucleotídeos CpG espalhados e localizados principalmente em corpo de genes, regiões intergênicas, sequências repetitivas e transposons (IRIZARRY et al. 2009;

STIRZAKER et al. 2014), porém o papel biológico destes na regulação da expressão gênica ainda é discutido em literatura (JONES 2012).

O processo de metilação está estritamente relacionado à tumorigênese em humanos devido a interrupção dos mecanismos epigenéticos normais durante a iniciação e a progressão do câncer. É bem caracterizado que alterações nos mecanismos epigenéticos levam a inativação de genes supressores de tumor, ativação de proto-oncogenes e instabilidade cromossômica, incluindo ainda mudanças globais no perfil de metilação do DNA (JONES e BAYLIN 2007) (Figura 2). Portanto, a identificação de genes hipermetilados ou hipometilados pode conduzir à descoberta de marcadores importantes para a iniciação e a progressão tumoral, além de ser útil para o diagnóstico precoce e para a definição do tratamento (YOO e JONES 2006).



Fonte: Esquema baseado em STIRZAKER et al. (2014).

Figura 2 – Processo de metilação do DNA em células normais e tumorais. **A.** Processo de metilação que geralmente ocorre em células normais, nas quais é comum encontrar ilhas CpG não metiladas em regiões promotoras possibilitando assim a transcrição dos genes. **B.** Processo frequente em células tumorais, onde a hipermetilação na região promotora promove a repressão da transcrição gênica e hipometilação no corpo do gene.

O padrão de metilação do DNA alterado em determinados genes está diretamente ligado à ativação de importantes vias de sinalização no câncer de tireoide, contudo poucos estudos têm avaliado a metilação do DNA neste tipo de câncer, e os trabalhos descritos avaliaram, em geral, poucas amostras e com metodologias loci específicas (Quadro 1). Os genes alterados identificados nesses estudos foram associados com a agressividade tumoral, metabolismo de iodo, mutações genéticas em supressores tumorais, sendo que alguns deles são potenciais marcadores diagnósticos e prognósticos.

Quadro 1 - Dados em literatura sobre as alterações epigenéticas em carcinomas de tireoide.

GENES	MUTAÇÕES	Nº DE AMOSTRAS	METODOLOGIA	PRINCIPAIS RESULTADOS	REFERÊNCIA
-	<i>BRAF</i>	231 CPTs	QSMP	Hipermetilação: <i>TIMP3</i> , <i>DAPK</i> , <i>SLC5A8</i> e <i>RARβ2</i> (associados à agressividade do tumor e à mutação no gene <i>BRAF</i>)	HU et al. 2006
23 genes de reparo	<i>BRAF</i>	38 CPTs	MS-PCR	Hipermetilação: <i>hMLH1</i> , <i>PCNA</i> e <i>OGG1</i> (associados à invasão linfonodal), <i>hMLH1</i> (associado à mutação no gene <i>BRAF</i>)	GUAN et al. 2008
<i>ARHI</i> , <i>CDH1</i> , <i>KCNQ1</i> , <i>MEST</i> , <i>p16INK4A</i> , <i>RASSF1A</i> , <i>SLC5A8</i> , <i>VHL</i>	-	45 CPTs	MS-PCR e Seq.	Maiores níveis de metilação em genes regulados por <i>imprinting</i> (<i>ARHI</i> , <i>p16INK4A</i> , <i>MEST</i> e <i>KCNQ1</i>)	CZARNECKA et al. 2011
<i>TIMP3</i> , <i>SLC5A8</i> , <i>DAPK</i> e <i>RARβ2</i>	-	138 CPTs	QMS-PCR	Hipermetilação: <i>RARβ2</i> (associado ao tabagismo)	KISELJAK-VASSILIADES e XING 2011
-	<i>BRAF</i>	15NT, 44 LBT, 44 CT (27 CPT, 7CFT, 2 células Hürthle, 8 CMT)	QMS-PCR	Hipermetilação: <i>KIF1A</i> (14% CT). <i>AIM1</i> (um tumor) <i>NISCH</i> (NT e LBT) <i>TIMP3</i> , <i>RASSF1A</i> , <i>RARβ2</i> e <i>DCC</i> (portadores de mutação no gene <i>BRAF</i>)	BRAIT et al. 2012
<i>RUNX3</i>	-	5 NT, 4 linhagens (WRO, TPC1, K1 HTH74)	COBRA	Hipermetilação: <i>RUNX3</i> (WRO e TPC1, e em 10 CPTs)	KO et al. 2012

Cont/ Quadro 1

GENES	MUTAÇÕES	Nº DE AMOSTRAS	METODOLOGIA	PRINCIPAIS RESULTADOS	REFERÊNCIA
E-caderina	-	5 vdeCPTs e 7 CPTs	MS-PCR	Hipermetilação 60% das CPT e 71% das CPT	ROCHA et al. 2001
<i>RIZ1</i> <i>SOX17</i>	-	19 CPTs, 3vfCPTs, 5 CFTs, 3 células Hurthle, 1 anaplásico	MS-PCR	Hipermetilação: <i>RIZ1</i> e <i>SOX17</i> (Todas as amostras de PTC)	LAL et al. 2006
<i>RASSF1A</i> , <i>p16INK4A</i> , <i>TSHR</i> , <i>MGMT</i> , <i>DAPK</i> , <i>ERα</i> , <i>ERβ</i> , <i>RARβ</i> , <i>PTEN</i> , <i>CD26</i> , <i>RB</i> , <i>SLC5A8</i> , <i>UCHL1</i> , <i>DLC1</i> , <i>TIMP3</i> , <i>SLIT2</i> , <i>GSTP1</i>	-	13 CPTs, 10 CFTs, 9 CATs, 6 CMTs e 10 AFT	MS-PCR	<i>RASSF1A</i> , <i>p16INK4A</i> , <i>TSHR</i> , <i>MGMT</i> , <i>DAPK</i> , <i>ERα</i> , <i>ERβ</i> , <i>RARβ</i> , <i>PTEN</i> , <i>CD26</i> , <i>SLC5A8</i> e <i>UCHL1</i> metilado em CAT	SCHAGDARSURENGIN et al. 2006
<i>CITED1</i>	<i>BRAF</i>	19 CPTs	Seq.	Aumento de expressão associada a hipometilação	SASSA et al. 2011
<i>TEMS1</i>	-	40 CPTs	MS-PCR	Hipermetilação: <i>TEMS1</i> (33% das amostras)	SIRAJ et al. 2011
24 Genes supressores tumorais	-	11 CPTs e 2 CFTs	MS-MLPA e MS-PCR	Hipermetilação: <i>CASP8</i> , <i>RASSF1</i> e <i>NIS</i>	STEPHEN et al. 2011
-	-	63 CPT, 10 NT, 2 linhagens (TPC-1 e SW579)	MS-PCR	Perda de expressão e hipermetilação: <i>SOX17</i> (TPC-1). Hipermetilação: <i>SOX17</i> (60,3% das amostras de CPTs)	LI et al. 2012
<i>ZIC1</i>	-	178 CPTs, 23 NT, Linhagens (BCPAP, FTC133, IHH4, K1, 8305C e C643)	MS-PCR	Hipermetilação e baixa expressão: <i>ZIC1</i>	QIANG et al. 2014

Legenda. NT – Nódulos de tireoide; AFT – Adenoma folicular de tireoide; LBT – Lesões benignas de tireoide; CT – Carcinoma de tireoide; CPT – Carcinoma papilífero de tireoide; vdeCPT – variante difusa esclerosante de CPT; vfCPT- variante folicular de tireoide; CFT – Carcinoma folicular de tireoide; CMT – Carcinoma medular de tiroide; COBRA: *Combined Bisulfite Restriction Analysis*; QMS-PCR: *Quantitative Methylation Specific PCR*; MS-PCR – *Methylation Specific PCR*; Seq – Sequenciamento; COBRA – *Combined Bisulfite Restriction Analysis*; MS-MLPA – *Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*.

Relatos em CPT mostram a associação entre a mutação em *BRAF* e a metilação aberrante de vários genes supressores de tumor (XING et al. 2004; XING 2007a; RODRÍGUEZ-RODERO et al. 2013). HU et al. (2006) avaliaram 195 CPT com a mutação T1799A do gene *BRAF*. Os autores relataram que a mutação do *BRAF* associada com a metilação aberrante dos genes *TIMP3*, *DAPK* e *SLC5A8* pode ter um papel crucial na carcinogênese e na agressividade tumoral.

DURANTE et al. (2007) detectaram uma diminuição na expressão de genes críticos envolvidos no metabolismo de iodo em carcinomas papilíferos com a mutação T1799A no gene *BRAF*. Essa mutação foi encontrada associada com padrões alterados de metilação em ilhas CpGs de regiões promotoras dos genes *NIS* e *TSHR* (XING 2007a). Estes dados indicaram que mecanismos epigenéticos podem regular a expressão de genes da via do iodo dependendo da presença ou ausência da mutação no gene *BRAF*.

A metilação do promotor do gene supressor de tumor *RASSF1A* é comum em cânceres humanos (PFEIFER e DAMMANN 2005). Alguns estudos sugeriram que a hipermetilação de *RASSF1A* é um evento inicial no desenvolvimento do câncer de tireoide. Casos negativos para a mutação no gene *BRAF* apresentavam hipermetilação deste gene (XING et al. 2004; NAKAMURA et al. 2005).

A inativação de *PTEN* leva a um aumento da atividade da proteína AKT permitindo a proliferação e a sobrevivência de células tumorais (SAMUELS e VELCULESCU 2004; HAY 2005). Alterações neste gene foram relacionadas com o desenvolvimento de neoplasias benignas, carcinomas

papilíferos e principalmente foliculares (HOU et al. 2008; HOU et al. 2011). O gene *PTEN* é um supressor tumoral que atua constitutivamente na via PI3K e que também tem sido estudado quanto a metilação no desenvolvimento do câncer de tireoide. ALVAREZ-NUÑEZ et al. (2006) encontraram uma frequência maior de metilação na região promotora do gene *PTEN* em amostras de adenomas e carcinomas foliculares (~83% e ~84%, respectivamente) do que em CPT (47%). HOU et al. (2008) relataram altos níveis de metilação em amostras de carcinomas anaplásicos de tireoide do que em carcinomas foliculares e adenomas benignos. Nesse estudo os autores também encontraram uma associação entre a metilação do gene *PTEN* com alterações genéticas na via PI3K/AKT, sugerindo que a alteração epigenética deste gene pode ocorrer como uma consequência de alterações genéticas na via relacionada.

Já é bem estabelecido que alterações no metiloma podem ter efeitos abrangentes no fenótipo e na progressão da doença, no entanto, até o momento a maioria dos pesquisadores tem direcionado sua atenção a genes alvos no estudo das alterações de metilação relacionados ao desenvolvimento de CPT (Quadro 1). Embora as estratégias de genes candidatos sejam importantes, elas não são capazes de identificar novos genes alterados epigeneticamente em um tumor particular.

Nos últimos anos surgiram novas tecnologias baseadas na análise global de metilação do DNA contribuindo para o avanço do conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica e na identificação de potenciais biomarcadores (STIRZAKER et al. 2014).

Para o nosso conhecimento, existem atualmente quatro estudos utilizando abordagens com *microarrays* de metilação em carcinomas de tireoide. RODRÍGUEZ-RODERO et al. (2013) objetivaram identificar assinaturas biológicas entre diferentes subtipos do câncer de tireoide em um limitado número de amostras. KIKUCHI et al. (2013) analisaram a metilação diferencial em regiões promotoras de genes associados aos 14 CPTs. MANCIKOVA et al. (2013) procuraram determinar o perfil de metilação do DNA em tumores bem diferenciados de tireoide, entre eles 47 CPTs. ELLIS et al. (2014) avaliaram os perfis de metilação do DNA e sua associação com mutações em *BRAF* e *RAS*, inversão em *RET/PTC* e ao comportamento agressivo dos CPTs segundo os subtipos histológicos. No Quadro 2 é possível visualizar um resumo geral dos estudos supracitados.

Quadro 2 - Relatos da literatura utilizando métodos de análise global do metiloma em carcinomas de tireoide.

REFERÊNCIA	METODOLOGIA UTILIZADA	NÚMERO DE AMOSTRAS	MUTAÇÃO	PRINCIPAIS RESULTADOS
RODRÍGUEZ-RODERO et al. 2013	27k Illumina	2 CPTs 2CFTs 2CMTs 2CATs 2 TN 4 Linhagens celulares		262 genes hipermetilados em CPT 352 genes hipermetilados em CFT 280 genes hipometilados em CAT 393 genes hipometilados em CMT
KIKUCHI et al. 2013	27k Illumina	14 CPT e 10 TN	<i>BRAF</i> e <i>RAS</i>	Hipermetilação de 25 genes em CPT
MANCIKOVA et al. 2013	27k Illumina	18 AFTs 18 CFTs 47 CPTs 8 TNA	<i>BRAF</i> , <i>RAS</i> e <i>RET/PTC1</i> e <i>RET/PTC2</i>	Maior número genes hipometilados em CPT e hipermetilados em AF e CFT.
ELLIS et al. 2014	450k Illumina	51 CPTs (29 vcCPT, 15 vfCPT, 7 Re) <hr/> 7 TN	<i>BRAF</i> , <i>RAS</i> e <i>RET/PTC</i>	Maior número de genes hipometilados em todas os CPT. Sítios diferencialmente metilados em tumores com mutação BRAF/RAS.

Legenda: CPT – Carcinoma papilífero de tireoide; CFT – Carcinoma folicular de tireoide; CMT – Carcinoma medular de tireoide; CAT – Carcinoma anaplásico de tireoide; TN – Tecido tireoidiano não tumoral; TNA – Tecido tireoidiano não tumoral adjacente; AFT – Adenoma folicular de tireoide; vcCPT – variante clássica de CPT; vfCPT – variante folicular de CPT; Re - Recidiva.

Embora existam alguns estudos utilizando plataformas de análise global de metilação em carcinomas de tireoide, todos os relatos citados no Quadro 2 apresentam limitações: pequeno número amostral RODRÍGUEZ-RODERO et al. (2013) e KIKUCHI et al. (2013), não pareamento de todas amostras KIKUCHI et al. (2013); MANCIKOVA et al. (2013); RODRÍGUEZ-RODERO et al. (2013); ELLIS et al. (2014), ausência de um grupo independente para validação dos dados RODRÍGUEZ-RODERO et al. (2013) e ELLIS et al. (2014), plataforma com baixa cobertura de sítios de

metilação KIKUCHI et al. (2013); MANCIKOVA et al. (2013); RODRÍGUEZ-RODERO et al. (2013), mais de um subtipo de câncer de tireoide MANCIKOVA et al. (2013); RODRÍGUEZ-RODERO et al. (2013), outros tipos de amostras tumorais KIKUCHI et al. (2013), ausência de informações para mutações RODRÍGUEZ-RODERO et al. (2013), ausência ou falta de informações clínico-patológicas KIKUCHI et al. (2013); MANCIKOVA et al. (2013); RODRÍGUEZ-RODERO et al. (2013); e ausência de análises de expressão gênica para integração dos dados (ELLIS et al. 2014).

Deste modo, o presente estudo tem por objetivo utilizar abordagens de análise em larga escala para identificar o perfil de metilação em CPT, levando em consideração todas as limitações dos estudos já realizados neste tipo tumoral, principalmente em relação às amostras normais de tecido adjacente, subtipo tumoral homogêneo e integração com dados de expressão. O desenho deste estudo visa não somente identificar uma assinatura epigenética dos CPTs, como também avaliar o efeito de tais alterações na expressão gênica e a comparação dos achados com os diversos parâmetros clínicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar o perfil de metilação em carcinomas papilíferos da tireoide e comparar com o perfil de expressão gênica afim de identificar potenciais marcadores moleculares regulados por metilação.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- ✓ Avaliar o perfil de metilação do DNA em amostras de carcinomas papilíferos da tireoide pareadas com tecido não tumoral adjacente;
- ✓ Investigar o perfil diferencial de metilação segundo a presença ou ausência da mutação V600E no gene *BRAF*;
- ✓ Integrar os dados de metilação com a assinatura de expressão de transcritos (obtidas de estudo anterior do grupo nas mesmas amostras);
- ✓ Confirmar e validar os achados em um grupo de amostras dependente e independente dos *arrays* utilizando pirosequenciamento e análise de expressão de transcritos específicos;
- ✓ Correlacionar os dados obtidos com parâmetros clínicos-histopatológicos (idade, gênero, extensão extratireoidiana, invasão e evolução clínica).

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Este é um estudo retrospectivo, no qual foram utilizadas amostras de tumores primários conservados em criogenia. As amostras foram devidamente coletadas e armazenadas no Banco de Tumores, cumprindo todas as exigências éticas e legais. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do *A.C. Camargo Cancer Center* (CEP nº 1842/13). (Anexo 1).

Os pacientes com CPT foram submetidos à ressecção cirúrgica e tratados no *A.C. Camargo Cancer Center*, entre os anos de 2000 a 2011. Foram avaliadas 42 amostras de tecido tumoral primário pareadas com 42 amostras de tecido não tumoral adjacente dos mesmos pacientes.

Para a seleção das amostras foram utilizados critérios de exclusão baseados na impossibilidade de obtenção de informações clínico-patológicas relevantes, apresentação de histórico de neoplasias malignas prévias (com exceção de carcinoma basocelular de pele), ablação parcial de tireoide (tireoidectomia parcial [TP] ou tireoidectomia total [TT] sem tratamento com radioiodo [RI]), supressão inadequada de TSH por terapia com tiroxina sintética e seguimento clínico inferior a cinco anos até o final do estudo, com exceção de pacientes que sofreram recorrência tumoral.

Todas as amostras selecionadas fizeram parte de outro estudo do grupo em que foi avaliada a expressão de transcritos utilizando a plataforma 8x60K (Agilent Technologies) (CEP1410/10). A maioria dos pacientes era do sexo feminino (~74%) e com idade inferior a 45 anos (~64%). A variante clássica de CPT predominava entre as amostras (~69%) e a maioria dos tumores apresentava tamanho superior a 1 cm (~57%). Embora a maioria dos pacientes tenha apresentado uma boa evolução clínica (88%), 12% apresentaram recidiva dos quais em 80% foi observada extensão extratireoidiana confirmada histopatologicamente. Nenhum paciente teve acometimento linfonodal ou metástases à distância. A Tabela 1 apresenta os detalhes clínicos dos casos selecionados.

Tabela 1 - Perfil clínico-patológico de 42 pacientes com CPT selecionados para o estudo.

CARACTERÍSTICA	N	FREQUÊNCIA (%)
Idade		
mediana (intervalo interquartil)	37	20-77
< 45 anos	27	64
≥ 45 anos	15	36
Gênero		
Feminino	31	74
Masculino	11	26
Dimensão tumor primário		
Mediana (intervalo) cm	1,2	0,6-3,2
mCPT (≤ 1cm)	18	43
CPT (>1cm)	24	57
Variante predominante		
Clássica	30	71
Folicular	7	17
Outras*	3	7
Ni	2	5
Multicentricidade		
Não	18	43
Sim	24	57
Extensão extratireoidiana		
Não	21	50
Sim	21	50
Invasão angiolinfática		
Não	41	97,6
Sim	1	2,4
Invasão perineural		
Não	37	88
sim	2	5
Ni	3	7
Tireoidite associada		
Não	25	59
sim	10	24
Ni	7	17
Evolução clínica		
Boa evolução clínica**	37	88
Recidiva***	5	12

Legenda: Ni: Não informado; mCPT: Microcarcinomas papilíferos de tireoide. *três variantes foram agrupadas como outras: 1 de células altas, 1 oncocítica e 1 mucrossecretor. **inclusos pacientes com nenhuma suspeita de doença ativa por exames de imagem e mensuração de tireoglobulina sérica. ***todas as amostras apresentaram a mutação BRAF V600E.

3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA

3.2.1 Extração de DNA

Todas as amostras foram macrodissecadas manualmente e avaliadas por um patologista experiente antes da extração dos ácidos nucleicos, confirmando a presença de tecido tumoral ou não tumoral.

O DNA genômico foi extraído pelo Banco de Macromoléculas do A.C. Camargo *Cancer Center*. A extração foi baseada em protocolos convencionais incluindo a degradação enzimática com proteinase K (20ng/mL), seguida da purificação com solventes orgânicos (fenol/clorofórmio/ álcool isoamílico). A quantificação e a qualidade do DNA foram avaliadas utilizando-se o *NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade)* e eletroforese em gel de agarose 1% corado com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (0,5µg/mL) (Invitrogen, Carlsbad, EUA). As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C.

3.2.2 Detecção da mutação V600E em *BRAF* (CÓDON 600), *KRAS* (CÓDON 12/13), *HRAS* (CÓDON 61) E *NRAS* (CÓDON 61) e inversão *RET/PTC*

Um total de 42 amostras tumorais foram avaliadas por pirosequenciamento para a detecção da mutação em *BRAF* (códon 600), *KRAS* (códon 12/13), *HRAS* (códon 61) e *NRAS* (códon 61) utilizando o equipamento PyroMark Q96 ID (Qiagen, Valencia, EUA). Esta análise é

resultante de um estudo prévio do grupo BARROS-FILHO (2014) e a metodologia descrita está detalhada no Anexo 2.

O método utilizado para a detecção das inversões *RET/PTC1* e *RET/PTC3* foi baseado no estudo de RHODEN et al. (2004). Esta análise foi realizada em um estudo prévio do grupo BARROS-FILHO (2014) e a metodologia está descrita no Anexo 3.

3.3 ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO

3.3.1 Modificação do DNA por bissulfito de sódio

As amostras de DNA (não-tumoral/tumoral) foram quantificadas com o kit *Qubit® dsDNA BR Assay* pelo equipamento *Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies)*. O DNA extraído foi convertido por bissulfito de sódio com o kit *EZ DNA Methylation Gold (Zymo, Irvine, CA, USA)* seguindo as recomendações do fabricante. Em resumo, o tratamento do DNA com bissulfito de sódio converte citosinas não metiladas em uracilas por um processo de deaminação, mas não afeta as citosinas metiladas que ficam protegidas da ação do sal pelo radical metil associado ao carbono 5 da base nitrogenada.

A primeira etapa consistiu na desnaturação do DNA a partir da adição de 130 µL da solução *CT Conversion* em 20 µL de DNA (500ng), resultando num volume total de 150µL de reação. A conversão foi realizada pela incubação das amostras em um termociclador nas seguintes condições: 16 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 1 hora e 4°C por 10 minutos. O

produto da reação foi transferido para a coluna *Zymo-Spin™ IC* e foram adicionados 600µL do tampão *M-Binding*. Posteriormente, foram acrescentados 100µL do tampão *M-Wash*, 200µL do tampão *M-Desulphonation* sendo repetidas mais duas etapas de lavagem com 200µL do tampão *M-Wash*. Ao final do processo, o DNA convertido foi eluído com a adição de 12µL do tampão *M-Elution*.

3.3.2 Ensaio de *microarray*

Para a análise do perfil de metilação do DNA foi utilizada a plataforma *Infinium® Human Methylation450 BeadChip* (Illumina, San Diego, CA, USA). Essa plataforma examina mais de 450.000 sítios de metilação por amostra com uma cobertura de 96% das ilhas CpGs descritas no genoma, além de ilhas CpGs estendidas. Todas as etapas para este procedimento foram realizadas de acordo com especificações do fabricante e estão descritas a seguir:

Amplificação do DNA. Após a modificação por bissulfito de sódio foi realizada a amplificação genômica a partir da adição de 4µL do DNA modificado, 20µL do reagente *Multi-Sample Amplification 1 Mix* (MA1) e 4µL de NaOH 0,1N, seguida de homogeneização em vórtex a 1600 rpm por 1 minuto, centrifugação a 280xg por 1 minuto e incubação em temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 68µL do reagente *Random Primer Mix* (RPM) e 75µL da solução *Multi-Sample Amplification Master Mix* (MSM). Após homogeneização por inversão e

centrifugação a 280xg por 1 minuto, as amostras foram incubadas no *Illumina Hybridization Oven* a 37°C por 21 horas.

Fragmentação do DNA. O DNA amplificado foi submetido a um processo de fragmentação a partir da adição de 50µL da enzima *Fragmentation solution* (FMS), seguido por um período de incubação no bloco *Hybex Microsample* a 37°C por 1 hora após homogeneização em vórtex a 1600rpm por 1 minuto e centrifugação a 50xg por 1 minuto.

Precipitação do DNA. Após a fragmentação do DNA foi realizada a precipitação das amostras a partir da adição de 100µL de *Precipitation solution* (PM1) e estas foram incubadas no bloco *Hybex Microsample* a 37°C por 5 minutos após homogeneização a 1600rpm por 1 minuto. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 50xg, a 22°C por 1 minuto e foram adicionados 300µL de isopropanol 100%. As amostras foram mantidas a 4°C por 30 minutos e depois centrifugadas a 3000xg, a 4°C por 20 minutos. Após a precipitação, o sobrenadante foi removido por inversão da placa que permaneceu em temperatura ambiente por 1 hora para secagem do sedimento.

Ressuspensão do DNA. Para ressuspensão do DNA foram adicionados 46µL de *Resuspension, hybridization, and wash solution* (RA1) ao DNA precipitado e as amostras foram mantidas incubadas por 1 hora no *Illumina Hybridization Oven* a 48°C. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em vórtex a 1800rpm por 1 minuto e pulsadas em centrífuga a 280xg.

Hibridação MultiBead Chip. A placa foi aquecida a 95°C por 20 minutos para denaturação das amostras e, em seguida, incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Após centrifugação a 280xg por 1 minuto, cada *BeadChip* foi colocado no *HybChamberInsert* e 15µL de cada amostra ressuspensa foi aplicada na parte apropriada do *BeadChip* e estes foram inseridos cuidadosamente no *Illumina Hybridization Chamber* contendo 400mL de *Humidifying buffer* (PB2). Nesta fase, o *BeadChip* foi incubado no *Illumina Hybridization Oven* a 48°C por 21 horas. As amostras de tecido tumoral e não tumoral adjacente foram colocadas no mesmo chip para evitar qualquer tipo de viés.

Lavagem do BeadChip. Ao iniciar o processo de lavagem do *BeadChip*, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 25 minutos para resfriamento. Em seguida, as *BeadChips* foram cuidadosamente inseridas numa câmara de lavagem contendo 200mL de PB1 durante 1 minuto, este procedimento foi repetido em outra câmara de lavagem com 200mL de PB1 por 1 minuto. Posteriormente, os *BeadChips* foram inseridos na *Flow-Through Chambers* para a etapa de extensão das bases.

Extensão Single-Base. As *Flow-Through Chambers* foram colocadas na *Chamber Rack* a 44°C e incubadas com 150µL da solução RA1 por 30 segundos por 5 vezes. Foram acrescentados 450µL da solução *XStain Bead Chip solution 1* (XC1) e as amostras foram incubadas por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 450µL da solução *XStain Bead Chip solution 2* (XC2) e as amostras foram incubadas por 10 minutos. Foram adicionados

200µL da solução *Two-Color Extension Master Mix* (TEM) nas amostras e estas incubadas por 15 minutos. Posteriormente, foram acrescentados 450µL de formamida 95%/1mM EDTA e incubada por 1 minuto, esse passo foi repetido mais uma vez, seguida de uma incubação final de 5 minutos. Ao final da extensão, a temperatura da *Chamber Rack* foi reprogramada para 32°C e ao atingir a temperatura desejada, foram adicionados 450µL da *XStain Bead Chip solution 3* (XC3) em cada *Flow-ThroughChamber* que em seguida foi incubada por 1 minuto. Esta etapa foi repetida mais uma vez.

Marcação da BeadChip (Stain). Para a marcação da *BeadChip* foram adicionados 250µL da solução *Superior Two-Color Master Mix* (STM) em cada *Flow-ThroughChamber* e as amostras incubadas por 10 minutos. Foram adicionados 450µL do reagente XC3 às amostras e estas foram incubadas por 1 minuto, esta etapa foi repetida mais uma vez seguida de incubação por mais 5 minutos. Logo após, foram adicionados 250µL do anticorpo *Anti-StainTwo-Color Master Mix* (ATM) e as amostras foram incubadas por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 450µL do reagente XC3 e as amostras foram incubadas por 1 minuto, esse passo foi repetido mais uma vez seguida de uma incubação de 5 minutos. Todos os passos de marcação a partir da adição do anticorpo foram repetidos mais uma vez, seguida de uma incubação de 10 minutos.

Lavagem e Secagem do BeadChip. A última etapa consistiu da lavagem e secagem dos *BeadChips*. Para a realização desta etapa as *BeadChips* foram retirados das *Flow-ThroughChambers* e submersas por 10 vezes em 310mL da solução PB1 e incubadas na solução por 5 minutos. Em

seguida, as *BeadChips* foram submersos por 10 vezes em 310mL da solução *XStain Bead Chip solution 4 (XC4)* e incubados na solução por 5 minutos. Posteriormente, os *BeadChips* foram colocados num suporte para secagem e mantidos no dissecador a vácuo por 55 minutos a 508 mmHg. O chip foi processado pelo equipamento *Flagship array scanner - HiScan Systems* (Illumina, San Diego, CA, USA).

3.4 ANÁLISE DOS DADOS DE MICROARRAY

3.4.1 Controle de qualidade dos dados brutos

O controle de qualidade das amostras foi realizado com o pacote *wateRmelon* (SCHALKWYK et al. 2013) disponível para a linguagem *R* versão 1.4.0 (www.r-project.org). Além dos parâmetros disponíveis neste programa, foram consideradas três etapas adicionais, seguindo as recomendações de CHEN et al. (2013): 1) remoção de sondas co-hibridadas em sequências alternativas homólogas (*cross-reactive*), considerando um tamanho maior ou igual a 49 pares de bases, 2) remoção de sondas mapeadas em regiões contendo SNPs (*single nucleotide polymorphism*) comuns para todas as etnias com MAF (*Minor Allele Frequency*) maior que 5% de acordo com os dados disponíveis no 1000 Genomas (<http://www.1000genomes.org/>) e 3) remoção de sondas mapeadas nos cromossomos X e Y. Com o pacote *wateRmelon* também foram removidas as sondas com baixa reprodutibilidade ($p > 0,05$) e contagem de *beads* < 3 em pelo menos 5% das amostras.

Posteriormente, foi realizado o MDS (*Multidimensional scalingplot*) para avaliar potenciais problemas técnicos, como por exemplo, efeito de lote, posição e ID, em relação aos grupos de amostras (não tumoral/tumoral). Também foi utilizado o método estatístico PCA (*Principal Component Analysis*) para identificar as covariantes que apresentam maior variabilidade nos grupo de amostras. Para a correção dos efeitos de lote foi utilizado o pacote SVA LEEK et al. (2014) disponível para a linguagem R versão 3.12.0.

3.4.2 Análise de sondas diferencialmente metiladas

As sondas obtidas após o controle de qualidade foram normalizadas pelo método BMIQ (*Beta Mixture Quantile Normalization*) e as posições diferencialmente metiladas (DMPs – *Differentially Methylated Positions*) foram obtidas com o pacote “LIMMA” (SMYTH et al. 2005), disponível para a linguagem R.

As sondas mais variáveis (intervalo interquartis superiores a 0,2 para a metilação e 1 em relação à expressão gênica) foram utilizadas como *imput* no *software* BRB *array tools* (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>). Análises não supervisionadas foram realizadas utilizando distância euclidiana e ligação média entre as sondas. Análises supervisionadas foram utilizadas para comparação entre CPT e TN. Os parâmetros utilizados para a identificação das alterações biológicas mais significativas foram valor de $p \leq 0,001$, seguido por correção de Bonferroni e $\Delta\beta$ (média do valor de β de CPT-média do valor de β de TN) de 10%. Foi realizado o teste hipergeométrico ($p < 0,05$) utilizando a função *phyper* do pacote *STATS* do R

para a comparação das sondas diferencialmente metiladas (hipermetiladas/hipometiladas) em relação ao sítio de localização.

Para a análise do perfil de metilação entre as amostras *BRAF*WT e *BRAF*V600E as amostras de CPT foi realizada uma correção pelo uso das amostras normais adjacentes seguida por uma comparação entre os dois grupos tumorais. Os mesmos parâmetros de valor de p e de delta beta estabelecidos anteriormente foram utilizados na identificação das sondas diferencialmente metiladas. As sondas foram anotadas de acordo com os dados fornecidos pela empresa *Illumina*, usando o genoma hg19 como referência.

A análise de bioinformática foi realizada com a colaboração do Dr. Herceg Zdenko e Dr. Srikant Ambatipudi, Mechanisms of Carcinogenesis - Epigenetics Group, *International Agency for Research on Cancer* (IARC, França).

3.4.3 Seleção das amostras e genes para validação

Foram utilizadas 30 amostras para análise de metilação do DNA por pirosequenciamento, as quais também foram utilizadas nas análises de arrays. Em adição, foram incluídas 80 amostras independentes do *microarray*, sendo 19 amostras tumorais pareadas com os tecidos normais e outras 42 amostras tumorais. Para a análise de expressão de transcritos foram incluídas seis amostras pareadas e 24 amostras tumorais utilizadas previamente no *microarray* de metilação e 81 amostras independentes do

array de metilação, sendo 15 amostras pareadas e 51 amostras tumorais não pareadas (Quadro 3).

Foram selecionados 5 genes (*GABRB2*, *ERBB3*, *HMGA2*, *SOX14* e *DNMT1*) para análise de metilação alvo-específica utilizando a técnica de pirosequenciamento e para avaliação da expressão dos transcritos por RT-qPCR. Os genes foram selecionados quando observada uma correlação inversa entre os dados de metilação e expressão da análise integrada, seu envolvimento em processos tumorais assim como nos valores de delta beta na análise de comparação entre CPT e TN. Os genes *GABRB2*, *ERBB3* e *HMGA2* apresentaram perda de metilação com ganho de expressão e suas sondas se encontraram no corpo de gene. Em um estudo prévio do grupo, o gene *GABRB2* foi o transcrito com maior expressão diferencial em câncer papilífero de tireoide quando comparado com tecido não tumoral e os genes *HMGA2* e o *GABRB2* foram considerados marcadores independentes com alto valor diagnóstico. Adicionalmente, o aumento da expressão de *ERBB3* foi identificado em amostras com mutação em *BRAF* (BARROS-FILHO 2014).

Os genes *SOX14* e *DNMT1* foram selecionados a partir da comparação CPT e TN por apresentarem metilação diferencial. A sonda representada pelo gene *SOX14* encontra-se na região promotora e dentro de ilha CpG e a sonda representada pelo gene *DNMT1* encontra-se no corpo do gene podendo revelar a importância da metilação diferencial nessas regiões e seu potencial papel na regulação de outros genes. Os critérios utilizados

para seleção dos genes para os ensaios de validação foram resumidos na Tabela 2.

Quadro 3 - Grupos de amostras selecionados para validação.

GRUPO	PIROSEQUENCIAMENTO				RT-qPCR			
	Pareadas	TN	CPT	Total	Pareadas	TN	CPT	Total
DEPENDENTE	30	30	30	60	6	6	30	36
INDEPENDENTE	19	19	61	80	15	15	66	81

Legenda. TN.: Tecido tireoidiano não tumoral; CPT.: Câncer Papilífero de Tireoide; RT-qPCR.: Reverse Transcription – qPCR. O grupo de amostras dependentes foi composto das mesmas amostras utilizadas no microarray.

Tabela 2 – Critérios utilizados para seleção de genes para validação.

	$\Delta\beta$ significativo	Localização das Sondas	Correlação inversa significativa	Função biológica	Achados importantes
<i>DNMT1</i>	-0.31	Corpo de Gene	---	Regula o padrão de metilação de outros genes	---
<i>ERBB3</i>	-0.20	Corpo de Gene	-0.62	Desenvolvimento de tumores	Resistência ao tratamento
<i>GABRB2</i>	-0.18	Corpo de Gene	-0.76	Proliferação celular	FC = 128
<i>HMGA2</i>	-0.28	Corpo de Gene	-0.56	Estrutura da cromatina	FC= 25
<i>SOX14</i>	0.14	TSS200	---	Relatado como alterado em diversos tumores	---

FC: *Fold Change*

3.5 COMPARAÇÃO COM DADOS EXTERNOS (TCGA)

As sondas alteradas que apresentaram metilação diferencial em ambas as comparações, CPT *versus* TN adjacente; *BRAF*WT *versus* *BRAF*V600E, foram comparadas com o banco de dados externos do TCGA (*The Cancer Genoma Atlas*, disponível em <http://tcga-data.nci.nih.gov/>. Acesso em Junho/2014) utilizando os mesmos parâmetros pré-estabelecidos ($p < 0,001$ seguida por correção de Bonferroni e $\Delta\beta 10\%$ e *BRAF* previamente corrigido pelo tecido não tumoral adjacente). O banco de dados TCGA também foi usado para comparar os dados de expressão de transcritos obtidos de um estudo prévio do grupo (BARROS-FILHO 2014). Este estudo anterior identificou genes diferencialmente expressos com FDR $< 1\%$ em amostras de CPT comparadas ao TN, utilizando a plataforma 8x60K (Agilent Technologies).

O TCGA tem dados depositados de análises genômicas, epigenômicas e transcriptômicas, incluindo tecnologias em larga-escala, em uma grande quantidade de amostras tumorais. Os dados de metilação diferencial (CPT *versus* TN) que utilizaram a Plataforma *Infinium® Human Methylation450 BeadChip* (Illumina, San Diego, CA, USA) foram utilizados do TCGA para todas as amostras de CPT que também continham amostras de tecido não tumoral adjacente. Foram também utilizados os dados de expressão de transcritos realizados pela Plataforma *Illumina HiSeq 2000 RNA Sequencing Version 2*. As sondas mapeadas em regiões não anotadas foram removidas desta análise. Para a confirmação dos resultados entre os

grupos amostrais (CPT e TN adjacente; *BRAFWT* e *BRAFV600E*) foi utilizado o teste t com valor de detecção de $p < 0.05$.

3.6 ANÁLISE INTEGRADA DOS DADOS DE METILAÇÃO COM OS DE EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS E ANÁLISE *IN SILICO*

Para a integração dos dados foram utilizados somente os casos que foram avaliados para expressão de transcritos e metilação. Esta análise foi realizada utilizando o teste de Pearson para a obtenção de correlação inversa entre os genes (Programa Excel, Microsoft Office 2010, versão 14.0.6023.1000). Uma análise de agrupamento hierárquico não supervisionada foi realizada utilizando distância euclidiana e método de ligação média pelo programa *BRB array tools* (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>). Foram considerados genes candidatos a *drivers* aqueles cuja correlação inversa foi significativa entre os dados de expressão e metilação na comparação CPT e TN.

Análises *in silico* para avaliação de redes, vias e funções gênicas foram realizadas com a utilização do *software* KOBAS (*KEGG Orthology Based Annotation System*) versão 2.0 e IPA (*Ingenuity Pathways Analysis*) (Ingenuity® Systems). Foi utilizado como *input* nestes softwares os genes provenientes da análise integrada e os genes diferencialmente expressos. Foi calculada a verossimilhança da participação desses genes em uma via em particular resultando em um p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

Os genes diferencialmente metilados identificados neste estudo e os genes com expressão alterada em CPT BARROS-FILHO (2014) foram avaliados quanto a sua participação nas vias de sinalização MAPK e PI3K. Estas vias já estão bem estabelecidas em literatura como alteradas em câncer de tireoide. Os genes da via MAPK e PI3K foram obtidos pelo banco de dados KEEG e comparados com os dados do nosso estudo em CPT.

3.7 ANÁLISE DE METILAÇÃO ALVO ESPECÍFICA POR PIROSEQUENCIAMENTO

A técnica de pirosequenciamento é baseada no sequenciamento de DNA pelo método de síntese, no qual ocorre a incorporação de nucleotídeos mediante a conversão enzimática e liberação de pirofosfato, com a detecção de um sinal quimioluminescente quando o nucleotídeo está ligado ao seu molde. Esta técnica é um procedimento qualitativo e quantitativo que fornece com precisão a quantidade de metilação de dinucleotídeos CpGs específicos de maneira rápida e eficaz, além de possibilitar a avaliação da qualidade da conversão por bissulfito de sódio por meio de nucleotídeos controles inseridos na ordem de dispensação durante o sequenciamento.

Os iniciadores dos genes *DNMT1*, *ERBB3*, *GABRB2*, *HMGA2* e *SOX14* foram desenhados usando os seguintes critérios: (1) iniciadores com tamanho entre 18 e 24 pares de bases, (2) sem 3 guaninas (G) ou citosinas (C) na extremidade 5', (3) mesma quantidade de C e G no *forward* e no *reverse* (4) conter pelo menos 50% de conteúdo C e G, (5) amplicon menor

que 400 pares de bases e (6) temperatura de *melting* entre 55-62°C. Tomou-se cuidado também de evitar formação de estruturas secundárias estáveis e a complementaridade entre as extremidades 5' e 3'. Detalhes da sequência dos iniciadores avaliados para metilação alvo-específica por pirosequenciamento estão apresentados no Quadro 4.

Quadro 4 - Sequências e propriedades dos iniciadores avaliados para a metilação alvo-específica por pirosequenciamento.

GENE	SEQUÊNCIA DOS INICIADORES	AMPLICO N	TA	SÍTIOS CpG
<i>DNMT1</i>	F - 5' GTATTTGGGGATTAAGAG 3' R - 5' [B]TTAATACATCCCCTCCTC 3' Seq - 5' GTAGTGTGGGTATT 3' Py - 5' CGGGTTGGGGCGGTACGCGTCGGTATTTTCG 3'	491pb	51°C
<i>ERBB3</i>	F - 5' GTAGGAGGTTTAATAGAGGTTGG 3' R - 5' [B]ATCCCAAAAACACCCCAAAA 3' Seq - 5' GTAGGAGGTTTAATAGAGGTTGG 3' Py -5' CGTT	389pb	56° C	.
<i>HMGA</i> 2	F - 5' GATGTGTTTATTGGTGTAGTGG 3' R - 5' [B]TACTTCAATTCTCCACTTCCTT 3' Seq - 5' TTAAATGGGATG 3' Py -5' CGAATTTTTATTGAGGACGTTTATGGGTTTTA AGTTAATTAGTTTTATTTAATTATCGA 3'	461pb	56°C	...
<i>GABR</i> <i>B2</i>	F - 5' GTAGGTAGGTATAGGGGGTT 3' R - 5' [B]CTCTCTCCCTCTCCCTA 3' Seq - 5' GTAGGTAGGTATAGGGGGTT 3' Py -5' AACGTTATTTTTAATTAATTGTTTGTACGT	354pb	49° C	..
<i>GABR</i> <i>B2</i>	F - 5' AGTAGGTAGGTATAGGGGGT 3' R - 5' [B]CTCTCTCCCTCTCCCTAAT 3' Seq - 5' TAAAAAATGTAA 3' Py -5' CGGTGGTTTTTCGTAAGTCGGGTTTTTCGG	355pb	49°C
<i>SOX14</i>	F - 5' TTGGTTTGTTYGTGGGGGT 3' R - 5' [B]AAACRCCRTTCTAATAACCCA 3' Seq - 5' ATTTTTGTTGGATT 3' Py - 5' CGCGTAGTTTAGTTTCGAGCG 3'	207 pb	50°C

Legenda: F.: Foward; R.: Reverse; Seq.: iniciador usado para a reação de sequenciamento; pb.: pares de bases; TA.: Temperatura de anelamento. Py: Sequência referência (CGs em negrito são os sítios CpGs analisados).

Após o tratamento do DNA com bissulfito de sódio, 25ng de cada amostra foram amplificadas pela PCR com um dos iniciadores marcados com o fluoróforo biotina na extremidade 5'. A amplificação pela PCR foi realizada num volume de 50µL contendo: 1µL do DNA convertido (25ng), Tampão 10x, 15mM de MgCl₂, 10µM de cada dinucleotídeo, 10µM de cada iniciador e 1U de *HotStartTaq DNA polimerase* (Qiagen). Cinco microlitros do produto amplificado foram submetidos a uma corrida em gel de agarose 1% corado com *Gel Red Nucleic Acid Stain* para avaliação da qualidade e intensidade da banda.

Posteriormente o preparo da fita simples de DNA para o pirosequenciamento foi realizado usando o *PSQ Vaccuun Prep Tool* (Qiagen, Valencia, CA) segundo as instruções do fabricante. Resumidamente 45µL do produto da PCR foi transferido para uma placa de 96 poços e retido por um tampão composto por *beads* de sefarose (3µL de *beads streptavidin-coated Sepharose* + 37µL de tampão de ligação). A placa foi agitada a 1500 rpm por 10 minutos e levada ao *Vaccuun Presp Toll* para lavagem e purificação dos produtos de PCR. Primeiramente ocorreu a lavagem em álcool 70%, seguida por denaturação em uma solução de NaOH 0,2M e uma nova lavagem em um tampão contendo 10nM de Tris. O iniciador de sequenciamento foi diluído em 40µL de tampão de anelamento e adicionado em placa especial para pirosequenciamento (PSQ 96 low plate) (Qiagen, Valencia, CA) junto ao produto já purificado. Em seguida, a placa foi incubada a 80°C por 2 min e resfriada a temperatura ambiente por 10 minutos para o anelamento do iniciador de sequenciamento. Os produtos

purificados e ligados ao iniciador foram transferidos para o equipamento *PSQ HS 96A Pyrosequencer* (Qiagen, Valencia, CA), onde foi realizado o sequenciamento em tempo real das regiões a serem validadas usando os reagentes *Pyromark Gold Q96* (Qiagen, Valencia, CA). Para garantir a confiabilidade dos dados foram utilizados DNA 100% metilados e 0% metilados como controles positivos e negativos, respectivamente (Figura 3).

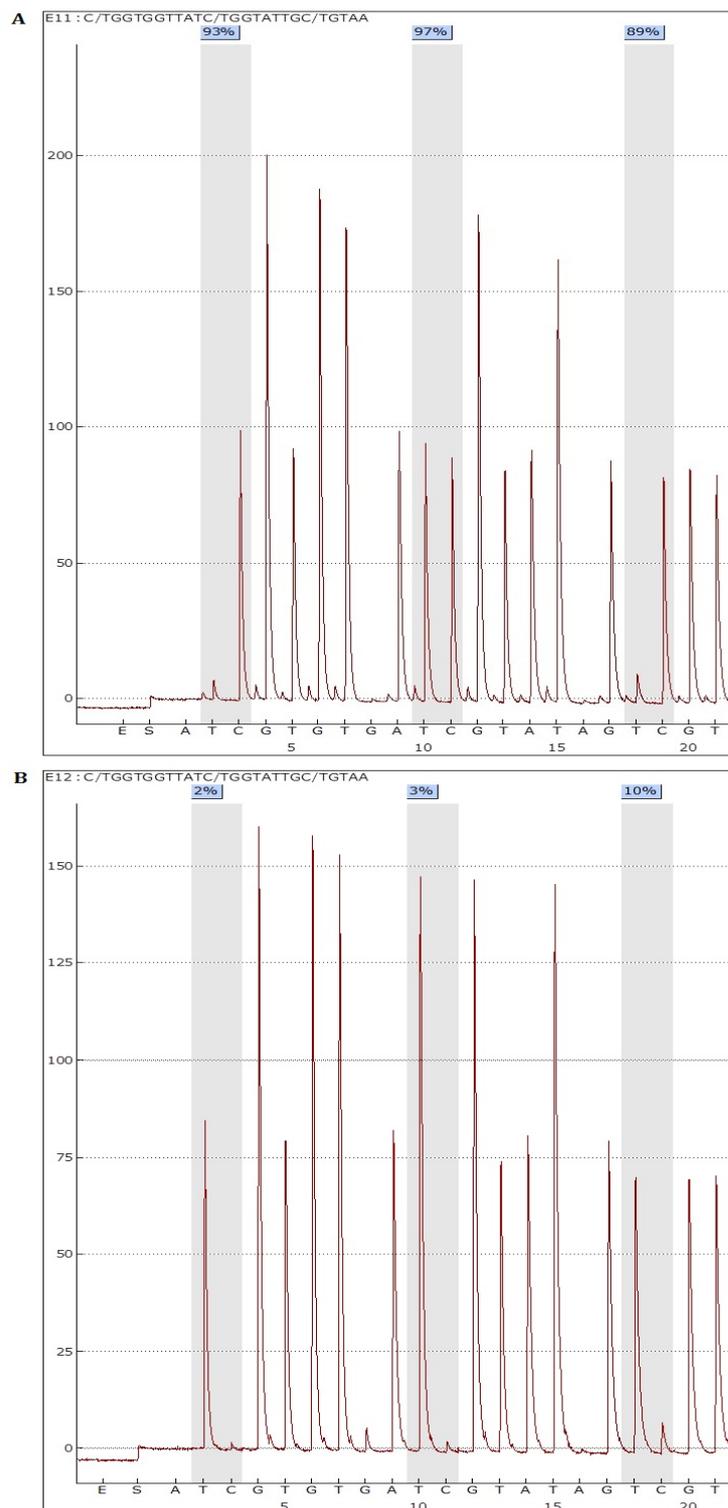


Figura 3 – Pirograma representativo do controle positivo (A - DNA metilado) e negativo (B - DNA não metilado) para o gene SOX14.

Os dados de pirosequenciamento (% de metilação de cada região avaliada) foram analisados estatisticamente utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Para essa análise foi utilizado o teste *não paramétrico Mann-Whitney* para comparar as diferenças entre os grupos não tumoral e tumoral ($p < 0,05$ bicaudal). Resultados (“outliers”) extremos foram removidos antes de qualquer teste estatístico (primeiro ou terceiro quartil mais ou menos três vezes o intervalo interquartil).

3.8 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

O RNA das amostras de tecido tumoral e não tumoral foram extraídos pelo RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, EUA). Os tecidos foram macerados utilizando as esferas magnéticas do kit Precellys® (Bertin Technologies, Orléans, França). A quantificação e qualidade do RNA foram avaliadas utilizando-se o *NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade)* e o *Bioanalyzer (RNA 6000 NanoLabChip kit 2100 Agilent Technologies)*, respectivamente. As amostras de ácidos nucleicos foram obtidas do banco de macromoléculas do *AC Camargo Cancer Center, SP*.

As amostras de RNA foram tratadas com DNase, adicionando 1x de *DNase I Reaction Buffer* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1U de *DNase Amp Grade* (Invitrogen) em 2 μ g de RNA em um volume total de 10 μ L de reação. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 15 minutos em

temperatura ambiente e, em seguida, foram adicionadas à solução 2,5mM de EDTA para a inativação da enzima (incubação de 65°C por 10 minutos).

Para a conversão do RNA em cDNA, foram adicionados 2,5 µM dos iniciadores oligodT 12-18 (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, St. Giles, UK), 2,5 µM de *random* primers (Invitrogen) e 0,5 mM de dNTPs (Invitrogen) ao RNA purificado. Em seguida, as amostras foram incubadas por 5 minutos a 65°C e por um minuto no gelo. Após esse período de incubação, foram adicionados à amostra o tampão 1X da enzima *super script III First Strand Buffer* (Invitrogen), 5mM de dietiltreitol (DTT) (Invitrogen) e 200U da enzima *super script III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), com incubação a 55°C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em -20°C até o uso.

Cinco genes foram avaliados para a expressão dos transcritos por RT-qPCR. Para avaliação dos genes *GABRB2*, *ERBB3* e *HMGA2* foi utilizado o sistema *TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems)* e para os genes *DNMT1* e *SOX14* foi utilizado o sistema de detecção SYBR Green. Para os 3 primeiros genes (*GABRB2*, *ERBB3* e *HMGA2*) foi utilizado o *Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)*, contendo 50-100nM das sondas e 200-250nM de cada iniciador (Applied Biosystems) e 20ng de cDNA num volume final de 20µL com água livre de nucleases. Para as demais reações (*DNMT1* e *SOX14*) foi realizada a amplificação do produto utilizando 20ng de cDNA, 1x de Sybr Green I Master Mix (Applied Biosystems), 200 µM de cada iniciador (*foward/reverse*) para um volume final de 12,5µL. Todas as reações foram analisadas em duplicatas e

submetidas às seguintes condições: 95°C por 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto no sistema PCR 7500 Real Time PCR (*Applied Biosystems*). Como controles endógenos foram utilizados os genes *EIF2B1* e *PUM1* para as reações utilizando o sistema de detecção *Taqman* e os genes *GUSB* e *HPRT* para as reações realizadas com *Sybr Green*, os quais demonstraram pequena variação na comparação entre as amostras de tecido tireoidiano não tumoral e tumoral (BARROS-FILHO et al. 2014). A especificidade do produto amplificado foi avaliada pela curva de dissociação. A média dos valores de ciclos limiares (Ct) das replicatas de cada amostra foi usada na quantificação da expressão dos genes de interesse. O nível de expressão relativa de cada gene em relação ao controle foi dado pela expressão $QR=2(-\Delta\Delta Ct)$ (PFAFFL 2001).

Para a validação dos achados foi realizada uma correlação utilizando o teste de Pearson ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos pela técnica de pirosequenciamento e RT-qPCR.

O desenho do estudo incluindo todas as abordagens utilizadas bem como número amostral foi resumidamente ilustrado na Figura 4.

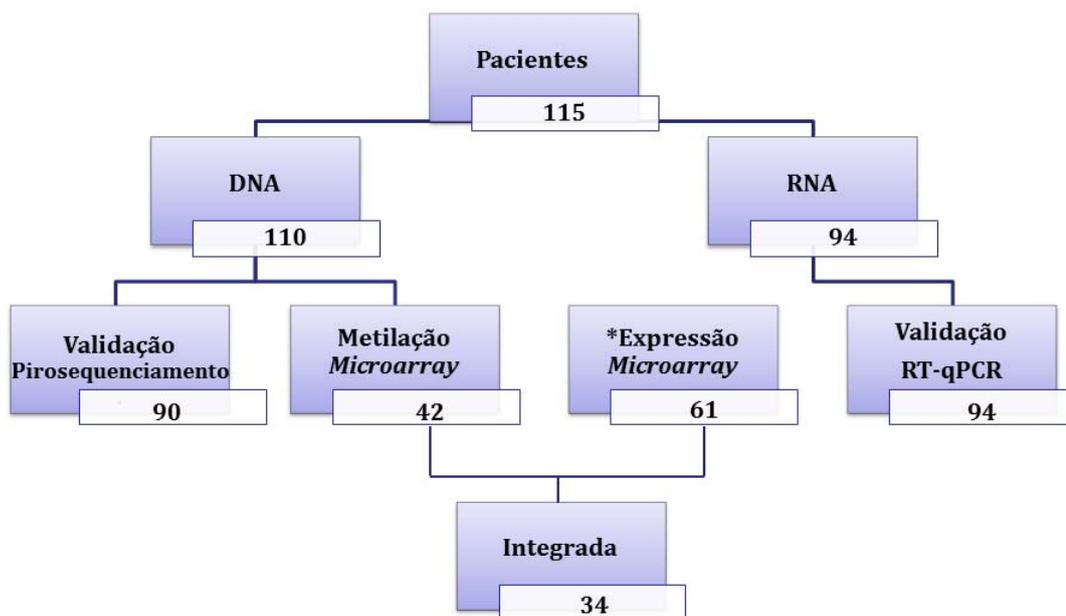


Figura 4 - Desenho do estudo ilustrando todas as abordagens utilizadas.
*estudo prévio do grupo.

3.9 CONFIRMAÇÃO DOS ACHADOS COM OS DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS

Os genes selecionados para a validação dos dados (*DNMT1*, *ERBB3*, *GABRB2*, *HMGA2* e *SOX14*) foram associados com os dados clínicos e histopatológicos mais relevantes (parâmetros utilizados na caracterização das amostras dos pacientes, Tabela 1) e as alterações genéticas em *BRAF*, *RAS* e *RET/PTC*. Esta análise foi realizada utilizando teste t não pareado.

4 RESULTADOS

O perfil de metilação do DNA foi realizado em amostras de carcinoma papilífero de tireoide e normais adjacentes dos 42 pacientes no entanto, uma amostra (381N) não passou pelo controle de qualidade e por esse motivo esta e seu par correspondente (381T) foram excluídas das demais análises.

Considerando os parâmetros estabelecidos no controle de qualidade, foram removidas 97 sondas com *beadcount* <3 em 5% das amostras, 648 sondas com valor de $p > 0,05$ em 1% das amostras, 8.240 sondas de SNPs, 14.548 sondas *cross-reactive* e 11.713 sondas mapeadas nos cromossomos X e Y.

4.1 ANÁLISE DOS DADOS DE METILAÇÃO: COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS TUMORAIS E NORMAIS

A análise de agrupamento não supervisionado permitiu identificar dois agrupamentos bastante distintos, um incluindo as amostras normais e seis amostras tumorais consideradas *normal-like*, e um segundo composto exclusivamente por tumores (Anexo 4). Na primeira etapa da análise de metilação diferencial dos 41 pares de amostras foram encontrados aproximadamente 20.000 genes com valor corrigido (Bonferroni) de $p < 0,001$. Em seguida, foi aplicado um valor de delta beta de 0,1 visando encontrar as alterações biológicas mais significativas, assim uma nova lista foi gerada

com 11.302 sondas diferencialmente metiladas (Anexo 5), representando 4.265 genes (Figura 5).

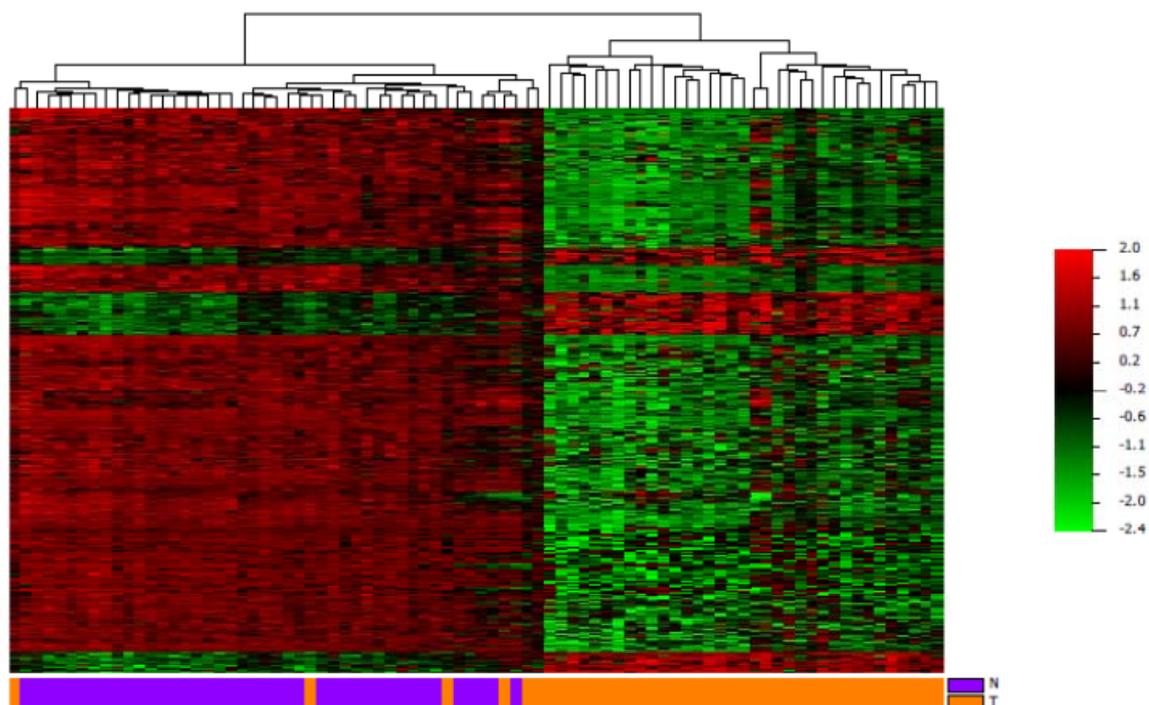


Figura 5 - *HeatMap* indicando as 11.302 sondas diferencialmente metiladas nas amostras de CPT em relação ao tecido não tumoral adjacente. Vermelho: valores de beta próximos de 1. Verde: valores de beta próximos de zero. Roxo: amostras não tumorais. Laranja: amostras tumorais. É possível observar que a maioria das sondas apresentou-se hipometiladas nas amostras tumorais.

As 485.512 sondas incluídas no *microarray* foram estratificadas de acordo com a distribuição genômica incluindo a região promotora, corpo de genes, 3'UTR e região intergênica. Em relação ao contexto de CpG, as sondas foram distribuídas dentro de ilhas CpG, *shores* (1 a 2.000 pares de bases distante da ilha CpG), *shelves* (2.001 a 4.000 pares de bases distante da ilha CpG) e CpG isolados em regiões “*open sea*” (4.000 pares de bases distante da ilha). A maioria das sondas da plataforma estava mapeada em

regiões não promotoras (59%) e fora de ilhas CpGs (69%), sendo que apenas 37% das sondas estavam localizadas nas regiões relacionadas ao contexto CpGs supracitadas (Figura 6). Foi observada uma diferença significativa na metilação do DNA em apenas 2% (11.302) do total de sondas que a plataforma examina.

Ao analisar a distribuição genômica das sondas com metilação diferencial, notou-se que a maioria delas encontra-se mapeada em regiões não promotoras (75%), principalmente em corpo de genes (38%) e, em relação ao contexto CpG, a maioria das sondas encontra-se distante de ilhas (96%) (Figura 6).

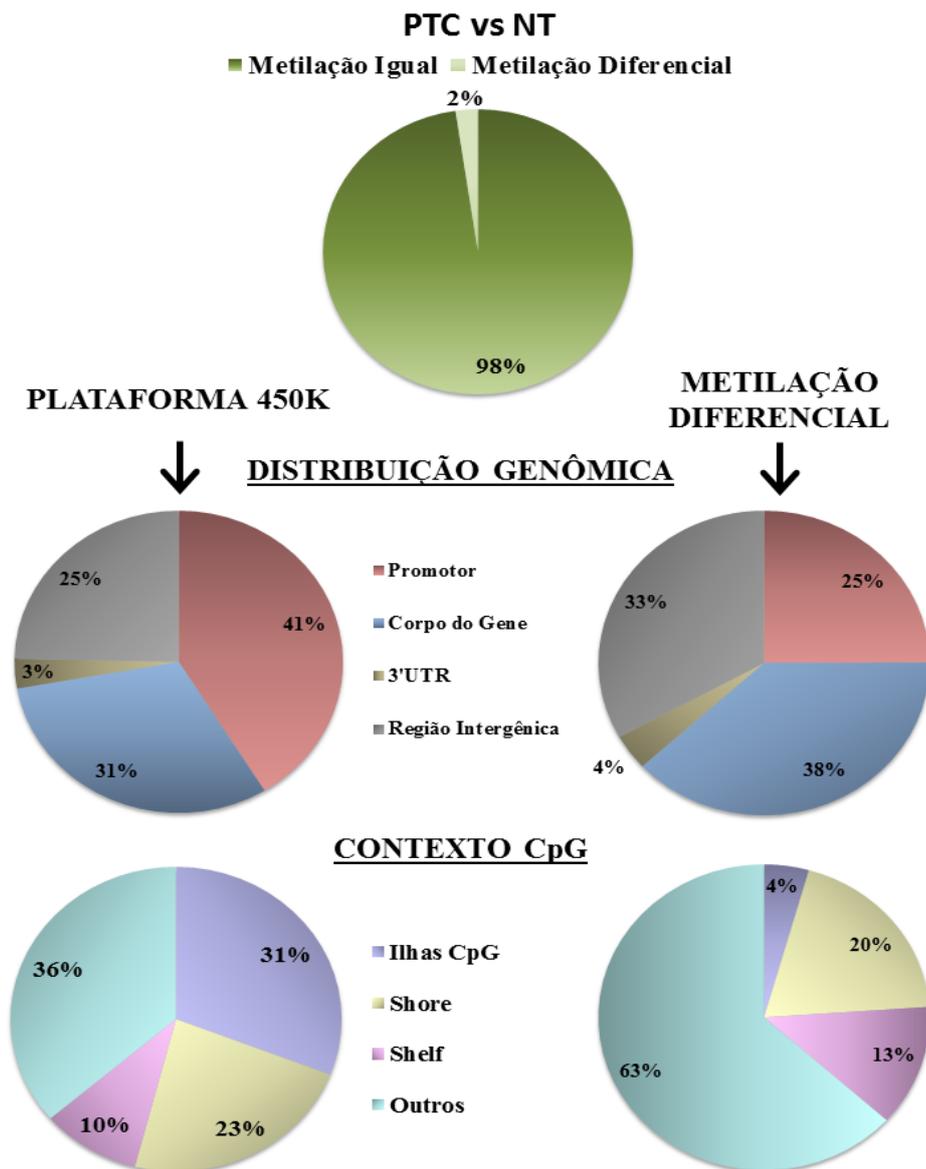


Figura 6 – Representação da distribuição genômica do contexto CpG da plataforma *Infinium Human Methylation 450K* (Illumina) e das sondas identificadas com metilação diferencial detectadas neste estudo.

Entre as sondas diferencialmente metiladas, 86% (9.674) estavam hipometiladas e 14% (1.628) hipermetiladas. Não houve diferença relevante na distribuição genômica destas sondas, no entanto, ao considerar o contexto CpG foi possível observar que embora a proporção da distribuição

de sondas hipometiladas e hipermetiladas tenha sido muito semelhante em *shores*, *shelf* e *outros/open sea* houve uma diferença significativa nessas regiões ($p= 3.67E-59$, $3.80E-04$, $6.50E-03$, respectivamente). Na comparação das sondas diferencialmente metiladas associadas às ilhas CpG foi observado uma diferença significativa entre as sondas hipermetiladas (13%) quando comparadas com as sondas hipometiladas (3%) para a mesma região ($p= 2.80E-59$) (Figura 7). Ambos os eventos de ganho e perda de metilação foram encontrados em todos os cromossomos. As vinte sondas com maiores delta beta e as vinte sondas com menores delta beta estão representadas na Tabela 3.

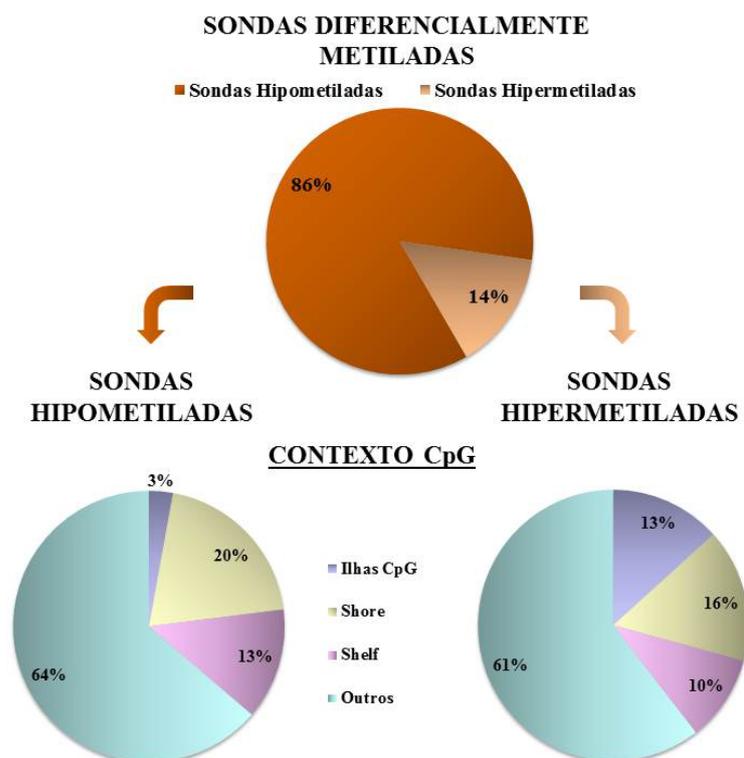


Figura 7 – Representação da distribuição no contexto CpG das 11.302 sondas com metilação diferencial. A maioria das sondas apresentou hipometilação global, enquanto uma pequena parte apresentou hipermetilação.

Tabela 3 - As 20 principais sondas hipometiladas e hipermetiladas, respectivamente, nas amostras de CPT

<i>CpG TARGET ID</i>	<i>GENE</i>	<i>CROMOSSO</i>	<i>LOCALIZAÇÃO</i>	<i>ILHA CPG</i>	<i>ENHANCER</i>	$\Delta\beta$
SONDAS HIPOMETILADAS						
cg20834178	<i>TBC1D14</i>	4	Corpo de gene	Não	Sim	-0.49
cg11228682	<i>ATXN1</i>	6	Corpo de gene	Não	Sim	-0.49
cg13606889	<i>SORL1</i>	11	Corpo de gene	Não	Sim	-0.47
cg03301058	<i>GABRR2</i>	6	Corpo de gene	Não	Sim	-0.47
cg13591783	<i>ANXA1</i>	9	5'UTR	Não	Não	-0.46
cg18458509	<i>SLC22A18AS</i>	11	Corpo de gene	Não	Sim	-0.44
cg26530485	<i>LUZP1</i>	1	TSS1500	Não	Não	-0.44
cg09968361	<i>SERPINA1</i>	14	5'UTR	Não	Sim	-0.44
cg10077746	<i>DUSP6</i>	12	Corpo de gene	Não	Não	-0.43
cg08908131	<i>KIAA1598</i>	10	Corpo de gene	Não	Sim	-0.43
cg09501687	<i>C5orf62</i>	5	Corpo de gene	Não	Sim	-0.43
cg23190089	<i>SLC22A18AS</i>	11	Corpo de gene	Não	Sim	-0.43
cg03992638	<i>CXXC5</i>	11	Corpo de gene	Não	Não	-0.43
cg03063658	<i>SH3RF3</i>	5	5'UTR	Não	Sim	-0.43
cg06778183	<i>MCTP1</i>	2	Corpo de gene	Não	Sim	-0.43
cg01291854	<i>ELK3</i>	5	Corpo de gene	Não	Sim	-0.43
cg13531667	<i>MCC</i>	12	5'UTR	Não	Não	-0.43
cg18700744	<i>NAA25</i>	5	TSS1500	Não	Sim	-0.42
cg20968743	<i>TSPAN18</i>	12	Corpo de gene	Não	Sim	-0.42
cg23501051	<i>LOC100126784</i>	11	5'UTR	Não	Sim	-0.42
SONDAS HIPERMETILADAS						
cg08597067	<i>ELOVL5</i>	6	Corpo de gene	Não	Sim	0.38
cg17781866	<i>ACOX3</i>	4	Corpo de gene	Não	Não	0.37
cg04483460	<i>LRP8</i>	1	Corpo de gene	Não	Não	0.34
cg23136645	<i>TPO</i>	2	TSS200	Não	Não	0.34
cg12715136	<i>C10orf28</i>	10	3'UTR	Não	Não	0.33
cg21236655	<i>TNC</i>	9	5'UTR	Não	Não	0.33
cg15977002	<i>TPO</i>	2	Corpo de gene	Não	Não	0.32
cg23816737	<i>TULP4</i>	2	Corpo de gene	Não	Não	0.32
cg15923139	<i>SORBS2</i>	6	1ºÉxon	Não	Sim	0.32
cg10039523	<i>VPS13D</i>	4	5'UTR	Não	Sim	0.32
cg18236877	<i>CASZ1</i>	1	Corpo de gene	Não	Não	0.32
cg04295144	<i>ICAM5</i>	1	Corpo de gene	Não	Não	0.32
cg06096184	<i>LRIG1</i>	19	Corpo de gene	Sim	Não	0.31
cg01955203	<i>FBXO32</i>	3	Corpo de gene	Não	Não	0.31
cg05151496	<i>TSGA10IP</i>	8	3'UTR	Não	Não	0.3
cg07899076	<i>RNF216</i>	11	TSS1500	Não	Sim	0.3
cg08390209	<i>CDKN2BAS</i>	7	Corpo de gene	Não	Sim	0.3
cg06793849	<i>ODZ2</i>	9	Corpo de gene	Não	Não	0.3
cg10765992	<i>TTC23</i>	5	Corpo de gene	Não	Sim	0.3
cg13107973	<i>KCNK2</i>	15	Corpo de gene	Não	Não	0.29

Legenda: $\Delta\beta$: Delta beta. Valores negativos indicam sondas hipometiladas e valores positivos indicam sondas hipermetiladas. *Sondas não validadas pelo TCGA. TSS1500: dentro de 1500 pares de bases do início da região de transcrição (pertence a região promotora); TSS200: dentro de 200 pares de bases do início da região de transcrição (pertence a região promotora).

4.2 COMPARAÇÃO COM DADOS EXTERNOS (TCGA)

Os dados de expressão gênica foram obtidos da análise de 61 amostras tumorais (CPT) e cinco normais (um *pool*) sendo identificados 3.245 genes com expressão diferencial (BARROS-FILHO 2014).

Os achados de metilação e de expressão foram também comparados com dados do TCGA. Neste banco de dados foram coletados dados de análises realizadas em 56 CPT *versus* 56 amostras normais para ensaios de metilação e 506 CPT e 59 TN para os dados de expressão de transcritos. Observou-se que mais de 80% das sondas (9.189) e dos genes (2.686) com metilação/expressão alterada neste estudo foram confirmados como alteradas também pelo banco de dados TCGA.

4.3 ANÁLISE INTEGRADA

A partir da análise comparada das sondas e dos genes que apresentaram alteração neste estudo com dados externos do TCGA, foi realizada uma análise integrada em 34 amostras pareadas da nossa casuística (as quais foram estudadas pelas duas técnicas, metilação e expressão de transcritos). A Figura 8 apresenta em detalhes a estratégia utilizada nesta análise. Como resultado, foram detectadas 566 sondas representando 299 genes (Anexo 6). As vinte sondas com maior correlação inversa em relação a expressão dos transcritos e níveis de metilação estão

representados na Tabela 4. Os genes foram submetidos a uma análise de formação de redes e funções biológicas.

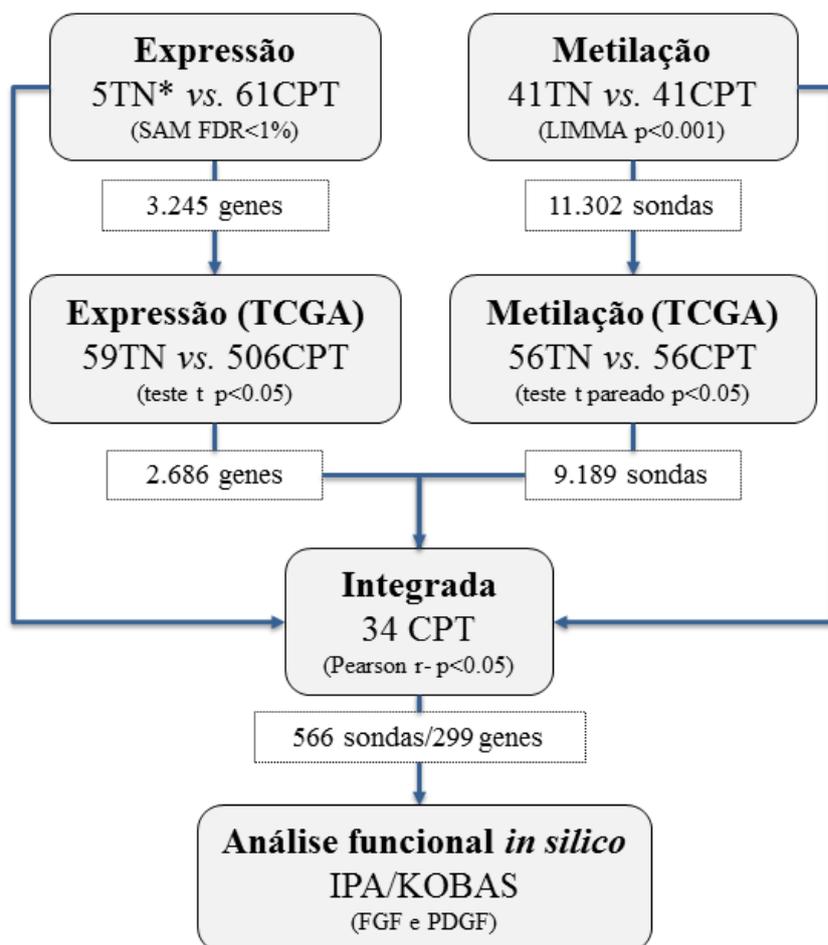


Figura 8 - Estratégia utilizada para a realização da análise integrada dos dados de metilação e expressão gênica (CPT versus TN).

Tabela 4 - Vinte principais sondas diferencialmente metiladas e genes diferencialmente expressos obtidos da análise integrada e confirmados como alterados pelo banco de dados TCGA.

SÍMBOLO GENE	ID SONDA	LOCAL	ESTUDO		TCGA		R	P
			METIL.	EXP.	METIL.	EXP.		
			$\Delta\beta$	FC	$\Delta\beta$	FC		
<i>RDH5</i>	cg17243643	1º Éxon	-0.382	3.7	-0.450	14.6	-0.791	2.54E-08
<i>EDEM1</i>	cg01815263	Corpo de Gene	-0.304	1.7	-0.277	1.6	-0.779	5.74E-08
<i>CDSN</i>	cg08424423	1º Éxon	-0.293	3.6	-0.282	8.8	-0.779	5.87E-08
<i>TACSTD2</i>	cg21536783	3'UTR	-0.286	27.4	-0.286	17.3	-0.778	6E-08
<i>RDH5</i>	cg02192520	1º Éxon	-0.420	3.7	-0.503	14.6	-0.772	8.99E-08
<i>TMEM79</i>	cg05954120	Corpo de Gene	-0.225	3.5	-0.198	4.3	-0.764	1.5E-07
<i>RDH5</i>	cg26037504	TSS1500	-0.319	3.7	-0.338	14.6	-0.762	1.69E-07
<i>CDSN</i>	cg23505644	TSS1500	-0.282	3.6	-0.260	8.8	-0.761	1.7E-07
<i>GABRB2</i>	cg25986202	Corpo de Gene	-0.189	128.7	-0.176	144.0	-0.759	1.92E-07
<i>TACSTD2</i>	cg27398499	TSS1500	-0.262	27.4	-0.282	17.3	-0.759	1.93E-07
<i>CDSN</i>	cg07384522	5'UTR	-0.270	3.6	-0.258	8.8	-0.758	2.1E-07
<i>PTPRF</i>	cg25219246	Corpo de Gene	-0.358	1.7	-0.309	1.7	-0.755	2.46E-07
<i>RDH5</i>	cg19733736	Corpo de Gene	-0.297	3.7	-0.343	14.6	-0.750	3.27E-07
<i>KIAA1462</i>	cg23731595	5'UTR	-0.312	2.0	-0.338	1.8	-0.745	4.25E-07
<i>CDSN</i>	cg06321045	TSS200	-0.292	3.6	-0.337	8.8	-0.742	5.07E-07
<i>TESC</i>	cg10856812	Corpo de Gene	-0.209	5.5	-0.242	8.5	-0.736	6.95E-07
<i>CDSN</i>	cg24735489	TSS200	-0.341	3.6	-0.292	8.8	-0.731	8.9E-07
<i>TPO</i>	cg23136645	TSS200	0.346	-6.0	0.436	-3.5	-0.728	1.07E-06
<i>ETNK2</i>	cg16545821	Corpo de Gene	-0.170	1.8	-0.207	2.8	-0.728	1.07E-06
<i>KIAA1462</i>	cg14388055	5'UTR	-0.241	2.0	-0.240	1.8	-0.727	1.09E-06

Legenda: Metil.: Metilação; Exp.: Expressão; $\Delta\beta$.: Delta beta; FC.: *Fold Change*; R: Correlação Inversa. Valores negativos de delta indicam sondas hipometiladas e valores positivos de delta indicam sondas hipermetiladas. TSS1500: dentro de 1500 pares de bases do início da região de transcrição (pertence a região promotora); TSS200: dentro de 200 pares de bases do início da região de transcrição (pertence a região promotora).

Uma análise de agrupamento não supervisionado utilizando os dados de metilação e de expressão foi realizada associando as variantes histológicas, alterações genéticas e evolução clínica. Foram identificados dois *clusters* sendo possível observar uma sobreposição entre os dados de metilação e expressão (Figura 9). O cluster cinza de metilação foi associado com maior prevalência de mutação em *BRAF*, assim como o cluster cinza de expressão (P= 0.034 e P= 0.013, respectivamente; teste exato de Fisher).

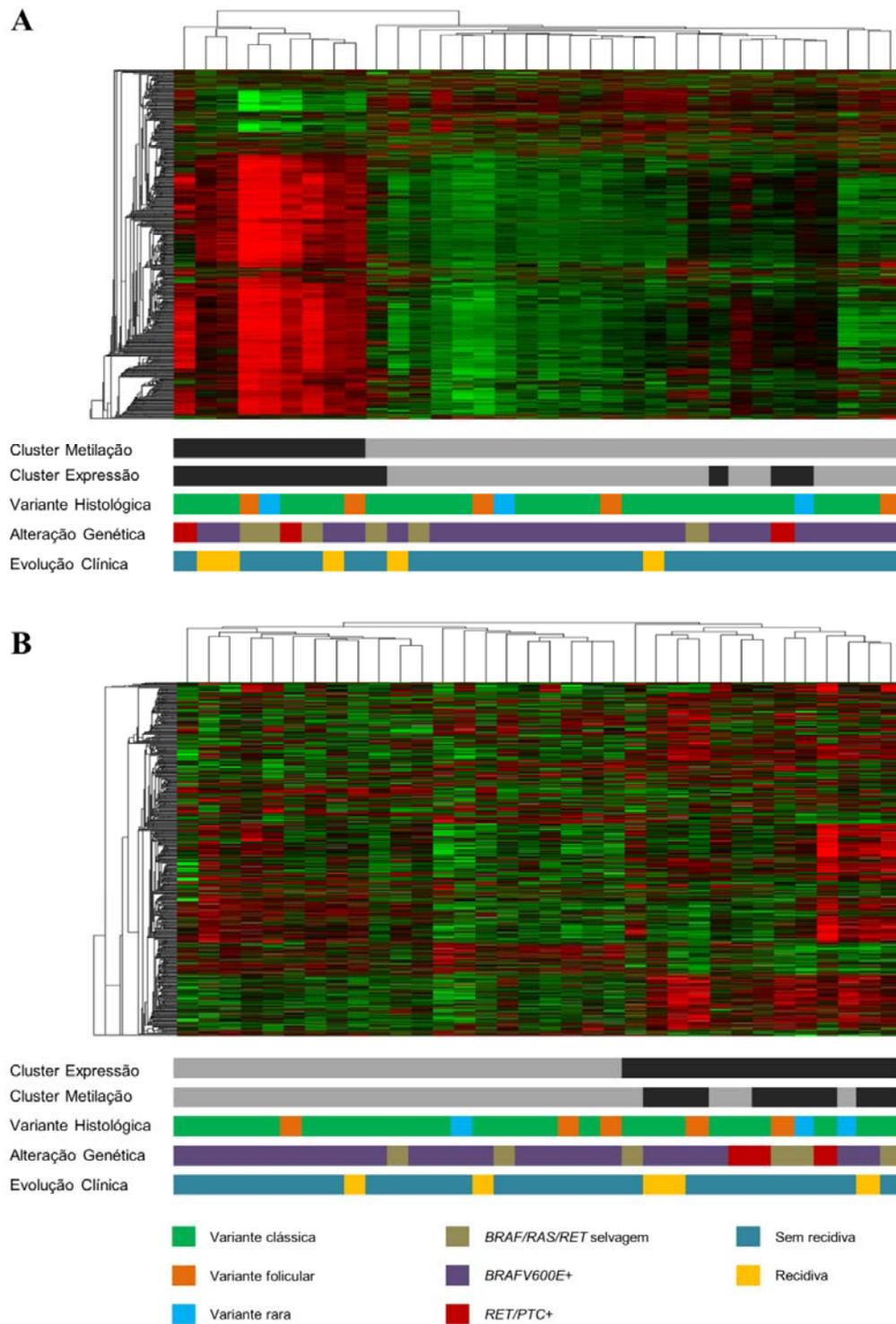


Figura 9 - Análise de agrupamento não supervisionado. Perfi de metilação (**A**) e expressão gênica (**B**) e relação com variante histológica, alteração genética (*BRAF*) e evolução clínica. O *heatmap* gerado pelo padrão de metilação (**A**) e expressão (**B**) revelou dois *clusters* (cinza e preto).

4.4 PREDIÇÃO *IN SILICO* DE VIAS ALTERADAS EM CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREOIDE

Os 299 genes identificados ao final da análise integrada foram submetidos para análise de vias canônicas pelo programa IPA (Ingenuity Pathway Analysis®) e KOBAS (*KEGG Orthology Based Annotation System* - <http://kobas.cbi.pku.edu.cn/home.do>). Foram incluídos os 3245 genes diferencialmente expressos provenientes da análise de expressão gênica às vias de sinalização identificadas como potencialmente ativadas em CPT. As principais vias alteradas pelo IPA e pelo KOBAS ($p < 0,01$) estão relacionadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Principais vias canônicas alteradas em CPT identificadas pelo programa IPA e KOBAS.

VIA CANÔNICAS					
IPA	GENES	P	KOBAS	GENES	P
Ativação de VDR/RXR	<i>IGFBP6,RXRG, COL13A1,PDGFA, RUNX2,PRKCE,CSF2</i>	1.38E-04	Regulação transcricional no câncer	<i>CSF2, DUSP6, MLLT1, HMGA2, RUNX1, RUNX2, PDGFA, BAIAP3, RXRG, SPINT1, MET</i>	8.50E-04
Fibrose hepática / Ativação de células estrelar hepática	<i>MET, COL8A2, COL13A1,PDGFA, COL23A1,FGFR2,ECE1,STAT1,IL1RAP,FGF1</i>	6.31E-04	Sinalização de FGF	<i>DUSP6, RUNX2, STAT1, IL17RD, FGFR2, FGF1, MET</i>	1.29E-03
Sinalização da endotelina-1	<i>PLCD3,MAPK4,ITPR2,PLA2R1,CAV1,PRKCE,SHC3,ECE1,GNA14</i>	9.33E-04	Transdução de sinal	<i>IRS1, GRB7, PRKCE, PDGFA, STAT1, ITPR2, FGFR2, FGF1, ERBB3</i>	1.73E-03
Depressão de longa duração	<i>PLCD3,PRKG1,ITPR2,PLA2R1,CAV1,PRKCE,GNA14,GRM4</i>	1.12E-03	Síntese de hormônio tireoidiano	<i>SLC26A4, ITPR2, CREB5, TPO, LRP2, TG</i>	3.21E-03
Sinalização de orientação axonal	<i>NRP2,PDGFA,UNC5B,EPHA4,GNA14,SEMA4C,LIMK1,MET,PLCD3,GLI3,EPHB3,PRKCE,RASSF5,EPHA2,ADAMTS5</i>	1.70E-03	Formação de colágeno	<i>CD151, COL13A1, LAMB3, CTSS, COL8A2, COL23A1</i>	4.07E-03
Sinalização de dor neuropática nos neurônios dos cornos dorsais	<i>PLCD3,KCNN4,CAMK1D,ITPR2,PRKCE,GRM4</i>	3.39E-03	Sinalização por PDGF	<i>IRS1, GRB7, PRKCE, PDGFA, STAT1, ITPR2, FGFR2, FGF1, ERBB3</i>	4.15E-03
Sinalização do receptor efrina	<i>PDGFA,EPHB3,EPHA4,GNA14,CREB5,EPHA2,FGF1,LIMK1</i>	3.98E-03	Sinalização de RAS	<i>ABL2, EPHA2, RIN1, TIAM1, RASSF5, PDGFA, SHC3, RASGRF1, FGFR2, FGF1, MET</i>	4.93E-03
Sinalização de PDGF	<i>ABL2,PDGFA,MAP3K1,CAV1,STAT1</i>	5.25E-03	Sinalização mediada pelo receptor de histamina H1	<i>GNA14, HRH1, ITPR2, PRKCE</i>	5.32E-03

Cont/ Tabela 5

IPA	GENES	P	KOBAS	GENES	P
Biossíntese II da UDP-N-acetil-D-galactosamina	<i>HK1, GALE</i>	7.08E-03	Sinalização de ERBB2 em eventos GRB7	<i>GRB7, ERBB3</i>	5.42E-03
Potenciação de longa duração	<i>PLCD3, ITPR2, PRKCE, GNA14, GRM4, CREB5</i>	7.76E-03	<i>RORA</i> <i>actives circadian expression</i>	<i>ARNTL, SREBF1</i>	5.42E-03
Sinalização de FGF	<i>MET, MAP3K1, FGFR2, CREB5, FGF1</i>	7.94E-03	Organização da matriz extracelular	<i>CD151, ICAM4, EFEMP1, LAMB3, COL13A1, ADAMTS5, PDGFA, CTSS, LRP4, COL8A2, COL23A1</i>	5.87E-03
<i>Feedback</i> de Sinalização em cAMP da dopamina-DARPP32	<i>PLCD3, PRKG1, KCNJ2, PPP1R1B, ITPR2, PRKCE, CREB5</i>	9.12E-03	Sinalização por ERBB2	<i>IRS1, GRB7, PRKCE, PDGFA, ITPR2, FGFR2, FGF1, ERBB3</i>	6.19E-03
			<i>The canonical retinoid cyclein rods</i>	<i>ABCA4, RDH5, STRA6</i>	6.23E-03
			Ativação e ligação de FGFR2b	<i>FGFR2, FGF1</i>	7.15E-03
			NGF sinalizando a via TRKA pela membrana plasmática	<i>IRS1, DUSP6, PRKCE, PDGFA, SHC3, ITPR2, FGFR2, FGF1, ERBB3</i>	8.41E-03
			Sinalização de Rap1	<i>EPHA2, TIAM1, RASSF5, PDGFA, LPAR5, MAGI1, FGFR2, FGF1, SIPA1L1, MET</i>	8.79E-03
			Metabolismo da vitamina D (calciferol)	<i>LGMN, LRP2</i>	9.09E-03
			Interações de NrCAM	<i>NRP2, NRCAM</i>	9.09E-03
			Sinalização pelo FGFR	<i>IRS1, PRKCE, PDGFA, STAT1, ITPR2, FGFR2, FGF1, ERBB3</i>	9.60E-03

Legenda: As vias destacadas em negrito foram identificadas pelos dois programas.

As principais vias potencialmente alteradas foram sinalização de FGF e PDGF. Na Figura 10 é possível visualizar as alterações de ambas as vias pelo programa IPA. Na via de sinalização do FGF, o gene *FGFR2* apresentou diminuição de expressão e hipermetilação, e os genes *MET*, *MAP3K1*, *CREB5* e *FGF1* revelaram aumento de expressão e hipometilação. Em relação à via de sinalização de PDGF todos os genes (*ABL2*, *PDGFA*, *MAP3K1*, *CAV1* e *STAT1*) apresentaram expressão aumentada e hipometilação. Nove genes (*AKT2*, *PIK3C2A*, *FGF2*, *RPS6KA5*, *ITPR1*, *FGF13*, *FGF17*, *PIK3R2* e *FGF7*) foram identificados na via de sinalização de FGF e 13 genes (*PIK3C2A*, *ABL1*, *SRF*, *INPPL1*, *PDGFC*, *FOS*, *JUN*, *INPP5F*, *SPHK1*, *CSNK2A1*, *INPP5K*, *PIK3R2* e *RASA1*) na via de sinalização de PDGF.

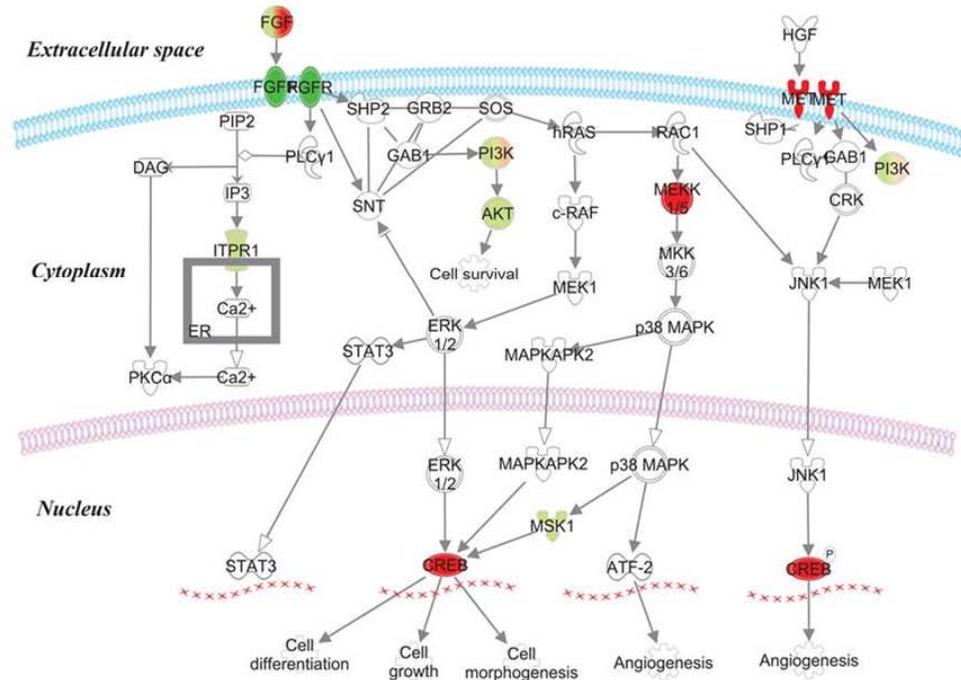
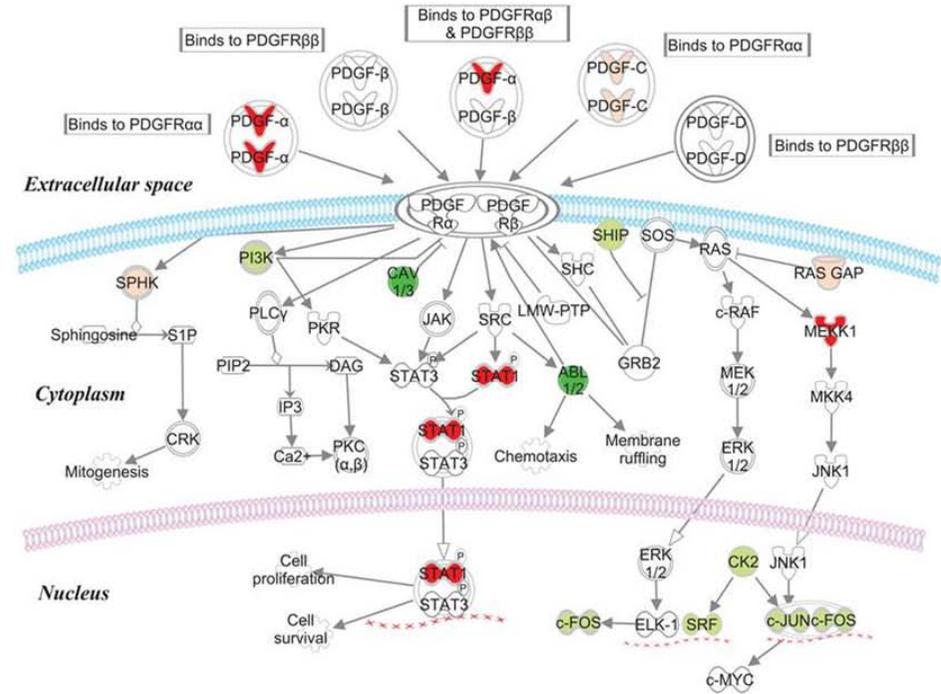
A**B**

Figura 10 - Ilustração das vias de sinalização potencialmente ativadas em CPT. **A.** Via de sinalização de FGF. **B.** Via de sinalização de PDGF. As moléculas verde escuro indicam gene com baixa expressão e hipermetilação nos CPTs, já as moléculas vermelho escuro indicam genes com aumento de expressão e hipometilação. A cor vermelho claro indica moléculas com aumento de expressão e as verdes clara indicam moléculas com diminuição de expressão. As cores verde e vermelho presentes em uma mesma molécula representam diferentes membros de uma mesma família com níveis de expressão contrários.

4.5 GENES ALTERADOS EM CPT E RELACIONADOS COM AS VIAS MAPK E PI3K

As análises deste estudo permitiram identificar genes com alterações nos níveis de metilação e expressão e participantes das vias MAPK e PI3K. Dentre os genes alterados em nosso estudo, diversos estavam presentes na via da MAPK (58 genes diferencialmente expressos e 82 diferencialmente metilados) e na via PI3K (62 genes diferencialmente expressos e 117 diferencialmente metilados). O quadro 5 apresenta todos os genes que estavam alterados em ambas as vias. Os genes *EGFR*, *FGF1*, *FGF17*, *FGFR2* e *PDGFA* apresentaram alterações nos níveis de metilação e nos níveis de expressão, no entanto apenas *FGF1*, *FGFR2* e *PDGFA* foram confirmados pelo TCGA. Além disso, foi observado que diversos membros das famílias AKT, FGF e PDGF apresentaram alterações nos níveis de metilação ou de expressão do transcrito.

Quadro 5 - Principais genes alterados nas vias MAPK e PI3K.

EXPRESSIONÃO		METILAÇÃO		
GENES	FC	GENES	REGIÃO	$\Delta\beta$
<i>AKT2</i>	Baixa expressão	<i>AKT1</i>	Corpo de gene	Hipometilado
<i>EGFR</i>	Expressão aumentada	<i>AKT3</i>	Corpo de gene	Hipometilado
<i>FGF1*</i>	Expressão aumentada	<i>EGF</i>	Corpo de gene	Hipometilado
<i>FGF2</i>	Expressão aumentada	<i>EGFR</i>	Corpo de gene	Hipometilado
<i>FGF7</i>	Baixa expressão	<i>FGF1*</i>	5'UTR	Hipometilado
<i>FGF13</i>	Baixa expressão	<i>FGF10</i>	Corpo de gene	Hipometilado
<i>FGF17</i>	Baixa expressão	<i>FGF17</i>	TSS200	Hipometilado
<i>FGFR2*</i>	Baixa expressão	<i>FGF19</i>	Corpo de gene	Hipometilado
<i>NR4A1</i>	Baixa expressão	<i>FGFR2*</i>	TSS200	Hipermetilação
<i>PDGFA*</i>	Expressão aumentada	<i>FGFR3</i>	Corpo de gene	Hipometilado
		<i>GNG12</i>	5'UTR	Hipometilado
		<i>GRB2</i>	Corpo de gene	Hipometilado
		<i>HRAS</i>	5'UTR	Hipometilado
		<i>MAPK3</i>	3'UTR	Hipometilado
		<i>PDGFA*</i>	Corpo de gene	Hipometilado
		<i>PDGFB</i>	Corpo de gene	Hipometilado
		<i>PDGFRA</i>	Corpo de gene	Hipometilado
		<i>PRKCA</i>	Corpo de gene	Hipometilado

Legenda: Os genes destacados em negrito foram identificados com níveis de expressão e de metilação alterados. *Genes confirmados pelo TCGA.

4.6 CONFIRMAÇÃO DOS ACHADOS

4.6.1 Ensaios de metilação alvo-específica por Pirosequenciamento e RT-qPCR

Os cinco genes selecionados confirmaram os resultados de metilação diferencial em amostras CPT quando comparados com o tecido não tumoral adjacente. Dentre os genes avaliados, quatro (*DNMT1*, *ERBB3*, *HMG2*, *GABRB2*) estavam hipometilados e o *SOX14* estava hipermetilado nas

amostras tumorais. No Anexo 7 é possível encontrar resumidamente os dados obtidos desta análise.

Os mesmos genes selecionados para a confirmação de metilação diferencial foram validados quanto aos níveis de expressão gênica. Foi possível encontrar expressão diferencial entre as amostras tumorais e as amostras normais. Dentre os cinco genes avaliados, o aumento de expressão de *DNMT1*, *ERBB3*, *GABRB2* e *HMGA2*, e expressão diminuída de *SOX14* foi verificado em amostras dependentes e independentes do *microarray*. Na Figura 11 é possível observar que todos os genes hipometilados apresentaram aumento na expressão do transcrito e o gene *SOX14* hipermetilado revelou diminuição na expressão gênica. Ao avaliarmos apenas as amostras de CPT investigadas por ambas as técnicas (pirosequenciamento e RT-qPCR), foi observada correlação negativa significativa para *GABRB2* ($r = -0.346$; $P = 0.010$) e *HMGA2* ($r = -0.808$; $P < 0.001$). Também foi observada correlação negativa entre a expressão gênica e o nível de metilação de *DNMT1*, *ERBB3* e *SOX14* (r de -0.168 , -0.194 e -0.054 , respectivamente), embora não significativa (P de 0.403 , 0.209 e 0.769 , respectivamente).

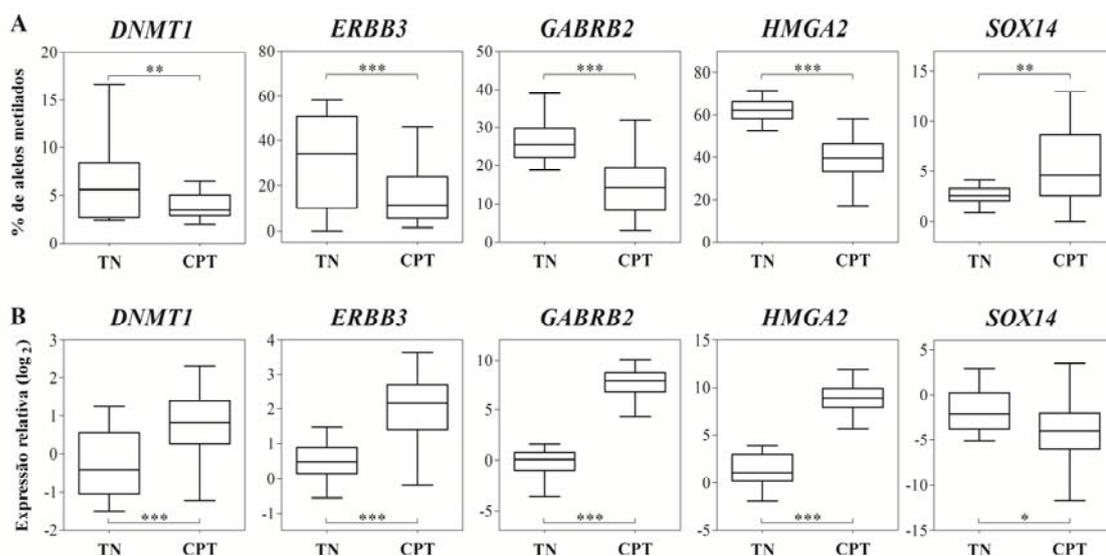
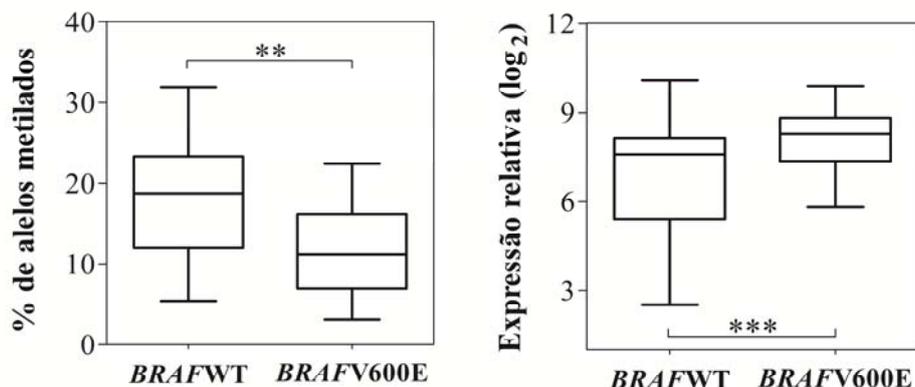


Figura 11 - Confirmação dos achados pelo método de pirosequenciamento (A) e RT-qPCR (B). **A.** A hipometilação de *DNMT1*, *ERBB3*, *GABRB2* e *HMGA2* e hipermetilação de *SOX14* nos tumores foi significativa quando comparados ao tecido não tumoral adjacente. **B.** A expressão aumentada de *DNMT1*, *ERBB3*, *GABRB2* e *HMGA2* e diminuição de expressão de *SOX14* foi observada como significativa nos tumores quando comparados ao tecido não tumoral adjacente. Os *boxplots* indicam o intervalo interquartil e a mediana. TN: Tecido tireoidiano não tumoral; CPT: Carcinoma papilífero de tireoide; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 (teste t não pareado).

4.6.2 Associação dos achados com dados clínicos e histopatológicos

Foi verificada uma associação entre o padrão de metilação do gene *GABRB2* com a presença da mutação V600E em *BRAF* e o tamanho do tumor primário. Baixos níveis de metilação deste gene foram significativamente associados com os tumores positivos para mutação em *BRAF* e com tumores maiores que 1 cm. Por outro lado, a expressão aumentada de *GABRB2* só foi significativa quando associada com a presença de mutação em *BRAF* (Figura 12).

GABRB2 vs. mutação em *BRAF*



GABRB2 vs. dimensão tumoral

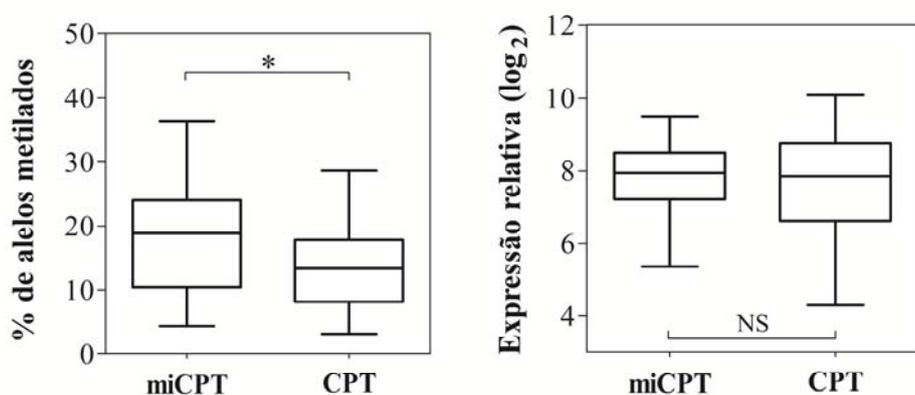


Figura 12 - Associação entre o perfil de metilação e a expressão de *GABRB2* com a presença de mutação em *BRAF* e tamanho do tumor primário. É verificado uma associação entre os baixos níveis de metilação de *GABRB2* com tumores positivos para mutação em *BRAF* e tumores maiores que 1 cm. A presença de mutação em *BRAF* foi significativamente associada com aumento de expressão de *GABRB2*. Os *boxplots* indicam o intervalo interquartil e a mediana. *BRAFWT*: amostra sem alteração em *BRAF*; *BRAFV600E*: amostra com mutação em *BRAF*; *miCPT*: Microcarcinoma papilífero de tireoide; *CPT*: Carcinoma papilífero de tireoide; * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$; *** $P < 0,01$; NS: não significativo (teste t não pareado).

4.7 ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DE ACORDO COM A MUTAÇÃO V600E EM *BRAF*

Todas as amostras tumorais foram avaliadas por pirosequenciamento para a detecção das mutações em *BRAF* (códon 600), *KRAS* (códon 12/13), *HRAS* (códon 61) e *NRAS* (códon 61). Foram consideradas *BRAF* positivas aquelas com frequência alélica superior a 10% e *BRAF* negativas aquelas com frequência alélica inferior a 10%. Entre as 42 amostras de CPT, 28 apresentaram a mutação V600E em *BRAF* e 14 foram negativas para a mutação. Não foi detectada mutação em *RAS*, entretanto a translocação de RET/PTC foi verificada em cinco amostras (BARROS-FILHO 2014). No trabalho prévio do grupo, nenhuma das alterações avaliadas foi associada com prognóstico desfavorável.

Na análise do perfil de metilação foram utilizados os 41 pares de CPT e TN que passaram pelo controle de qualidade dos dados (13 *BRAF*WT e 28 *BRAF*V600E). Foram identificadas 540 sondas com metilação diferencial, das quais 265 foram validadas pelo banco de dados do TCGA. Dentre as 51 amostras de CPT avaliadas para expressão de transcritos BARROS-FILHO (2014), 21 amostras não apresentaram a mutação V600E em *BRAF* e 40 foram encontradas mutadas. Nesta análise, 578 genes foram encontrados com expressão diferencial e 478 destes foram confirmados pelo TCGA.

Para a análise integrada foram incluídos os mesmos 34 casos avaliados pelas duas metodologias e apenas 15 sondas (13 genes) foram encontradas com alteração no status de metilação. Todas as etapas realizadas estão resumidas na Figura 13 e na Tabela 6 é possível identificar

as 15 sondas com metilação diferencial nesta análise. A análise de vias canônicas não foi realizada devido ao baixo número de genes encontrados com metilação e expressão diferencial.

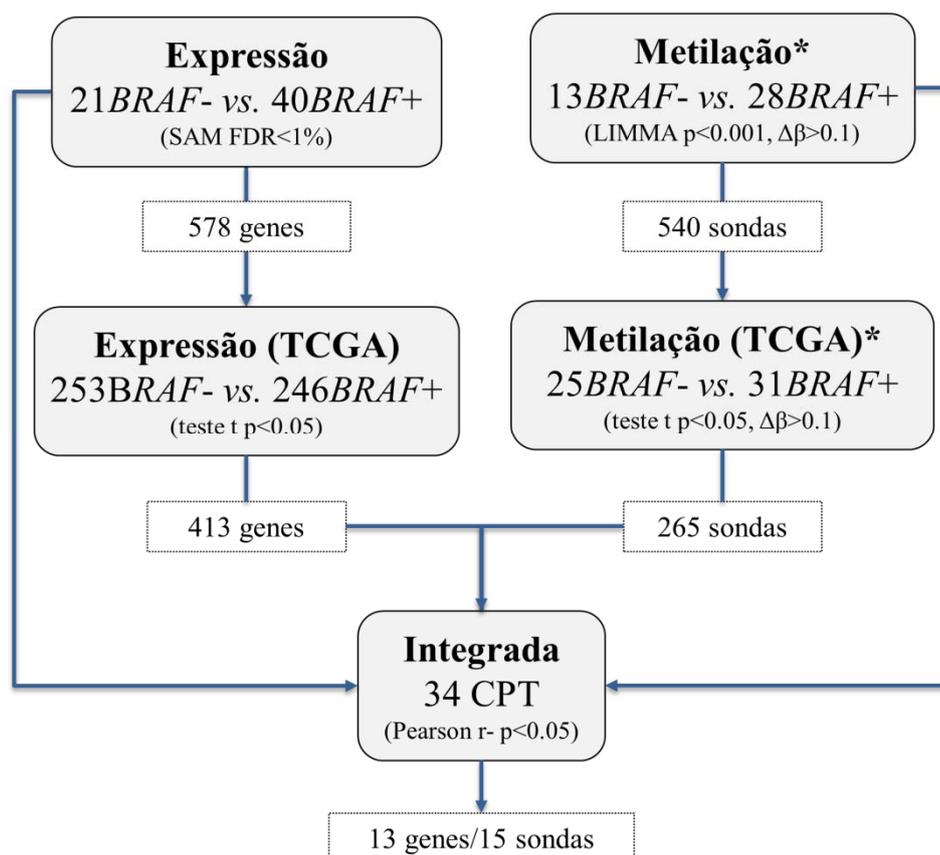


Figura 13 - Estratégia utilizada para a realização da análise integrada dos dados de metilação e expressão do estudo na comparação *BRAF*^{WT} e *BRAF*^{V600E}. *Correção da amostra tumoral pelo tecido não tumoral pareado (delta CPT-TN) antes da comparação.

Tabela 6 - Sondas diferencialmente metiladas e genes diferencialmente expressos obtidos da análise integrada de *BRAF^{WT}* vs. *BRAF^{V600E}*. Os genes apresentados foram confirmados com dados do TCGA.

GENE	ID SONDA	LOCAL	ESTUDO		TCGA		R	P
			METIL. $\Delta\beta$	EXP . FC	METI L. $\Delta\beta$	EXP. FC		
<i>TACSTD2</i>	cg21536783	3'UTR	-0.189	3.0	-0.250	2.8	-0.747	3.87E-07
<i>GJB3</i>	cg07999953	5'UTR	-0.228	1.9	-0.387	2.2	-0.659	2.27E-05
<i>KLK6</i>	cg18967533	TSS1500	-0.146	4.1	-0.159	2.4	-0.635	5.45E-05
<i>BHLHE41</i>	cg25629905	3'UTR	-0.173	1.9	-0.134	1.7	-0.614	1.11E-04
<i>INF2</i>	cg23998240	5'UTR	-0.172	1.5	-0.214	1.5	-0.601	1.70E-04
<i>KLK6</i>	cg18552334	TSS1500	-0.115	4.1	-0.133	2.4	-0.579	3.37E-04
<i>CDSN</i>	cg24735489	TSS200	-0.166	2.7	-0.226	2.4	-0.561	5.65E-04
<i>ARNTL</i>	cg01055121	Corpo de Gene	-0.242	1.6	-0.241	2.1	-0.556	6.37E-04
<i>C14orf43</i>	cg15499560	Corpo de Gene	-0.197	1.4	-0.257	1.1	-0.554	6.79E-04
<i>GJB3</i>	cg06375539	5'UTR	-0.108	1.9	-0.185	2.2	-0.55	7.53E-04
<i>CXXC5</i>	cg04104695	5'UTR	-0.167	1.6	-0.131	1.3	-0.509	2.12E-03
<i>TM7SF4</i>	cg01136183	TSS1500	-0.204	3.3	-0.334	3.0	-0.452	7.35E-03
<i>RAB15</i>	cg09314734	Corpo de Gene	-0.138	1.7	-0.142	1.1	-0.428	1.15E-02
<i>OVOL1</i>	cg10758902	Corpo de Gene	-0.178	1.6	-0.223	1.2	-0.416	1.43E-02
<i>INPP5F</i>	cg09915729	Corpo de Gene	-0.139	1.3	-0.131	1.3	-0.398	1.99E-02

5 DISCUSSÃO

Desde a descoberta de alterações genéticas associadas ao câncer, inúmeros estudos vêm sendo realizados em busca de compreender melhor a biologia molecular da doença. No entanto, já é sabido que embora as alterações genéticas tenham papel fundamental no processo de tumorigênese, a origem e a progressão do câncer ocorrem pelo acúmulo gradual de alterações genéticas e epigenéticas (BAYLIN e JONES 2011; NIKIFOROV e NIKIFOROVA 2011; GOMBERAWALLA e ELARAJ 2014). Ao longo das últimas décadas os eventos epigenéticos, em especial a metilação do DNA, ganhou grande importância na pesquisa do câncer, pois muitos genes supressores tumorais são silenciados e muitos oncogenes são ativados por meio deste mecanismo (EGGER et al. 2004; JONES e BAYLIN 2007).

Em relação ao câncer de tireoide, já foi demonstrado que a diferenciação e progressão das células são influenciadas por alterações epigenéticas (KONDO et al. 2008). A maioria dos estudos direcionados para a compreensão dos mecanismos epigenéticos aberrante neste tipo de câncer utilizou estratégias de genes candidatos afim de verificar o padrão de metilação de DNA alterado (Quadro 1). Ainda há poucos relatos em literatura que utilizaram abordagens baseadas em análise globais em CPT e os existentes possuem limitações em relação ao número amostral, subtipo histológico, cobertura da plataforma e tecidos normais avaliados (KIKUCHI

et al. 2013; MANCIKOVA et al. 2013; RODRÍGUEZ-RODERO et al. 2013; ELLIS et al. 2014).

Em nosso estudo foi utilizada uma plataforma com uma grande cobertura (>480.000 dinucleotídeos CpG distribuídos por todo genoma) para avaliar o perfil de metilação em amostras de CPT pareados com TN adjacente. Ao contrário dos demais relatos em literatura associando o câncer de tireoide com a metilação do DNA, todas as amostras tumorais foram pareadas com tecido não tumoral adjacente, pois o uso de amostra (não tumoral/tumoral) do mesmo indivíduo elimina o viés causado pela variação de idade, diferenças genéticas e interação com meio ambiente, fatores estes que poderiam influenciar nos resultados (IACOBUZIO-DONAHUE 2009).

Nossos achados revelaram uma grande quantidade de sítios CpG com metilação diferencial (2% das sondas representadas pela plataforma) e uma hipometilação global (86% das sondas com perda de metilação) nas amostras de CPT quando comparadas com o tecido não tumoral adjacente. ELLIS et al. (2014), utilizando a mesma plataforma deste estudo para avaliar o papel da metilação em CPT, encontraram metilação diferencial em apenas 0,58% das sondas representadas pela plataforma e, ainda assim, relataram uma hipometilação global nos tumores (91% das sondas hipometiladas).

O processo tumoral ocorre pela coexistência de hipometilação genômica e hipermetilação de ilhas CpG em regiões promotoras de genes específicos (EHRlich 2002; FEINBERG 2007; PORTELA e ESTELLER 2010). Ao passo que há amplo conhecimento da importância da hipermetilação em regiões promotoras de genes supressores tumorais, o

significado biológico da hipometilação do DNA associada ao câncer ainda não é totalmente esclarecida (EHLICH 2002; EHLICH e LACEY 2013).

Os resultados similares aos do presente estudo quanto a hipometilação relatados por ELLIS et al. (2014), também foram descritos por MANCIKOVA et al. (2013). Os autores utilizando uma plataforma de menor cobertura (27,000 dinucleotídeos CpG relataram 51 genes hipometilados *versus* 31 genes hipermetilados em CPT. Em conjunto, estes achados indicam que a hipometilação tem um papel importante no processo de carcinogênese da tireoide.

Nesse estudo, quando levamos em consideração somente as ilhas CpG, também foi observado um maior número de sítios hipermetilados (13%) em relação aos hipometilados (3%). RODRÍGUEZ-RODERO et al. (2013) e MANCIKOVA et al. (2013) também encontraram maior hipermetilação em ilhas CpG e hipometilação em regiões pobres em CpG em CPT. Num contexto global, foi observado em nosso estudo que a maioria das sondas com metilação diferencial estava em regiões distantes de ilhas CpG e em regiões não promotoras. Embora a maioria das sondas distribuídas pela plataforma também esteja mapeada nessas regiões (69% e 59%, respectivamente), os nossos resultados concordam com os estudos relatados em literatura caracterizando os tumores papilíferos de tireoide como globalmente hipometilados.

As ilhas CpG são comumente encontradas em regiões promotoras de genes e estão associadas com a repressão da transcrição gênica, no entanto, elas também podem estar localizadas em corpo de genes e

desertos gênicos, embora não se saiba sua função nessas regiões (JONES 2012). No presente estudo, uma parte considerável (38%) das sondas diferencialmente metiladas estavam presentes em corpo de genes. Alguns relatos em literatura sugerem que mudanças de metilação em corpo de genes tem uma importância biológica no desenvolvimento de tumores e podem potencialmente silenciar promotores alternativos, retrotransposons e outros elementos funcionais para manter a eficiência da transcrição (MAUNAKEA et al. 2010; KULIS et al. 2012; VARLEY et al. 2013).

Ao avaliarem o papel da metilação no desenvolvimento de leucemias, KULIS et al. (2012) encontraram uma grande quantidade de CpG hipometilados em corpo de genes que foram significativamente correlacionados com a expressão gênica. No nosso estudo, a análise integrada revelou 295 sondas diferencialmente metiladas (177 genes) localizadas em corpo de genes, as quais apresentaram correlação inversa com a expressão das mesmas sequências. Destas, 234 sondas foram hipometiladas (137 genes com expressão aumentada) e 61 sondas foram hipermetiladas (40 genes com expressão diminuída). No Anexo 8 estão apresentados os 34 genes que além de apresentarem sondas com metilação diferencial em corpo de gene também apresentam sondas diferencialmente metiladas em outras regiões, como em 5'UTR, 1º éxon e em regiões promotoras indicando que poderia haver um efeito cooperativo entre eles. Acredita-se que a metilação em corpo de genes também tenha um efeito regulatório nos níveis de expressão gênica. LOU et al. (2014) avaliando os dados absolutos de CpGs metilados distribuídos no genoma, concluíram que

o ganho acentuado de metilação no corpo de gene é suficiente para diminuir os níveis de expressão, mostrando a importância de se analisar não somente regiões promotoras, mas também regiões ainda pouco conhecidas.

Entre os genes localizados em corpo de genes, o *EDEM1* foi o que apresentou maior correlação inversa significativa (perda de metilação e aumento dos níveis de expressão). Esse gene codifica *Endoplasmic Reticulum Degradation Enhancing α -Mannosidase-like*, uma proteína transmembrânica do retículo endoplasmático envolvida no processo de degradação de glicoproteínas “*misfolded*”/ “*unfolded*” (mal dobradas) . A ativação dessa proteína reforça a degradação de glicoproteínas que apresentam o oligossacarídeo *Man8-NAc-Mannoctaose-di-N-Acetyl-D-Glucosamine*, encaminhando-as para um complexo de degradação, os proteossomos (WILHOVSKY et al. 2000; TSAI et al. 2002; ODA et al. 2003). Tal mecanismo é conhecido como degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD) (HAMPTON 2002). A expressão aumentada de proteínas específicas (GRP78, Xbp1, Atf6) envolvidas na resposta de proteínas mal dobradas tem sido relatada em diversos tipos de câncer (mama, cólon, adenocarcinoma e hepatocarcinomas), no entanto não está completamente caracterizado seu papel em diferentes tumores, assim como, a maneira pela qual as células tumorais se adaptam ao estresse do retículo endoplasmático (HEALY et al. 2009). Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro relato dando evidências de alterações epigenéticas que podem atuar no processo de resposta a proteínas mal dobradas no câncer de tireoide.

A análise integrada tem como objetivo identificar genes que possam servir como importantes indicadores prognósticos e potenciais alvos terapêuticos, os denominados *drivers* moleculares (MINNING et al. 2014). Os dados obtidos na análise integrada foram submetidos a uma análise *in silico* utilizando o banco de dados do TCGA para confirmação dos achados. Um significativo número de sondas e genes (9.189 e 2.686, respectivamente) encontrados no estudo foi confirmado pelos dados disponíveis nesse banco, dando evidências de que a metilação neste subconjunto de genes dirige a expressão diferencial dos transcritos desempenhando um papel fundamental em CPT.

Um estudo realizado em 496 amostras de CPT publicado recentemente pelo TCGA revelou o papel de muitas alterações envolvidas no desenvolvimento e progressão deste tumor (Cancer Genome Atlas Research Network 2014). As análises de variantes genômicas, expressão de transcritos e metilação do DNA identificaram diferentes *drivers* moleculares. A análise de clusterização não supervisionada utilizando os dados de metilação identificaram quatro clusters distintos de CPT classificados como folicular, ilhas CpGs metiladas, clássico 1 e clássico 2, e dois meta-clusters maiores de acordo com as mutações *drivers* encontradas, incluindo a *BRAF* V600E e *RAS*.

Foram identificados em nossas análises diversos genes participantes de vias metabólicas que potencialmente influenciam na tumorigênese da tireoide e no processo de regulação epigenética. No entanto, para confirmação dos achados foram selecionados cinco genes (*DNMT1*, *ERBB2*,

GABRB2, *HMGA2* e *SOX14*) biologicamente relevantes levando em consideração as análises de metilação e integrada dos grupos CPT e TN como principal foco do trabalho.

A enzima DNA metil-transferase 1 (*DNMT1*) desempenha um papel fundamental na regulação e manutenção dos padrões de metilação de tecidos específicos e pode conseqüentemente levar a alterações na expressão de diferentes transcritos. O aumento da expressão do gene *DNMT1* já foi observado em tumores gástricos HE et al. (2013) e colo uterino (LUCZAK et al. 2012). Um estudo realizado por YAGINUDDIN et al. (2009) em linhagens celulares de câncer de próstata mostrou que o silenciamento de *DNMT1* leva a um aumento na migração e invasão celular, sendo portanto considerado um indicador de pior prognóstico. Os resultados obtidos em nosso estudo revelou que o gene *DNMT1* parece perder metilação ($\Delta\beta = -0.313$) em CPT. Para o nosso conhecimento, essa alteração ainda não foi descrita em câncer de tireoide. Entretanto, pode haver uma associação entre a hipometilação do *DNMT1* e o desenvolvimento de CPT, já que este gene é responsável pela manutenção do padrão epigenético de inúmeros genes e pode potencialmente levar a hipermetilação de genes supressores tumorais. Apesar da sonda diferencialmente metilada estar associada a região de ilha CpG estendida (*shore*) mapeada no corpo do gene (Anexo 5), foi verificado aumento significativo dos níveis de expressão de *DNMT1* pela técnica de RT-qPCR e uma correlação não significativa entre os dados ($r = -0.168$; $p = 0.403$). Nossos dados reforçam os dados de KULIS et al. (2012) que mostraram que a metilação em corpo de genes deve

ter uma importante contribuição no desenvolvimento de tumores. A hipometilação e aumento de expressão de *DNMT1* já foi relatada previamente em gliomas (RAJENDRAN et al. 2011), no entanto este parece ser o primeiro relato dessas alterações em CPT.

As proteínas SOX são bastante conhecidas por atuarem em conjunto com outros fatores de transcrição a fim de influenciar a expressão de seus genes-alvos. O *SOX14* codifica um fator de transcrição importante na regulação do desenvolvimento embrionário e na especialização celular durante o desenvolvimento (ARSIC et al. 1998). Esse gene foi associado a duas síndromes craniofaciais (WILMORE et al. 2000), além de ter sido relatado com alteração no padrão de metilação em leucemia linfótica crônica (TONG et al. 2010) e em carcinoma cervical (SENCENKO et al. 2013). Este último estudo sugeriu que *SOX14* pode ser potencialmente utilizado como discriminador entre câncer cervical e adenomas cervicais. Nossos dados revelaram uma hipermetilação ($\Delta\beta = 0.140$) em *SOX14* (localizado em ilha CpG) e, embora este gene não tenha sido identificado no estudo prévio do grupo na análise de microarray para expressão, ele foi confirmado como alterado pelas análises de pirosequenciamento e RT-qPCR. Para o nosso conhecimento este é o primeiro estudo relatando alteração no status de metilação de *SOX14* em CPT.

Outro gene validado por pirosequenciamento e RT-qPCR neste estudo foi o *ERBB3*. Frequentemente é observado a co-expressão de *ERBB3* com outros receptores tirosina-quinase em células tumorais, principalmente genes responsáveis pela ativação aberrante da via de

sinalização PI3K/Akt (CITRI e YARDEN 2006; MA et al. 2014). Em relação ao câncer de tireoide as principais vias de ativação desreguladas são a MAPK e PI3K/Akt (XING et al. 2013). A expressão anormal de receptores da família ERBB foi associada ao desenvolvimento de diversos carcinomas (OLAYIOYE et al. 2000; BASELGA e SWAIN 2009; HYNES e MACDONALD 2009). Essa ativação oncogênica (erbB3/PI3K/Akt) tem papel fundamental na resistência ao tratamento AMIN et al. (2010) e já foi relatada em tumores de mama com amplificação de *ERBB2* (LEE-HOEFLICH et al. 2008), tumores de próstata resistentes à terapia hormonal (JATHAL et al. 2011), câncer de ovário resistente à platina (SHENG et al. 2010) e câncer de pulmão de células pequenas resistentes a inibidores de *EGFR* (HUANG et al. 2013). A expressão aumentada de *ERBB3* foi associada à mutação V600E em *BRAF* em um estudo prévio do grupo (BARROS-FILHO 2014). A expressão aumentada de *ERBB3* também foi associada com a resistência de inibidores de RAF/MEK no tratamento de melanoma, cujo inibidor PLX4720 parece aumentar a expressão de *ERBB3* por meio do aumento do fator de transcrição FOXD3 (ABEL et al. 2013). O aumento na expressão do *ERBB3* também foi relatado em carcinomas de tireoide, cuja inibição de RAF com vemurafenib (PLX4032) induz a transcrição de *ERBB3* por meio de uma diminuição dos repressores de transcrição da proteína de ligação C-terminal 1 e 2 (CtBP1 / 2) nos promotores (MONTERO-CONDE et al. 2013). Uma nova estratégia para inibir a sinalização de *ERBB3* ou reduzir os níveis de sua proteína, em combinação com os inibidores da RAF, pode apresentar melhora na eficácia do tratamento (MA et al. 2014). Nosso estudo

demonstrou que os níveis aumentados de expressão do *ERBB3* estão relacionados com a perda de metilação deste gene e portanto, novas estratégias de terapia para esses tumores podem ser delineadas baseadas nestes achados.

No estudo prévio do grupo conduzido por BARROS-FILHO (2014) o gene *GABRB2* apresentou expressão aumentada em CPT nas análises de *microarray* e na análise comparada com dados externos foi o transcrito mais importante. Uma análise combinada com os dados do presente estudo revelou que o aumento de expressão foi correlacionado negativamente (-0.759) com a hipometilação do gene. O gene *GABRB2* (mapeado em 5q34) codifica o receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA) subunidade beta-2 que fica em torno de um canal iônico (Cl⁻) e é aberto a partir da ligação de GABA, um neurotransmissor de ação inibitória (WEI et al. 2003, MOKRAB et al. 2007). O GABA e seus receptores também estão presentes em tecidos periféricos não neurais e de órgãos e participam na proliferação de vários tipos de células e tecidos normais, indicando que este ácido exerce outros efeitos fisiológicos além de neurotransmissão de propriedade inibitória podendo ter um papel crítico em células tumorais (WATANABE et al. 2006, ZHANG et al. 2013). Apenas um estudo realizado por WISEMAN et al. (2013) relatou o gene *GABRB2* com expressão aumentada em carcinomas de tireoide.

Nosso estudo também revelou o papel da metilação como regulador epigenético na modulação gênica do gene *HMGA2* em CPT. As proteínas de alta mobilidade do grupo A (*high mobility group A* - HMGA) participam da

estrutura arquitetônica da cromatina ligando-se a sequências do DNA rica em dinucleotídeos AT por meio de três curtas repetições básicas, os “*AT-hook*”, que ficam na região N-terminal das proteínas. Essas proteínas podem agir como um fator de regulação transcricional por meio de sua interação com a maquinaria de transcrição podendo alterar a estrutura da cromatina e, assim, regular a atividade de vários genes, reforçando ou suprimindo a capacidade de mais ativadores e repressores de transcrição (CHIAPPETTA et al. 2008). Os níveis de expressão dessas proteínas são altos durante a embriogênese e baixos na vida adulta, e já foi descrito que o aumento da expressão dessas proteínas em tecidos adultos está associado com diversas neoplasias malignas, incluindo o câncer colorretal, de próstata, cérvix, pulmão, tireoide e mama (BERLINGIERI et al. 1995; SCALA et al. 2000; BERLINGIERI et al. 2002). A expressão aumentada de *HMGA* (1a, 1b e 2) foi associada com a presença de um fenótipo altamente maligno em células epiteliais e fibroblastos da tireoide de ratos (CHIAPPETTA et al. 1995). CHIAPPETTA et al. (2008) relataram altos níveis de expressão da proteína *HMGA2* em amostras de CPT, dentre outros tipos histológicos do tumor, quando comparados com tecido normal e sugeriram uma indução de alguns microRNAs envolvidos na regulação deste gene. Embora possa haver aumento da expressão de *HMGA2* em outros tipos histológicos notou-se que é muito maior em CPT (ARORA et al. 2009) e foi considerado um potencial marcador diagnóstico capaz de auxiliar no diagnóstico de lesões malignas de tireoide que tem a citologia suspeita ou indeterminada (BELGE et al. 2008; CHIAPPETTA et al. 2008; PRASAD et al. 2012). No presente estudo,

este gene apresentou perda de metilação associada ao aumento de expressão. Em um estudo prévio do grupo realizado por Barros-Filho (2014) o aumento de expressão de *HMGA2* apesar de apresentar alta sensibilidade e especificidade como marcador único por RT-qPCR, não foi suficiente para diferenciar lesões malignas de benignas. Entretanto, ao combinar esse gene com *LAMB3* e *CLDN10*, foi possível distinguir lesões malignas de benignas com 94% de sensibilidade e 96% de especificidade, respectivamente.

Estes genes alterados desempenham um papel crucial nas funções metabólicas, moleculares e celulares no desenvolvimento de CPT como sugerido pela nossa análise de vias e funções biológicas (KOBAS e IPA). As análises funcionais *in silico* com os genes alterados permitiram a identificação de vias canônicas alteradas no CPT, dentre as principais estão às vias de sinalização em PDGF e FGF.

Os fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e seus receptores são importantes na regulação do crescimento e sobrevivência de alguns tipos de células durante o desenvolvimento embrionário e no reparo de tecidos em adultos (HELDIN 2013a). A ativação da via PDGF induz a proliferação e sobrevivência celular, bem como a reorganização da actina e migração celular (HELDIN 2013b). Uma atividade aumentada na sinalização dessa via pode levar ao desenvolvimento de tumores (PIETRAS et al. 2003) e, portanto, esta já é alvo de drogas terapêuticas. Estão sendo desenvolvidos antagonistas de sinalização de PDGF a fim de bloquear a sinalização desta via. Estes inibidores podem se ligar a isoformas de PDGF e assim prevenir a sua ligação aos receptores de sinalização ou se ligar aos

receptores e impedir sua ativação ou promover sua degradação (GREEN et al. 1996, HAWTHORNE et al. 2008). Alguns inibidores de receptores quinases, com baixo peso molecular, estão em avaliação clínica para diversos tumores, incluindo sunitinib, pazopanib e sorafenib para câncer de pulmão de células não pequenas (SOCINSKI 2011) e ponatinib para câncer medular de tireoide com mutação em *RET* DE FALCO et al. (2013), no entanto, tais moléculas não são específicas, portanto diferentes quinases podem ser inibidas além dos receptores da via PDGF. Segundo WEINSTEIN e JOE (2008), a inibição de diferentes vias pode ser vantajosa no tratamento de tumores, uma vez que isto pode induzir a apoptose das células tumorais.

A expressão aumentada de *PDGF-A* e *PDGFR- α* no tumor de Wilms foi associada com bom prognóstico GHANEM et al. (2010), no entanto o contrário foi demonstrado em carcinomas de mama SEYMOUR et al. (1993), ovário HENRIKSEN et al. (1993) e pulmão TAKANAMI et al. (1995). O gene *PDGF-A* está envolvido nas vias MAPK e PI3K e em nosso estudo foi encontrado com expressão aumentada associada à hipometilação ($r= 0,418$) sugerindo que esse gene participa na ativação aberrante dessas vias e pode levar ao desenvolvimento de CPT. Malkomes et al. (2011) encontraram aumento de expressão de *PDGF-A*, *PDGF-B* e *PDGF-C* e seus receptores confirmando que estes genes parecem ter um papel crucial no desenvolvimento de nódulos de tireoide e bóciós recorrentes. Além disso, o aumento na expressão de *PDGFR α* em CPT já foi associado com metástases linfonodais (ZHANG et al. 2012). Portanto, a expressão aumentada de ligantes do *PDGF- α* também pode estar envolvida na

progressão de células tumorais em CPT, uma vez que o processo de angiogênese é estimulado por fatores de crescimento como VEGF, TGF β , FGF e PDGF (KERBEL 2008).

O FGF é um fator de crescimento de fibroblastos que participa da morfogênese atuando na proliferação, diferenciação e migração celular, e em adultos tem um papel importante no reparo de tecido, cicatrização de feridas e na angiogênese. Esses fatores contribuem para o desenvolvimento e progressão do tumor e medeiam suas respostas celulares pela ligação e ativação aos seus receptores de superfície celular, que por sua vez podem ativar muitas cascatas de transdução de sinal (POWERS et al. 2000). Nós encontramos diversos membros da família de FGF (*FGF1*, *FGF2*, *FGF7*, *FGF10*, *FGF13*, *FGF17*, *FGF19*, *FGFR2* e *FGFR3*) com expressão e metilação alteradas, sendo que dois deles (*FGF1* e *FGFR2*) apresentaram correlação inversa na análise integrada. Estes resultados sugerem que a metilação dirige a expressão diferencial desses genes. Todos os componentes da via de sinalização de FGF, desde os fatores de crescimento até os fatores de transcrição, são oncoproteínas potenciais. Em nosso estudo foi demonstrada a participação de genes nas principais vias associadas ao desenvolvimento de CPT (Quadro 5) sugerindo que a perda de sua regulação pode promover o crescimento celular descontrolado em CPT. Uma nova terapêutica envolvendo inibidores dessa via pode ser promissora no tratamento de tumores papilíferos de tireoide.

Em relação à análise integrada do presente estudo comparando o CPT com seu tecido não tumoral adjacente, foram identificadas 474 sondas

com perda de metilação e 92 sondas com ganho de metilação, representando, respectivamente, 243 genes com aumento de expressão e 57 genes com expressão diminuída.

O presente estudo revelou o ganho de metilação no gene *TPO*, cuja sequência metilada está localizada dentro do sítio de início de transcrição e essa hipermetilação foi significativamente correlacionada com a perda de expressão ($r=-0,727$; $p= 1.07E^{-06}$). Esse gene codifica uma peroxidase da tireoide atuando como uma glicoproteína ligada à membrana que age como uma enzima e desempenha um papel central na função da glândula tireoide, participando da biossíntese dos hormônios T3 e T4 (DI CRISTOFARO et al. 2006). Esse gene também foi encontrado com baixa expressão em diversos tumores de tireoide, em amostras de CPT, em CPT associados com mutação em *BRAF* e com hipermetilação na região promotora (HUANG et al. 2001; DI CRISTOFARO et al. 2006; DURANTE et al. 2007; SCHULTEN et al. 2015). Os estudos associando a baixa expressão de *TPO* com a mutação em *BRAF* são consistentes com os relatos de que tumores que apresentam a mutação *BRAFV600E* são hipofuncionantes na captura de iodo devido à baixa regulação de vias participantes na produção de hormônios da tireoide (HUANG et al. 2001, XING 2013).

Devido a alta frequência da mutação *BRAF* em CPT e sua associação com desdiferenciação tumoral e resistência à terapia de iodo radioativo, diversos inibidores como o BAY 43-9006 (WAN et al. 2004; BAUDIN e SCHLUMBERGUER 2007; ESPINOSA et al. 2007), PLX4720 (NUCERA et al. 2011), AAL-81 e LBT-613 (OUYANG et al. 2006) foram reconhecidos e

testados como potenciais alvos terapêuticos. Para o desenvolvimento de terapias baseadas nesta mutação é fundamental compreender quais são seus principais alvos e entender como essas alterações podem influenciar no desenvolvimento tumoral. Sugere-se que algumas alterações no padrão de metilação de diversos genes envolvidos em funções celulares vitais em CPT são dirigidas pela mutação em *BRAF* (OMUR e BARAN 2014) e isso deve ter um impacto significativo no comportamento das células tumorais.

O estudo de metilação global do DNA em CPT com a alteração V600E em *BRAF* pode revelar um mecanismo de tumorigênese ainda não bem compreendido promovido pela mutação. Alguns estudos de HOU et al. (2011) e MANCIKOVA et al. (2013) de metiloma em CPT já direcionaram sua atenção para esta temática. Estes estudos encontraram uma hipometilação global nas amostras tumorais positivas para a mutação, concordando com os nossos resultados cuja maioria das sondas perdeu metilação (398 hipometiladas e 141 hipermetiladas). Estes dados revelam que as células sofrem alterações no padrão de metilação causado pela pressão seletiva associada com a presença da mutação.

A hipometilação gênica tem sido relativamente pouco estudada, especialmente em CPT associados à mutação V600E em *BRAF*. A importância da hipometilação promovida pela mutação em *BRAF* fica ainda mais evidente quando foi realizada a integração dos dados de metilação com os de expressão de transcritos. Todos os genes identificados na análise integrada utilizando os dados de mutação em *BRAF* e que foram

confirmados como alterados pelo TCGA apresentaram hipometilação e aumento na expressão dos transcritos.

Um gene recentemente descrito como alterado em CPT, *TACSTD2*, foi identificado no presente estudo com aumento de expressão e hipometilação. O *TACSTD2* é altamente expresso em células trofoblásticas, no entanto perde sua expressão em células normais adultas (RIPANI et al. 1998). Este gene foi relatado como um importante marcador diagnóstico e prognóstico em CPT (ADDATI et al. 2014) por apresentar aumento de expressão nas células tumorais. A glicoproteína de membrana codificada por este gene atua como um receptor de superfície na transdução de sinalização de cálcio para dentro da célula e possui uma região de repetição como a tireoglobulina (LIU et al. 2014). Estes dados sugerem que pode ocorrer algum tipo de influência nos processos metabólicos e a promoção do estímulo do crescimento tumoral tireoidiano. *TACSTD2* apresentou alterações significativas na análise integrada deste estudo, considerando ou não a mutação em *BRAF*. Na comparação CPT com TN cinco sondas hipometiladas foram significativamente correlacionados com aumento de expressão deste gene e duas delas estão entre as vinte principais sondas com maior correlação inversa ($r=-0.778$ e $r=-0.759$). Além disso, na análise integrada usando a comparação *BRAFWT* e *BRAFV600E* este gene apresentou maior correlação inversa ($r=-0.747$). Embora no estudo de Addati et al. (2014) este gene não tenha apresentado alta especificidade como marcador diagnóstico em tumores com a mutação em *BRAF*, nossos dados

reforçam a importância deste gene como marcador em CPT e sugere um papel fundamental em tumores positivos para a mutação.

Os resultados apresentados neste estudo confirmaram achados importantes já descritos em literatura e também revelaram novos genes e vias relacionadas ao carcinoma de tireoide. Em especial, os níveis de metilação e expressão dos genes *DNMT1*, *ERBB3*, *GABRB2*, *HMGA2* e *SOX14* foram confirmados e validados em um grupo de amostras independentes. O gene *GABRB2* foi associado com a presença de mutação em *BRAF* e tamanho tumoral e é um potencial marcador molecular em CPT.

6 CONCLUSÃO

- ✓ A análise do metiloma revelou que 2% das sondas analisadas apresentaram metilação diferencial em CPT;
- ✓ A análise do perfil de metilação revelou um maior número de sondas hipometiladas em CPT quando comparadas com TN sugerindo que a perda de metilação tem um papel importante no processo de tumorigênese da tireoide confirmando dados prévios da literatura;
- ✓ A análise do perfil de metilação segundo a presença ou ausência da mutação *BRAFV600E* revelou que os tumores com a mutação apresentam alterações nos níveis de metilação e que esta mutação é um potencial modificador do perfil epigenético dos CPTs;
- ✓ A comparação com o banco de dados externos TCGA permitiu confirmar o envolvimento de diversos genes alterados por metilação e expressão de transcritos;
- ✓ A análise integrada entre os dados de expressão de transcritos e metilação revelou uma correlação inversa em um número significativo de sondas, indicando que mecanismos epigenéticos regulam a expressão gênica e que alterações nos níveis de metilação de CPT levam a uma expressão diferencial de genes;

- ✓ A análise de vias canônicas revelou duas principais vias (PDGF e FGF) desreguladas em CPT relacionadas à proliferação, sobrevivência e migração celular. A ativação aberrante dessas vias parece promover a proliferação e progressão de células tumorais em CPT, sendo, portanto, alvos para futuros estudos.
- ✓ Os genes *DNMT1*, *ERBB3*, *GABRB2*, *HMGA2* e *SOX14* foram confirmados como alterados pelas técnicas de pirosequenciamento e RT-qPCR, mostrando portanto, que a metilação dirige a expressão destes transcritos e que eles são potenciais marcadores em CPT;
- ✓ Para o nosso conhecimento esse é o primeiro estudo revelando que metilação dos genes *DNMT1* e *SOX14* está associada com a expressão alterada destes transcritos em CPT;
- ✓ Alterações na metilação do *GABRB2* foi o único associado com características clínicas incluindo o tamanho do tumor e a presença da mutação *BRAFV600E*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel EV, Basile KJ, Kugel CH, et al. Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. **J Clin Invest** 2013; 123:2155-68.

Addati T, Achille G, Centrone M, et al. Trop-2 expression in papillary thyroid cancer: a preliminary cyto-histological study. **Cytopathology** 2014 Aug 27.

Al-Brahim N, Asa SL. Papillary thyroid carcinoma: an overview. **Arch Pathol Lab Med** 2006; 130:1057-62.

Alvarez-Nuñez F, Bussaglia E, Mauricio D, et al. PTEN promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. **Thyroid** 2006; 16:17-23.

Amin DN, Campbell MR, Moasser MM. The role of HER3, the unpretentious member of the HER family, in cancer biology and cancer therapeutics. **Semin Cell Dev Biol** 2010; 21:944-50.

Antequera F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. **Cell Mol Life Sci** 2003; 60:1647-58.

Arora N, Scognamiglio T, Lubitz CC, et al. Identification of borderline thyroid tumors by gene expression array analysis. **Cancer** 2009; 115:5421-31.

Arsic N, Rajic T, Stanojic S, Goodfellow PN. Characterisation and mapping of the human SOX14 gene. **Cytogenet Cell Genet** 1998; 83:139-46.

Bansal M, Gandhi M, Ferris RL, et al. Molecular and Histopathologic Characteristics of Multifocal Papillary Thyroid Carcinoma. **Am J Surg Pathol** 2013; 37:1586-91.

Barros-Filho MC. **Expressão gênica global em carcinomas papilíferos de tireoide: busca de marcadores diagnósticos, prognósticos e alvos terapêuticos.** São Paulo; 2014. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:463-75.

Baudin E, Schlumberger M. New therapeutic approaches for metastatic thyroid carcinoma. **Lancet Oncol** 2007; 8:148-56.

Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. **Nat Rev Cancer** 2011; 11:726-34.

Brait M, Loyo M, Rosenbaum E, et al. Correlation between BRAF mutation and promoter methylation of TIMP3, RAR β 2 and RASSF1A in thyroid cancer. **Epigenetics** 2012; 7:710-9.

Belge G, Meyer A, Klemke M, et al. Upregulation of HMGA2 in thyroid carcinomas: a novel molecular marker to distinguish between benign and malignant follicular neoplasias. **Gene Chromosomes Cancer** 2008; 47:56-63.

Berlingieri MT, Mafioletti G, Santoro M, et al. Inhibition of HMGI-C protein synthesis suppresses retrovirally induced neoplastic transformation of rat thyroid cells. **Mol Cell Biol** 1995; 15:1545-53.

Berlingieri MT, Pierantoni GM, Giancotti V, Santoro M, Fusco A. Thyroid cell transformation requires the expression of the HMGA1 proteins. **Oncogene** 2002; 21:2971-80.

Bertelli AA, Gonçalves AJ, Menezes MB, Melo MR, Tincani S, Massarollo LC. BRAF mutation in the elderly submitted to thyroidectomy. **Rev Col Bras Cir** 2013; 40:110-6.

Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. **Cell** 2014; 159:676-90.

Cibas ES, Ali SZ. The Bethesda System for reporting thyroid cytopathology. **Am J Clin Pathol** 2009;132:658-65.

Chen YA, Lemire M, Choufani S, et al. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium Human Methylation 450 microarray. **Epigenetics** 2013; 8:203-9.

Chiappetta G, Bandiera A, Berlingieri MT, et al. The expression of the mobility group HMGA1 proteins correlates with the malignant phenotype of human thyroid neoplasms. **Oncogene** 1995;10:1307-14.

Chiappetta G, Ferraro A, Vuttariello E, et al. HMGA2 mRNA expression correlates with the malignant phenotype in human thyroid neoplasias. **Eur J Cancer** 2008; 44:1015-21.

Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2006; 7:505-16.

Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, et al. Revised American thyroid association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. **Thyroid** 2009; 19:1167-214.

Cramer H. Fine-needle aspiration cytology of the thyroid: an appraisal. **Cancer** 2000; 90:325-9.

Czarnecka K, Pastuszek-Lewandoska D, Migdalska-Sek M, et al. Aberrant methylation as a main mechanism of TSGs silencing in PTC. **Front Biosci** 2011; 3:137-57.

Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature** 2002; 417:949-54.

Davies L, Welch HG. Current thyroid cancer trends in the United States. **JAMA Otolaryngol Head and Neck Surg** 2014; 140:317-322.

De Falco V, Buonocore P, Muthu M, et al. Ponatinib (AP24534) is a novel potent inhibitor of oncogenic RET mutants associated with thyroid cancer. **J Clin Endocrinol Metab** 2013; 98:E811-9.

DeLellis RA, Nikiforov YE. Thyroid and parathyroid glands. In: Gnepp DR, editor. **Diagnostic surgical pathology of the head and neck**. Philadelphia: Elsevier; 2009. p.563-646.

Di Cristofaro J, Silvy M, Lanteaume A, Marcy M, Carayon P, De Micco C. Expression of tpo mRNA in thyroid tumors: quantitative PCR analysis and correlation with alterations of ret, Braf , ras and pax8 genes. **Endocr Relat Cancer** 2006; 13:485-95.

Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, et al. BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. **J Clin Endocrinol Metab** 2007; 92:2840-3.

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature** 2004; 429:457-63.

Ellis RJ, Wang Y, Stevenson HS, et al. Genome-Wide Methylation Patterns in Papillary Thyroid Cancer Are Distinct Based on Histological Subtype and Tumor Genotype. **J Clin Endocrinol Metab** 2014; 9:E329-37.

Elsheikh TM, Singh HK, Saad RS, Silverman JF. Fine needle aspiration of the head and neck. In: Barnes L, editor. **Surgical pathology of the Head and Neck**. New York: Informa; 2009. p.1-19.

Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. **Oncogene** 2002; 21:5400-13.

Ehrlich M, Lacey M. DNA hypomethylation and hemimethylation in cancer. **Adv Exp Med Biol** 2013, 754:31-56.

Espinosa AV, Porchia L, Ringel MD. Targeting BRAF in thyroid cancer. **Br J Cancer** 2007; 96:16-20.

Feinberg AP. An epigenetic approach to cancer etiology. **Cancer J** 2007; 13:70-4.

Fusco A, Viglietto G, Santoro M. A new mechanism of BRAF activation in human thyroid papillary carcinomas. **J Clin Invest** 2005; 115:20-3.

García-Jiménez C, Santisteban P. TSH signalling and cancer. **Arq Bras Endocrinol Metabol** 2007; 51:654-71.

Ghanem M, Nijman R, Safan M, van der Kwast T, Vansteenbrugge G. Expression and prognostic value of platelet-derived growth factor-AA and its receptor α in nephroblastoma **BJU Int** 2010; 106:1389-93.

Gharib H, Papini E. Thyroid Nodules: Clinical Importance, Assessment, and Treatment. **Endocrinol Metab Clin N Am** 2007; 36:707-35.

Giles WH, Maclellan RA, Gawande AA, et al. False negative cytology in large thyroid nodules. **Ann Surg Oncol** 2015; 22:152-7.

Gomberawalla A, Elaraj DM. How to use molecular testing results to guide surgery: a surgeon's perspective. **Curr Opin Oncol** 2014; 26:14-21.

Gómez Sáez JM. Diagnostic and prognostic markers in differentiated thyroid cancer. **Curr Genomics** 2011; 12:597-608.

Green LS, Jellinek D, Jenison R, Östman A, Heldin C-H, Janjc N. Inhibitory DNA ligands to platelet-derived growth factor B-chain. **Biochem** 1996; 35:14413-24.

Griffiths A, Wessler S, Lewontin R, Carrol S, organizadores. **Introdução à genética**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. Mutação, reparo e recombinação; p.439-73.

Guan H, Ji M, Hou P, et al. Hypermethylation of the DNA mismatch repair gene hMLH1 and its association with lymph node metastasis and T1799A BRAF mutation in patients with papillary thyroid cancer. **Cancer** 2008; 113:247-55.

Hampton RY. ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. **Curr Opin Cell Biol** 2002; 14:476-82.

Hawthorne T, Giot L, Blake L, et al. A phase I study of CR002, a fully-human monoclonal antibody against platelet-derived growth factor-D. **Int J Clin Pharmacol Ther** 2008; 46:236-44.

Hay N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. **Cancer Cell** 2005; 8:179-83.

Healy SJ, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, Gupta S, Samali A. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. **Eur J Pharmacol** 2009; 625:234-46.

He M, Fan J, Jiang R, Tang WX, Wang ZW. Expression of DNMTs and genomic DNA methylation in gastric signet ring cell carcinoma. **Mol Med Rep** 2013; 8:942-8.

Heldin C-H. Targeting the PDGF signaling pathway in the treatment of non-malignant disease. **J Neuroimmune Pharmacol** 2013a; 9:69-79.

Heldin C-H. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. **Cell Commun Signal** 2013b; 11:97.

Henriksen R, Funa K, Wilander E, Bäckström T, Ridderheim M, Öberg K. Expression and prognostic significance of platelet-derived growth factor and its receptors in epithelial ovarian neoplasm. **Cancer Res** 1993; 53:4550-4.

Hoque MO, Rosenbaum E, Westra WH, et al. Quantitative assessment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms. **J Clin Endocrinol Metab** 2005; 90:4011-8.

Hou P, Ji M, Xing M. Association of PTEN gene methylation with genetic alterations in the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in thyroid tumors. **Cancer** 2008; 113:2440-7.

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.

Hu S, Liu D, Tufano RP, et al. Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer. **Int J Cancer** 2006; 119:2322-9.

Huang M, Batra RK, Kogai T, et al. Ectopic expression of the thyroperoxidase gene augments radioiodide uptake and retention mediated by the sodium iodide symporter in non-small cell lung cancer. **Cancer Gene Ther** 2001; 8:612-8.

Huang S, Li C, Armstrong EA, et al. Dual targeting of EGFR and HER3 with MEHD7945A overcomes acquired resistance to EGFR inhibitors and radiation. **Cancer Res** 2013, 73:824-33.

Hubbard SR. Oncogenic mutations in B-Raf: some losses yield gains. **Cell** 2004; 116:764-6.

Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. **Curr Opin Cell Biol** 2009; 21:177-84.

Iacobuzio-Donahue CA. Epigenetic changes in cancer. **Annu Rev Pathol** 2009; 4:223-49.

Inbar-Feinberg M, Choufani S, Butcher DT, Roifman M, Weksberg R. Basic concepts of epigenetics. **Fertil Steril** 2013; 99:607-15.

Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. **Nature Genet** 2009; 41:178-86.

Iyer NG, Shaha AR. Tratamiento del cuello en el cáncer papilar de tiroides. In: Kowalski LP, Novelli JL, editores. **Carcinoma papilar de tiroides**. Rosario: UNR; 2010. p 155-71.

Jarzab B, Handkiewicz-Junak D. Differentiated thyroid cancer in children and adults: same or distinct disease? **Hormones** 2007; 6:200-9.

Jathal MK, Chen L, Mudryj M, Ghosh PM. Targeting ErbB3: the New RTK(id) on the Prostate Cancer Block. **Immunol Endocr Metab Agents Med Chem** 2011; 11:131-49.

Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. **Cell** 2007; 128:683-92.

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

Karatzas T, Vasileiadis I, Kapetanakis S, Karakostas E, Chrousos G, Kouraklis G. Risk factors contributing to the difference in prognosis for papillary versus micropapillary thyroid carcinoma. **Am J Surg** 2013; 206:586-93.

Kerbel RS. Tumor angiogenesis. **N Engl J Med** 2008; 358:2039-49.

Kikuchi Y, Tsuji E, Yagi K, et al. Aberrantly methylated genes in human papillary thyroid cancer and their association with BRAF/RAS mutation. **Front Genet** 2013; 4:271-82.

Kim TH, Park YJ, Lim JA, et al. The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. **Cancer** 2012; 118:1764-73.

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

Kiseljak-Vassiliades K, Xing M. Association of cigarette smoking with aberrant methylation of the tumor suppressor gene *RAR β 2* in papillary thyroid cancer. **Front Endocrinol** 2011; 2:99.

Ko HJ, Kim BY, Jung CH, et al. DNA methylation of *RUNX3* in papillary thyroid cancer. **Korean J Intern Med** 2012; 27:407-10.

Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:292-306.

Kondo T, Asa SL, Ezzat S. Epigenetic dysregulation in thyroid neoplasia. **Endocrinol Metab Clin North Am** 2008; 37:389-400.

Kulis M, Heath S, Bibikova M, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. **Nat Genet** 2012; 44:1236-42.

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

Lal G, Padmanabha L, Smith BJ, et al. *RIZ1* is epigenetically inactivated by promoter hypermethylation in thyroid carcinoma. **Cancer** 2006; 107:2752-9.

Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E, et al. A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. **Cancer Res** 2008; 68:5878-87.

Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Fertig EJ, Jaffe AE, Storey JD. **Surrogate variable analysis. R package version 3.12.0**. 2014.

Li X, Abdel-Mageed AB, Kandil E. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. **Int J Clin Exp Med** 2012; 5:310-5.

Liu X, Li S, Yi F. Trop2 gene: a novel target for cervical cancer treatment. **J Cancer Res Clin Oncol** 2014; 140:1331-41.

LiVolsi VA. Papillary thyroid carcinoma: an update. **Mod Pathol** 2011; 24:S1-9.

Lou S, Lee HM, Qin H, et al. Whole-genome bisulfite sequencing of multiple individuals reveals complementary roles of promoter and gene body methylation in transcriptional regulation. **Genome Biol** 2014; 15:408.

Luczak MW, Roszak A, Pawlik P, et al. Transcriptional analysis of CXCR4, DNMT3A, DNMT3B and DNMT1 gene expression in primary advanced uterine cervical carcinoma. **Int J Oncol** 2012; 40:860-6.

Ma J, Lyu H, Huang J, Liu B. Targeting of erbB3 receptor to overcome resistance in cancer treatment. **Mol Cancer** 2014; 13:105.

Maciel RM, Kimura ET, Cerutti JM. Pathogenesis of differentiated thyroid cancer (papillary and follicular). **Arq Bras Endocrinol Metabol** 2005; 49:691-700.

Maitra A, Abbas AK. O sistema endócrino: tumores da tireóide. In: Kumar V, Abbas A, Fausto RC, editores. **Robbins and Cotran: bases patológicas das doenças**. 7ª ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p.1228-37.

Malkomes P, Oppermann E, Bechstein WO, Holzer K. Significantly high expression of platelet-derived growth factor (PDGF) in benign nodules of the thyroid: relevance in the development of goitre recurrence? **Langenbecks Arch Surg** 2011; 396:1165-72.

Maunakea AK, Chepelev I, Zhao K. Epigenome mapping in normal and disease States. **Circ Res** 2010; 107:327-39.

Mancikova V, Buj R, Castelblanco E, et al. DNA methylation profiling of well-differentiated thyroid cancer uncovers markers of recurrence free survival. **Int J Cancer** 2013; 135:598-610.

Mazzaferri EL. Managing small thyroid cancers. **JAMA** 2006; 295:2179-82.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2014 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Minning C, Mohtar NM, Abdullah N, et al. Exploring breast carcinogenesis through integrative genomics and epigenomics analyses. **Int J Oncol** 2014; 45:1959-68.

Mokrab Y, Bavro VN, Mizuguchi K, et al. Exploring ligand recognition and ion flow in comparative models of the human GABA type A receptor. **J Mol Graph Model** 2007; 26:760-74.

Montero-Conde C, Ruiz-Llorente S, Dominguez JM, et al. Relief of feedback inhibition of HER3 transcription by RAF and MEK inhibitors attenuates their antitumor effects in BRAF-mutant thyroid carcinomas. **Cancer Discov** 2013, 3:520-33.

Nakamura N, Carney JA, Jin L, et al. RASSF1A and NORE1A methylation and BRAFV600E mutations in thyroid tumors. **Lab Invest** 2005; 85:1065-75.

Nephew KP, Huang TH. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. **Cancer Lett** 2003; 190:125-33.

Nikiforov YE. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. **Mod Pathol** 2008; 21:S37-43.

Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. **Nat Rev Endocrinol** 2011; 7:569-80.

Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. **J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88:5399-404.

Nucera C, Nehs MA, Nagarkatti SS, et al. Targeting BRAFV600E with PLX4720 displays potent antimigratory and anti-invasive activity in preclinical models of human thyroid cancer. **Oncologist** 2011; 16:296-309.

Oda Y, Hosokawa N, Wada I, Nagata K. EDEM as a acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. **Science** 2003; 299:1394-7.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. **EMBO J** 2000; 19:3159-67.

Omur O; Baran Y. An update on molecular biology of thyroid cancers. **Crit Rev Oncol Hematol** 2014; 90:233-52.

Ouyang B, Knauf JA, Smith EP, et al. Inhibitors of Raf kinase activity block growth of thyroid cancer cells with RET/PTC or BRAF mutations in vitro and in vivo. **Clin Cancer Res** 2006; 12:1785-93.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:e45.

Pfeifer GP, Dammann R. Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. **Biochemistry (Mosc)** 2005; 70:576-83.

Pietras K, Sjöblom T, Rubin K, Heldin C-H, Östman A. PDGF receptors as cancer drug targets. **Cancer Cell** 2003; 3:439-43.

Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. **Nat Biotechnol** 2010; 28:1057-68.

Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. **Endocr Relat Cancer** 2000; 7:165-07.

Prasad NB, Kowalski J, Tsai H-L, et al. Three-gene molecular diagnostic model for thyroid cancer. **Thyroid** 2012; 22:275-84.

Qiang W, Zhao Y, Yang Q. ZIC1 Is a Putative Tumor Suppressor in Thyroid Cancer by Modulating Major Signaling Pathways and Transcription Factor FOXO3a. **J Clin Endocrinol Metab** 2014; 99:E1163-72.

Rahbari R, Zhang L, Kebebew E. Thyroid cancer gender disparity. **Future Oncol** 2010; 6:1771-9.

Rajendran G, Shanmuganandam K, Bendre A, Muzumdar D, Goel A, Shiras A. Epigenetic regulation of DNA methyltransferases: DNMT1 and DNMT3B in gliomas. **J Neurooncol** 2011; 104:483-94.

Ravetto C, Colombo L, Dottorini ME. Usefulness of fine-needle aspiration in the diagnosis of thyroid carcinoma: a retrospective study in 37,895 patients. **Cancer** 2000; 90:357-63.

Rhoden KJ, Johnson C, Brandao G, Howe JG, Smith BR, Tallini G. Real-time quantitative RT-PCR identifies distinct c-RET, RET/PTC1 and RET/PTC3 expression patterns in papillary thyroid carcinoma. **Lab Invest** 2004; 84:1557-70.

Ripani E, Sacchetti A, Corda D, Alberti S. Human Trop-2 is a tumor-associated calcium signal transducer. **Int J Cancer** 1998; 76:671-6.

Rocha AS, Soares P, Seruca R, et al. Abnormalities of the E-cadherin/catenin adhesion complex in classical papillary thyroid carcinoma and in its diffuse sclerosing variant. **J Pathol** 2001; 194:358-66.

Rodríguez-Rodero S, Fernández AF, Fernández-Morera JL, et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct thyroid cancer subtypes. **J Clin Endocrinol Metab** 2013; 98:2811-21.

Samuels Y, Velculescu VE. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. **Cell Cycle** 2004; 3:1221-4

Sassa M, Hayashi Y, Watanabe R, et al. Aberrant promoter methylation in overexpression of *CITED1* in papillary thyroid cancer. **Thyroid** 2011; 21:511-7.

Scala S, Portella Gm Fedele M, Chiappetta G, Fusco A. Adenovirus-mediated suppression of HMGI(Y) protein synthesis as potential therapy of human malignant neoplasias. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000; 97:4256-61.

Schagdarsurengin U, Gimm O, Dralle H, Hoang-Vu C, Dammann R. CpG island methylation of tumor-related promoters occurs preferentially in undifferentiated carcinoma. **Thyroid** 2006; 16:633-642

Schalkwyk LC, Pidsley R, Wong CC et al. **Watermelon: Illumina 450 methylation array normalization and metrics. R package version 1.4.0.** 2013.

Schlumberger M, Baudin E, Travagli JP. Papillary and follicular cancers of the thyroid. **Presse Med** 1998; 27:1479-81.

Schulten H-J, Alotibi R, Al-Ahmadi A, et al. Effect of BRAF mutational status on expression profiles in conventional papillary thyroid carcinomas. **BMC Genomics** 2015; 16:S1-6.

Secco LG, Carvalho AL. Análisis de los sistemas pronósticos en el carcinoma bien diferenciado de tiroides. In: Kowalski LP, Novelli JL, editores. **Carcinoma papilar de tiroides**. Rosario: UNR; 2010. P.213-9.

Senchenko VN, Kisseljova NP, Ivanova TA, et al. Novel tumor suppressor candidates on chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in cervical cancer. **Epigenetics** 2013; 8:409-20.

Seymour L, Dajee D, Bezwoda WR. Tissue platelet derived-growth factor (PDGF) predicts for shortened survival and treatment failure in advanced breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 1993; 26:247-52.

Sheng Q, Liu X, Fleming E, et al. An activated ErbB3/NRG1 autocrine loop supports in vivo proliferation in ovarian cancer cells. **Cancer Cell** 2010; 17:298–310.

Sherman SI. Thyroid carcinoma. **Lancet** 2003; 361:501-11.

Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer Statistics. **Ca Cancer J Clin** 2014; 64:9-29.

Siraj AK, Hussain AR, Al-Rasheed M, et al. Demethylation of TMS1 gene sensitizes thyroid cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **J Clin Endocrinol Metab** 2011; 96:E215-24.

Smyth GK. "Limma: linear models for microarray data". In: Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R and Huber W, editores. **Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor**. Springer, New York; 2005. p 397–420.

Socinski MA. Multitarget receptor tyrosine kinase inhibition: an antiangiogenic strategy in non-small cell lung cancer. **Cancer Treat Rev** 2011; 37:611-7.

Stephen JK, Chitale D, Narra V, Chen KM, Sawhney R, Worsham MJ. DNA methylation in thyroid tumorigenesis. **Cancers (Basels)** 2011; 3:1732-43.

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

Syrenicz A, Koziolok M, Ciechanowicz A, Sieradzka A, Binczak-Kuleta A, Parczewski M. New insights into the diagnosis of nodular goiter. **Thyroid Res** 2014; 7:6.

Takanami I, Imamura T, Yamamoto Y, Kodaira S. Usefulness of platelet-derived growth factor as a prognostic factor in pulmonary adenocarcinoma. **J Surg Oncol** 1995; 58:40-3.

Tong WG, Wierda WG, Lin E, et al. Genome-wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact. **Epigenetics** 2010; 5:499-508.

Tsai B, Ye Y, Rapoport TA. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2002; 3:246-55.

Watanabe M, Maemura K, Oki K, Shiraishi N, Shibayama Y, Katsu K. Gamma-aminobutyric acid (GABA) and cell proliferation: focus on cancer cells. **Histol Histopathol** 2006; 21:1135-41.

Wakasa T, Li Y, Bai Y, et al. Up-regulation of urinary-type plasminogen activator correlates with high-risk papillary thyroid carcinoma with BRAFV600E mutation and its possible molecular mechanism. **Pathol Res Pract** 2014; 11:733-8.

Ward LS, Morari EC, Leite JL, et al. Identifying a risk profile for thyroid cancer. **Arq Bras Endocrinol Metabol** 2007; 51:713-22.

Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. **Cell** 2004; 116:855-67.

Wang CC, Friedman L, Kennedy GC, et al. A large multicenter correlation study of thyroid nodule cytopathology and histopathology. **Thyroid** 2011; 21:243-51.

Wei W, Zhang N, Peng Z, Houser CR, Mody I. Perisynaptic localization of delta subunit-containing GABA(A) receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. **J Neurosci** 2003; 23:10650-61.

Weinstein IB, Joe A. Oncogene Addiction. **Cancer Res** 2008; 68:3077-80.

Wilhovsky S, Gardner R, Hampton R. HRD gene dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation. **Mol Biol Cell** 2000; 11:1697-708.

Williams D. Radiation carcinogenesis: lessons from Chernobyl. **Oncogene** 2008; 27:S9-18.

Wiseman S, Haddad Z, Walker B, et al. Whole-Transcriptome Profiling Of Thyroid Nodules Identifies Expression-Based Signatures For Accurate Thyroid Cancer Diagnosis. **J Clin Endocrinol Metab** 2013; 98:4072-9.

Witt RL, Ferris RL, Pribitkin EA, Sherman SI, Steward DL, Nikiforov YE. Diagnosis and management of differentiated thyroid cancer using molecular biology. **Laryngoscope** 2013; 123:1059-64.

Xing M, Cohen Y, Mambo E, et al. Early occurrence of RASSF1A hypermethylation and its mutual exclusion with BRAF mutation in thyroid tumorigenesis. **Cancer Res** 2004; 64:1664-8.

Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. **Endocr Relat Cancer** 2005; 12:245-62.

Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. **Endocr Rev** 2007a; 28:742-62.

Xing M. Gene methylation in thyroid tumorigenesis. **Endocrinology** 2007b; 148:948-53.

Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. **Nat Rev Cancer** 2013; 13:184-99.

Xing M, Haugen BR, Schlumberger M. Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. **Lancet** 2013; 381:1058-69.

Yaginuddin A, Qureshi SA, Qazi R, Farooq S, Abbas F. DNMT1 silencing affects locus specific DNA methylation and increases prostate cancer derived PC3 cell invasiveness. **J Urol** 2009; 182:756-61.

Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nat Rev Drug Discov** 2006; 5:37-50.

Zhang J, Wang P, Dykstra M, et al. Platelet-derived growth factor receptor- α promotes lymphatic metastases in papillary thyroid cancer. **J Pathol** 2012; 228:241-50.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 22 de outubro de 2014.

**A
Dra. Silvia Regina Rogatto.**

Aluna: Caroline Moraes Beltrami (Mestrado).

**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1842/13
“Análise do metiloma em carcinomas de tireoide”.**

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 21/10/2014, **tomaram conhecimento** do seguinte documento:

- Comunicado de mudança de nível do projeto em referência, de Departamental para Mestrado da aluna *Caroline Moraes Beltrami*, em carta datada de 10 de outubro de 2014.

Atenciosamente,

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

1/1

Anexo 2 - Metodologia utilizada para a detecção da mutação em *BRAFV600E*, *KRAS* (códon 12/13), *HRAS* (códon 61) e *NRAS* (códon 61).

A região de interesse foi amplificada pela PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando iniciadores biotinizados específicos (Epigendx, Worcester MA, Inglaterra) (Quadro abaixo).

Quadro dos Iniciadores utilizados para detecção das mutações em *BRAF*, *KRAS*, *HRAS* e *NRAS* por pirosequenciamento.

GENE/ CÓDON	INICIADOR ES	SEQUÊNCIA DE ANÁLISE	ALTERAÇÃO
<i>BRAF/60</i> <i>0</i>	ADS871	TACA GTG	GTG → GAG
<i>KRAS/12,</i> <i>13</i>	ADS747	GTGGC GTAGGCAA	GGT GGC → GAT GAT; AGT GAT; GCT GAT; GTT GAT
<i>HRAS/61</i>	ADS2293	CAG GAGGAG	CAG → CTG
<i>NRAS/61</i>	ADS214	GCTGG CA	CAA → CGA ou CTA ou CCA

Legenda. Os nucleotídeos em **vermelho** representam a região avaliada para a presença de alteração.

Para a reação de pirosequenciamento foram utilizados 20ng de DNA de cada amostra e em cada reação foi incluído um controle positivo e um negativo para a mutação e um controle sem amostra (*No TemplateControl*). Foram utilizados como controles positivos a linhagem celular de câncer de cólon WiDr, sabidamente portadora da mutação *BRAFV600E*, e a linhagem celular de câncer de cólon SW-480 para a detecção da mutação em *KRAS*.

Foram adicionados 0,2µM de cada iniciador (direto e reverso), 15µL *MasterMix*(Qiagen) e água livre de nuclease (Ambion) para um volume final de 30µL. A reação foi submetida a 95°C por 15 minutos, seguido por 45 ciclos de 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento específica para cada par de iniciadores por 30 segundos (58°C para *BRAF* e *NRAS*, 62°C para *HRAS* e 64°C para *KRAS*), 72°C por 30 segundos e uma etapa final de 72°C por 10 minutos. O produto amplificado foi confirmado em gel de agarose a 1%, corado com *SYBR Safe DNA Gel Stain*(0,5µg/mL) (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

Em 25 μ L da amostra amplificada foi adicionado um *mix* contendo 3 μ L de *beads* de sefarose, 40 μ L de tampão de ligação e 15 μ L de água destilada. A placa foi agitada por 15 minutos a 1350 rpm e as amostras foram lavadas na estação de vácuo com banhos consecutivos de etanol 70%, solução desnaturante e tampão de lavagem. As amostras com as *beads* de sefarose foram depositadas sobre a placa para pirosequenciamento contendo 40 μ L de *mix* do iniciador de sequenciamento, sendo 39,8 μ L de tampão de anelamento e 0,2 μ L dos iniciadores a 100 μ M. A placa contendo as amostras foi incubada por 2 minutos a 80°C seguido de 5 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram então incubadas no PyroMark Q96 ID (Qiagen) com os reagentes como necessários para a corrida, como recomendado pelo fornecedor.

Os dados gerados foram avaliados quanto à qualidade de acordo com a altura dos picos e fluorescência após a incorporação e interpretados quanto à presença ou não das mutações (troca da base T por A no códon 600 em *BRAF*; troca das bases A por T e A por outra base no códon 61 de *HRAS* e *NRAS*, respectivamente e troca das bases G no códon 12, G e C no códon 13 por outra base para *KRAS*). Foram considerados positivos para as mutações os casos com um limiar de 10% de alelos alterados, estimativa de mais de 20% de células com mutação heterozigótica, sem risco de ser um viés técnico.

Anexo 3 – Metodologia utilizada para a detecção das inversões RET/PTC1 e RET/PTC3.

O método utilizado para detecção das inversões *RET/PTC1* e *RET/PTC3* foi baseado em RHODEN et al. (2004) usando o sistema de detecção TaqMan (*Applied Biosystems*) e como transcrito selvagem foi utilizado o gene *RET* (correspondente aos éxons 10-11), representado no quadro abaixo.

Quadro da Sequência de iniciadores e sondas utilizadas para a identificação das inversões *RET/PTC*.

GENE	SEQUÊNCIAS DE INICIADORES/SONDAS	[] DE INICIADORES /SONDAS	AMPLICON
ACTB*	<i>F - 5'AGCCTCGCCTTTGCCGA3'</i> <i>R - 5'CTGGTGCCTGGGGCG3'</i> VIC-CCGGCTTCGCGGGCGAC-TAMRA	250nM/100nM	115 pb
RET#	<i>F - 5'TGCTTCTGCGAGCCCG3'</i> <i>R - 5'ATCACCGTGCGGCACAG3'</i> FAM-CATCCAGGATCCACTGTGCGACGA-TAMRA	200nM/100nM	62 pb
RET/ PTC1	<i>F - 5'CGCGACCTGCGCAAA3'</i> <i>R - 5'CAAGTTCTTCCGAGGGAATTCC3'</i> FAM-CAAGCGTAACCATCGAGGATCCAAAGT-TAMRA	250nM/100nM	66 pb
RET/ PTC3	<i>F - 5'CCCCAGGACTGGCTTACCC3'</i> <i>R - 5'CAAGTTCTTCCGAGGGAATTCC3'</i> FAM-AAAGCAGACCTTGGAGAACAGTCAGGAGG-TAMRA	200nM/50nM	81 pb

Legenda. F: Iniciador direto; R: Iniciador reverso; pb: pares de bases; *Transcrito referência; #Transcrito selvagem.

Para a reação de amplificação (*PCR 7500 Real Time PCR System– Applied Biosystems*) foram utilizados 50-100nM das sondas, 200-250 nM de cada iniciador (*Applied Biosystems*), Taqman *Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*), 20 ng de cDNA e água livre de nuclease (*Ambion Inc.*, Austin, TX, EUA) para um volume final de 20 µL. Em todas as placas foram incluídas replicas técnicas (duplicata), um controle positivo para a alteração

(tumores sabidamente portadores da inversão *RET/PTC1* e *RET/PTC3*) e controles sem cDNA. As amostras foram submetidas a 40 ciclos de amplificação. Para a normalização dos valores do ciclo de quantificação (Cq), foi utilizado o método proposto por PFAFFL (2001), incluindo *ACTB* como controle endógeno. O valor da expressão relativa normalizada do transcrito quimérico (quando existente) foi dividido pelo controle selvagem, de forma a estabelecer a proporção de expressão alterada/normal. A alteração não foi aceita quando a expressão do alelo quimérico foi menor que cinco vezes a do alelo selvagem.

Anexo 4 - Análise de agrupamento não supervisionado resultantes da análise de metilação.

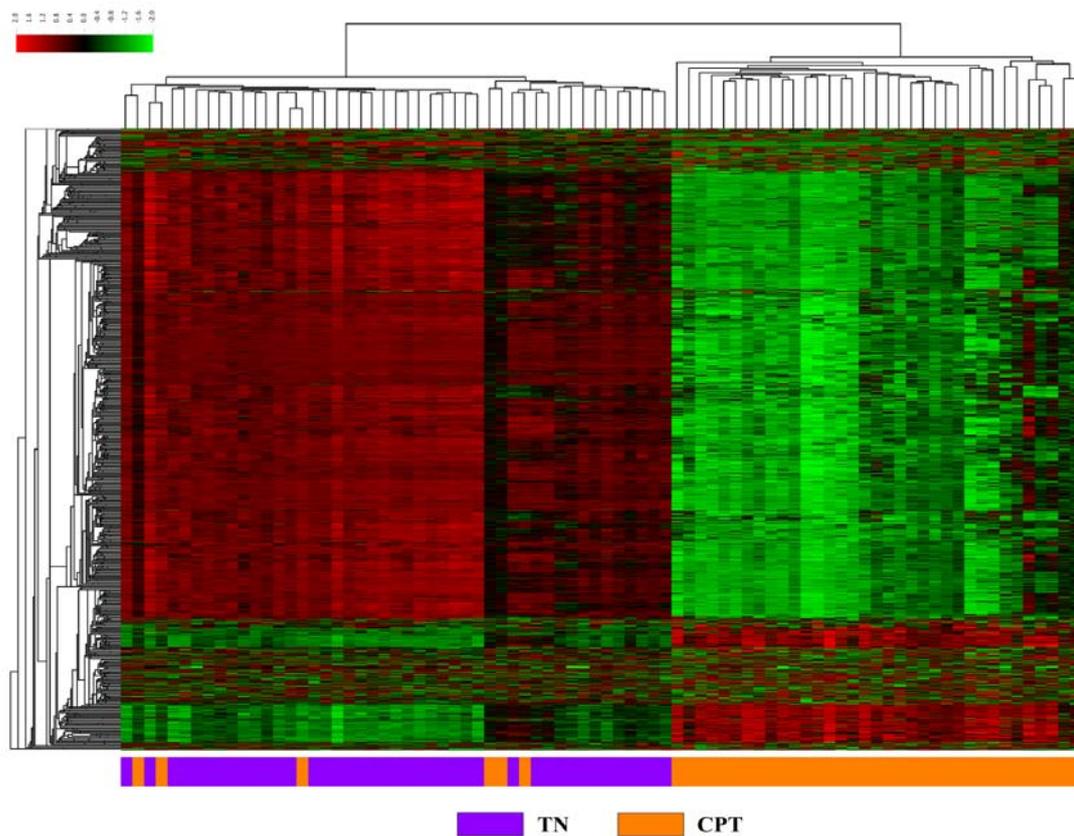


Figura da Análise de agrupamento não supervisionado referente ao perfil de metilação diferencial entre as amostras CPT e TN. É possível observar dois grupos distintos. O primeiro contém todas as amostras normais (roxo) e seis tumores (laranja) e o segundo composto por tumores. TN: Tecido tireoidiano não tumoral; CPT: Carcinoma papilífero de tireoide.

Anexo 5 – Lista das sondas diferencialmente metiladas.

Esse arquivo foi compartilhado via dropbox e pode ser acessado pelo link https://www.dropbox.com/sh/7k1zidimw0qc3eg/AAAMNmn5ooT_n4nKUmPfl4xla?dl=0, após solicitação e autorização pelo email: rogatto@fmb.unesp.br.

Anexo 6 - Lista de sondas diferencialmente metiladas confirmadas pelo banco de dados TCGA.

Esse arquivo foi compartilhado via dropbox e pode ser acessado pelo link: https://www.dropbox.com/sh/7k1zidimw0qc3eg/AAAMNmn5ooT_n4nKUmPfl4xla?dl=0, após solicitação e autorização pelo email: rogatto@fmb.unesp.br

Anexo 7 – Resultados obtidos da análise de pirosequenciamento dos dinucleotídeos presentes nas regiões ricas em CpGs.

GENE	% METILAÇÃO	P	MÉDIA T	MÉDIA N
<i>DNMT1</i>	CG 1	2.75E-01	1.77	2.78
	CG 2	2.35E-01	5.60	7.24
	CG 3	1.95E-01	1.75	3.06
	CG 4	1.82E-01	3.03	4.71
	CG 5	4.12E-02	6.37	11.73
	CG 6	3.52E-01	5.74	8.17
	Média CG	3.30E-02	4.04	6.28
<i>ERBB3</i>	CG 1	3.89E-03	16.14	30.34
	Média CG	3.89E-03	16.14	30.34
<i>GABRB2(A)</i>	CG 1	6.90E-08	8.36	20.00
	CG 2	8.20E-01	49.13	49.90
	Média CG	1.26E-04	28.75	34.95
<i>GABRB2(B)</i>	CG 1	9.12E-04	8.71	11.48
	CG 2	1.53E-16	28.15	51.86
	CG 3	2.78E-11	11.71	22.89
	CG 4	1.40E-08	10.34	19.09
	Média CG	3.8285E-13	14.73	26.33
<i>HMGA2</i>	CG 1	4.78E-04	53.40	70.13
	CG 2	6.81E-07	38.99	64.07
	CG 3	3.23E-09	27.51	51.94
	Média CG	1.10E-06	39.96	62.05
<i>SOX14</i>	CG 1	1.64E-02	4.33	1.70
	CG 2	5.62E-04	3.94	1.96
	CG 3	2.64E-03	9.07	4.92
	Média CG	1.97E-04	5.78	2.86

Legenda: O CG em negrito representa o dinucleotídeo de interesse.

Anexo 8 – Sondas diferencialmente metiladas encontradas na análise integrada presente especialmente em corpo de genes e possivelmente associada com outras regiões.

GENE	CORPO DE GENE	5'UTR	TSS200	1º ÉXON	TSS1500	3'UTR	SONDAS TOTAIS
<i>SEPT9</i>	5	1	1	1	0	0	8
<i>ARNTL</i>	1	1	0	0	0	0	2
<i>BBC3</i>	1	0	0	1	0	0	2
<i>CASZ1</i>	2	1	0	0	0	0	3
<i>CDON</i>	1	1	0	0	0	0	2
<i>CLDN1</i>	3	0	0	0	1	0	4
<i>CLEC16A</i>	3	0	0	0	1	0	4
<i>CREB5</i>	1	0	0	0	1	0	2
<i>CSGALNACT1</i>	1	1	0	0	0	0	2
<i>DHRS3</i>	4	0	0	0	3	0	7
<i>DUSP5</i>	6	0	0	0	1	0	7
<i>EPS8</i>	1	1	0	0	0	0	2
<i>ETNK2</i>	1	0	0	0	1	1	3
<i>EXT1</i>	2	0	0	0	1	0	3
<i>FAM20A</i>	1	0	0	0	1	0	2
<i>INF2</i>	1	1	0	0	0	0	2
<i>LAMB3</i>	1	0	2	0	2	0	5
<i>LASP1</i>	1	0	0	0	1	0	2
<i>PALM</i>	1	0	0	0	1	0	2
<i>PHYHIP</i>	1	1	0	0	0	0	2
<i>PTPRF</i>	2	1	0	0	1	0	4
<i>RASGRF1</i>	2	0	0	1	0	0	3
<i>RDH5</i>	1	0	0	2	1	0	4
<i>RUNX2</i>	3	0	0	0	1	0	4
<i>SPTBN1</i>	1	1	0	0	0	0	2
<i>SULT2B1</i>	1	0	1	0	0	0	2
<i>SYNPO</i>	1	0	0	1	0	0	2
<i>SYT12</i>	1	1	0	0	0	0	2
<i>TMEM173</i>	1	0	1	0	0	0	2
<i>TMEM79</i>	1	0	0	1	1	0	3
<i>TMPRSS4</i>	1	1	0	0	0	0	2
<i>TNS3</i>	1	1	0	0	0	0	2
<i>TPO</i>	1	0	2	0	1	0	4
<i>WBSCR26</i>	1	0	1	0	0	0	2