

**GENES CODIFICADORES DE MICRORNAS
REGULADOS POR METILAÇÃO EM CARCINOMAS
PAPILÍFEROS DE TIREOIDE**

ISABELLA MARIA DIAS PAYÃO ORTIZ

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

Área de Concentração: Oncologia

**Orientadora: Profa. Dra. Silvia Regina Rogatto
Co-orientadores: Drs. Mateus de Camargo
Barros-Filho e Mariana Bizarro dos Reis**

**São Paulo
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Ortiz, Isabella Maria Dias Payão

Genes codificadores de microRNAs regulados por metilação em carcinomas papilíferos de tireoide / Isabella Maria Dias Payão Ortiz – São Paulo, 2017.

133p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Silvia Regina Rogatto

Descritores: 1. Neoplasias da Glândula Tireoide/Thyroid Neoplasms. 2. Metilação de DNA/DNA Methylation. 3. MicroRNAs/MicroRNAs. 4. Expressão Gênica/Gene Expression. 5. Diagnóstico/Diagnosis.

Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas.
Perdoe-as assim mesmo.

Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de interesseiro.
Seja gentil assim mesmo.

Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo.
Seja honesto e franco assim mesmo.

O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora
para outra.
Construa assim mesmo.

Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja.
Seja feliz assim mesmo.

O bem que você faz hoje, pode ser esquecido amanhã.
Faça o bem assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode não ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo.

Veja você que, no final das contas, é tudo entre você e Deus.
Nunca foi entre você e as pessoas.

Madre Teresa de Calcutá

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho, assim como todas as minhas conquistas:

Aos meus amados pais, José e Osvanda.

À minha querida irmã, Isadora.

Por serem meu alicerce e meu melhor refúgio.

AGRADECIMENTOS

“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu. É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu. É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações. E assim ter amigos contigo em todas as situações.” (Ana Vilela – Trem Bala)

Agradeço primeiramente a **Deus**, por ser o centro e a razão da minha vida.

À **Profa. Dra. Silvia Regina Rogatto**, por me aceitar em seu grupo, mesmo com minha total in experiência, pela orientação desse trabalho, pelo carinho, dedicação e confiança ao longo desses anos. Apesar da distância física, sempre se fez muito presente. Obrigada pela oportunidade de crescimento e pelos ensinamentos que vão além do âmbito acadêmico.

Ao **Dr. Mateus de Camargo Barros Filhos**, meu co-orientador, vulgo “Mateuzinho”, pela disposição, eficiência e prontidão em sempre me ajudar, por todo empenho e comprometimento com as análises desse trabalho. Por todos os ensinamentos compartilhados e pelos momentos de descontração principalmente os que se estendiam “até às 19 horas (risos)”.

À **Dra. Mariana Bisarro dos Reis**, pela co-orientação, amizade e apoio incondicional ao longo desses anos. Obrigada por me ensinar todas as técnicas de bancada com tanta paciência e cuidado, por dividir seus conhecimentos de epigenética, além da preocupação, tempo e auxílio em todas as etapas desse trabalho.

Ao **Dr. Fabio A. Marchi** pela contribuição com as análises de bioinformática, pela atenção, paciência e humildade em repassar seus conhecimentos.

À **Dra. Hellen Kuasne** por toda sabedoria, paixão e entusiasmos pela ciência. Obrigado por tornar tudo mais simples e leve com seu alto astral. Eu admiro muito a pessoa excepcional que você é, e principalmente seu modo peculiar

e positivo de encarar a vida. Obrigada pelo apoio motivacional e profissional em todas as etapas desse trabalho.

Aos integrantes e ex-integrantes do **grupo NEOGENE**: André, Caroline, Fábio, Flávia, Graziela, Hellen, Jennice, Juan, Julia, Larissa, Luisa, Maisa, Marco, Mariana, Mateus, Priscila, Rolando, Sara, Dra. Sandra, Tatiane, assim como nossos queridos agregados da Fernanda, Fidalgo, Iara, Karina, Kelvin, Renata, por tornarem nossa convivência diária mais alegre e harmoniosa. Obrigado pelas risadas, cafézinhos e troca de experiências e ensinamentos que vão muito além do currículo *Lattes*.

A todos que contribuíram diretamente com a realização deste trabalho, em especial, **Tati**, que veio de Botucatu-SP só para me ajudar nas modificações por bissulfito e infinitas PCRs nessa etapa final, sempre disposta a ajudar, com um bom humor sem igual e alegria contagiante; **Carol**, pelo auxílio com a formatação, referências bibliográficas, e todas as listas desse trabalho; **Luisa**, pela ajuda com o inglês (*my favorite teacher*), referências, *abstract* e por não medir esforços em me ajudar na finalização da dissertação (aos finais de semana, madrugadas e afins); **Graziela e Julia**, pela ajuda e ensinamentos nos ensaios de RT-qPCR.

Aos **funcionários da Pós-Graduação, Banco de Macromoléculas, Biblioteca e CIPE**, em especial à Karla, Ana, Suely, Jennice, Felipe, Danilo, Maria, Janaina, Nega e Talita pela prestatividade e atenção dispensada no atendimento e auxílio ao longo desse trabalho.

Aos membros da Banca de Qualificação **Dra. Hellen Kuasne e Dr. Robson Francisco Carvalho** que contribuíram com esse trabalho desde os resultados parciais com seus pareceres, correções e sugestões. Aos membros da Banca Examinadora **Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis, Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camilo e Dr. Luiz Paulo Kowalski** por aceitarem participar e contribuir com seus conhecimentos científicos e experiências profissionais, a fim de melhorar esse trabalho.

Ao **CNPq** e **FAPESP** pelo suporte financeiro e à **Fundação Antônio Prudente** por disponibilizar a infraestrutura para realização desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata** responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular do **Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia** por permitir a execução de uma etapa fundamental desse trabalho. Em especial, à **Dra. Gisele Medeiros Bastos** que abriu as portas do laboratório para a finalização dos experimentos em um período de grandes dificuldades, além de ter me recebido com muito carinho junto ao seu grupo, os quais também me acolheram e me deram muito apoio desde o início. Agradeço também a querida **Jéssica Bassani Borges**, por toda atenção, paciência, disponibilidade e auxílio com o piossequenciamento. Foram incansáveis os recomeços nesses últimos meses, mas você e toda equipe (Aécio, Helena, Gi, Dri, Lin, Carol etc) foram luz no meu caminho e clarearam aqueles dias cinzentos em que nada parecia dar certo.

À **Graziela Spilborghs** que abriu a porta de sua casa para mim, me acolheu junto de sua família, esteve ao meu lado em momentos difíceis e também de muita alegria. Obrigada pelos conselhos, passeios, viagens e apoio tanto pessoal quanto profissional.

À minha vizinha e amiga **Iara Rodrigues** pela troca de experiências, pelas conversas, conselhos, companheirismo e parceria de todos os momentos e por ser a melhor guia turística de São Paulo. Te admiro e torço muito pelas suas realizações pessoais e profissionais. Gratidão por tudo!

À **Caroline Beltrami** um dos presentes que o mestrado me trouxe, por ser muitas vezes o meu espelho, e me fazer enxergar sempre além. “Tem gente que chega de mansinho e faz morada no coração da gente”. Mansinho não combina muito com você, chegou feito furacão mesmo (risos). Obrigada por somar em minha vida e compartilhar a sua comigo, por não me poupar das críticas e “daquela sinceridade” sem igual. Sentirei falta dos nossos conselhos, conversas, risadas, DRs, TPM regulada, chororôs e áudios infundáveis.

À **D. Beatriz Gonçalves** por todo cuidado e amor que teve comigo nos meses em que morei em sua casa e à toda sua “Grande Família” (Vera, Ailton, André, Isabella, Edna, Eduardo, Cris, Marcelo etc.) por me acolherem tão bem.

Ao meu pai **José Ap. Ortiz** por sempre me ensinar a sorrir para a vida, mesmo quando ela não sorri de volta, obrigado por acreditar em mim e apostar nos meus sonhos. Meu exemplo de esforço, humildade e honestidade. À minha mãe **Osvanda D. Payão Ortiz**, simplesmente sem ela eu não sou, obrigada pelas orações, por não medir esforços em estar ao meu lado, por ser essa mulher incrível que transborda amor e cuidado em todos os momentos. À minha irmã **Isadora D. Payão Ortiz**, mesmo frente as nossas inúmeras diferenças sempre esteve ao meu lado, me apoiando e torcendo por mim. Com seu jeitinho me prova todos os dias que água e óleo podem sim se misturar. Esse tripé é minha base e minha inspiração. Entre ir e vir, sempre os carrego na mala, na mente e no coração. “Passarinho com ninho alça voos maiores e mais seguros” e por escolher partir, só me restou a certeza de que é para eles que eu poderei sempre voltar. Obrigado por me darem raízes profundas e asas de liberdade. Eu amo muito vocês!

À minha tia **Rosângela Paião**, que exerce o papel de segunda mãe em minha vida. Obrigada pelas orações, cuidado, preocupação e carinho. Obrigada por se fazer presente em todos os momentos, me acompanhando desde os primeiros passos até hoje, nos meus altos e baixos sei que você sempre estará ao meu lado.

Ao amigo e pai postiço **Gilson Cruz**, que acompanha as minhas conquistas desde os anseios do vestibular ao angustiante portão de embarque. Obrigado por torcer e apoiar minhas realizações pessoais e profissionais. Você faz muita falta!

Ao **Guilherme Sobreira**, pelo apoio, carinho, companheirismo, paciência, palavras de encorajamento e positividade na importante etapa de finalização

deste trabalho, além da grande ajuda com o pirosequenciador e contato com o Dante. Obrigado por deixar os meus dias mais leves e sempre dar um jeito de descomplicar tudo (risos). Espero que a gente continue compartilhando nossas vidas, têm sido tão melhor desde que você chegou. Agradeço também à sua família por todo apoio e torcida.

Às minhas grandes amigas **Juliane, Isadora, Paula, Vanessa, Laiz, Giovana e Bruna** pela verdadeira amizade há mais de 10 anos, por ter parte da minha vida guardada em sete corações.

Aos meus irmãos de coração **Everton e Alessandra**, pelo companheirismo, conselhos, histórias e amizade de tantos anos. Minha total admiração a vocês dois. Obrigado por dividirem a vida de vocês e da Lu comigo. Sou imensamente grata em fazer parte dessa linda família.

Aos meus amigos de graduação **Caroline, Hellen, Jéssica, Yuri, Luana, Bruna, Cauê e Mel**, por marcarem uma fase tão especial e inesquecível em minha vida. Sempre os levo comigo nas melhores lembranças.

Aos meus **amigos de Assis**, aqueles que torceram por mim, entenderam minha ausência, mas fizeram da distância um mero detalhe. Obrigado por acompanharem minha trajetória até aqui e por muitas vezes, através de simples palavras, me darem forças para continuar.

Por fim, com imenso respeito e carinho, agradeço aos **Pacientes** que em um momento de sofrimento, aceitaram contribuir com a pesquisa, sem eles, este trabalho seria impossível de ser realizado.

RESUMO

Ortiz IMDP. **Genes codificadores de microRNAs regulados por metilação em carcinomas papilíferos de tireoide**. São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O carcinoma papilífero (CPT) é o tipo histológico mais frequente entre os cânceres de tireoide. Geralmente são doenças indolentes, entretanto, não são conhecidas opções terapêuticas eficazes nos casos agressivos. A metilação de DNA, juntamente com a regulação por microRNAs (miRNA) são considerados mecanismos efetores do controle epigenético da expressão gênica e ainda pouco explorados em CPT. Estudos prévios de metilação global revelaram, entre outros achados, a presença de genes de miRNAs alterados por metilação. O objetivo deste estudo foi identificar e confirmar o papel de genes de miRNAs em CPT utilizando os dados prévios do grupo e os depositados no *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Para isso, o estudo foi dividido em três módulos principais. No primeiro módulo, os dados do estudo prévio foram reanalisados sendo identificadas 50 sondas diferencialmente metiladas, das quais 42 (27 genes de microRNAs) foram confirmadas pelo banco de dados do TCGA. Os dados de expressão de miRNAs provenientes do TCGA permitiu identificar 67 miRNAs diferencialmente expressos. Utilizando uma análise integrada (dados de metilação e expressão de miRNAs do TCGA), três miRNAs foram selecionados (hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-146b-3p e hsa-miR-21-5p) como candidatos a serem regulados por metilação. Estes miRNAs apresentaram expressão aumentada e sondas diferencialmente metiladas (hipometilação). As interações entre miRNAs e mRNAs (dados do TCGA), revelaram 348 transcritos com correlação negativa e preditos como alvos dos três miRNAs (162 para o hsa-miR-146b-5p; 172 para o hsa-miR-146b-3p; 104 para o hsa-miR-21-5p). No segundo módulo, os miRNAs alterados foram confirmados por pirosequenciamento e RT-qPCR. Foi observado um padrão de

hipometilação significativo nos CPT em relação ao TN e LBT (lesões benignas de tireoide). A análise de RT-qPCR revelou um aumento significativo da expressão de hsa-miR-21-5p e hsa-miR-146b-5p nas amostras tumorais (N=103) em relação ao TN (N=40) e LBT (N=32). A expressão combinada dos dois miRNAs permitiu a distinção de 45/47 CPT dos 66/67 tecidos não-malignos (96% de sensibilidade e 99% de especificidade). A correlação entre os dados de metilação e expressão do gene *MIR21* classificou 41/45 CPT dos 55/60 tecidos não malignos (91% de sensibilidade e 92% de especificidade). Para o gene *MIR146B* foi verificada a distinção entre os 45/47 CPT dos 61/61 NT/LBT (96% de sensibilidade e 100% de especificidade). Foram também selecionados e analisados por RT-qPCR sete genes alvos destes miRNAs (*MPPED2*, *STXBP5L*, *MRO*, *FHL1*, *FLRT1*, *DOK6* e *MOB3B*). Foram detectadas expressões significativamente mais baixas em CPT quando comparado a TN e LBT para todos os genes selecionados. Os achados de metilação e expressão dos miRNAs e mRNAs foram associados com dados clínicos-patológicos. A mutação *BRAFV600E* foi significativamente associada com a hipometilação e expressão aumentada de hsa-miR-21-5p e hsa-miR-146b-5p. No terceiro módulo, foi avaliado o papel da metilação na expressão dos miRNAs em três linhagens celulares de CPT (TPC1, K1 e BCPAP). Após a análise do nível de metilação basal dos *MIR146B* e *MIR21*, as células foram tratadas com 1µM e 3µM de 5-Aza-2'-deoxicitidina. A desmetilação após tratamento foi confirmada por pirosequenciamento em sequências repetitivas das regiões *AluYb8* e *AIR1Sat*. A metilação e expressão do gene *MIR146B* nas três linhagens celulares revelou o *MIR146B* como potencialmente regulado por metilação. Este estudo deu fortes evidências que os genes *MIR21* e *MIR146B* são regulados por metilação e atuam regulando genes alvos críticos envolvidos em CPT. Estes miRNAs tem potencial para serem utilizados na prática clínica como marcadores diagnósticos.

SUMMARY

Ortiz IMPD. **[MicroRNAs genes regulated by methylation in papillary thyroid carcinomas]**. São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common histological type among thyroid cancers. Although PTC usually represents an indolent disease, no effective treatment has been described in aggressive cases. DNA methylation associated with microRNAs (miRNA) regulation is an effective epigenetic mechanism for controlling gene expression and poorly explored in CPT. Our previous studies using global DNA methylation analysis revealed, among other results, miRNAs regulated by methylation. The objective of this study was to identify and confirm the role of miRNAs genes in CPT using our previous data and those deposited in The Cancer Genome Atlas (TCGA). Therefore, this study was divided in three main modules. In the first module, data from the previous study were reanalyzed and 50 differentially methylated probes were identified, of which 42 (27 microRNA genes) were confirmed using the TCGA data. The miRNA expression data from TCGA allowed us to identify 67 differentially expressed miRNAs. An integrative analysis (methylation and expression data of miRNAs from TCGA) was performed and three miRNAs (hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-146b-3p and hsa-miR-21-5p) were selected as candidates to be regulated by methylation. These miRNAs were overexpressed and hypomethylated. Predicted miRNA-mRNA interactions (TCGA data) revealed 348 transcripts with negative correlation with three miRNAs (162 for hsa-miR-146b-5p; 172 for hsa-miR-146b-3p; 104 for hsa-miR-21-5p). In the second module, the altered miRNAs were confirmed by pyrosequencing and RT-qPCR. A significant hypomethylation pattern in PTC compared to NT and TBL (thyroid benign lesions) was observed. The RT-qPCR analysis revealed a significant increase of hsa-miR-21-5p and hsa-miR-146b-5p expression in tumors

(N=103) compared to NT (N=40) and TBL (N=32). Combining these two miRNAs expression values was possible to discriminate 45/47 PTC from 66/67 non-malignant tissues (96% sensitivity and 99% specificity). Similarly, the correlation between methylation and expression distinguished 41/45 PTC from 55/60 non-malignant tissues (91% sensitivity and 92% specificity) for *MIR21* gene and 45/47 PTC from 61/61 NT/TBL (96% sensitivity and 100% specificity) for *MIR146B* gene. Seven of these miRNAs target genes (*MPPED2*, *STXBP5L*, *MRO*, *FHL1*, *FLRT1*, *DOK6* and *MOB3B*) were selected and analyzed by RT-qPCR. All of them were significantly down regulated in PTC compared to NT and TBL. The miRNAs and mRNAs methylation and expression findings were also correlated with clinical and pathological data. The *BRAFV600E* mutation was significantly associated to hypomethylation and overexpression of hsa-miR-21-5p and hsa-miR-146b-5p. In the third module, the methylation role in the expression of these two miRNAs was evaluated in three PTC cell lines (TPC1, K1 and BCPAP). After evaluating the basal methylation levels of *MIR146B* and *MIR21*, the cell lines were treated with 1 μ M and 3 μ M of 5-Aza-2'-deoxycytidine. The repetitive *AluYb8* and *AIR1Sat* regions were confirmed as demethylated using pyrosequencing. Methylation and expression data in these three cell lines revealed that *MIR146B* is putatively regulated by methylation. This study provides strong evidence that *MIR21* and *MIR146B* genes are regulated by methylation, controlling crucial target genes involved in PTC. Moreover, these miRNAs have potential to be used as diagnostic markers in the clinical practice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Processo de metilação do DNA em regiões de genes codificadores de miRNAs.....	18
Figura 2	Fluxograma ilustrando os módulos do estudo.....	26
Figura 3	Dados do mapeamento das regiões alvo do ensaio de pirosequenciamento para o gene <i>MIR21</i> e <i>MIR146B</i>	36
Figura 4	Pirograma dos controles de metilação para o <i>MIR21</i> e <i>MIR146B</i>	40
Figura 5	Pirogramas de controles e amostras após o pirosequenciamento para a detecção de mutação em <i>BRAF</i>	46
Figura 6	Fluxograma ilustrando os resultados obtidos usando ferramentas de bioinformática para identificar genes codificadores de miRNA potencialmente regulados por metilação, seus respectivos transcritos alvos e as confirmações dos achados do estudo.....	53
Figura 7	Representação esquemática do <i>MIR21</i> e mapeamento das sondas diferencialmente metiladas.....	59
Figura 8	Representação esquemática do <i>MIR146B</i> e mapeamento das sondas diferencialmente metiladas.....	60
Figura 9	Confirmação dos achados de metilação aberrante dos <i>MIR21</i> e <i>MIR146B</i> pelo método de pirosequenciamento.....	64
Figura 10	Confirmação dos achados de expressão dos <i>MIR21</i> e <i>MIR146B</i> pelo método de RT-qPCR.....	65

Figura 11	Análise pareada de expressão e metilação da região correspondente ao <i>MIR21</i> e <i>MIR146B</i>	66
Figura 12	Correlação inversa entre a metilação dos genes de miRNAs e sua expressão em amostras pareadas.....	67
Figura 13	Níveis de expressão de sete transcritos alvos do hsa-miR-21-5p e hsa-miR-146b-5p em amostras não neoplásicas e CPT por RT-qPCR.....	69
Figura 14	Correlação entre a expressão dos transcritos (<i>DOK6</i> , <i>FHL1</i> , <i>FLRT1</i> , <i>MOB3B</i> , <i>MPPED2</i> , <i>MRO</i> e <i>STXBP5L</i>) e a expressão do hsa-miR-146b-5p e hsa-miR-21-5p.....	70
Figura 15	Curvas de sobrevida livre de doença em relação aos dados do padrão de metilação e expressão dos genes <i>MIR21</i> e <i>MIR146B</i>	74
Figura 16	Análise do padrão de metilação e expressão do <i>MIR21</i> (hsa-miR-21-5p) e <i>MIR146B</i> (hsa-miR-146b-5p) em relação à presença de mutação em <i>BRAF</i>	78
Figura 17	Pirograma representativo da porcentagem de metilação basal das linhagens celulares TPC1, K1 e BCPAP para os genes codificadores <i>MIR146B</i> e <i>MIR21</i>	80
Figura 18	Piogramas representativos do gene <i>MIR146B</i> nas linhagens celulares tratadas com 5-Aza-dC.....	83
Figura 19	Porcentagem de metilação e expressão relativa do gene <i>MIR146B</i> nas linhagens celulares TPC1, BCPAP e K1 tratadas com 5-Aza-dC.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínico-patológicas dos pacientes incluídos no estudo.....	32
Tabela 2	Cinquenta sondas correspondendo a regiões diferencialmente metiladas identificadas nos dados de metilação global do nosso grupo (CPT versus TN).....	56
Tabela 3	Integração entre sondas diferencialmente metiladas e os respectivos miRNAs representados.....	58
Tabela 4	Dez vias canônicas mais significativas enriquecidas pelos transcritos alvos de hsa-miR-146b-3p, hsa-miR-146b-5p e hsa-miR-21-5p identificadas pelo IPA.....	62
Tabela 5	Número de transcritos alvos dos três miRNAs e comparação com achados clínicos e histopatológicos.....	72
Tabela 6	Resultados da porcentagem de metilação (pirosequenciamento) e expressão relativa (RT-qPCR) dos <i>MIR21</i> e <i>MIR146B</i> associados com características clínico-patológicas dos pacientes com CPT (N=103) do presente estudo.....	73
Tabela 7	Níveis relativos de expressão dos setes genes alvos comparados com características clínico-patológicas dos pacientes com CTP.....	76
Tabela 8	Porcentagem de metilação de sequências repetitivas <i>AIR1Sat</i> e <i>AluYb8</i> nas linhagens TPC1, K1, BCPAP tratadas com 1µM e 3µM de 5-Aza-dC e DMSO (Controle: 0 µM de 5-Aza-dC).....	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Características principais dos tumores de tireoide de acordo com os subtipos histopatológicos.....	3
Quadro 2	Características dos iniciadores utilizados na PCR e pirosequenciamento dos genes codificadores de miRNAs (<i>MIR146B</i> e <i>MIR21</i>).....	37
Quadro 3	Características e curva de eficiência dos iniciadores dos transcritos alvos de miRNAs selecionados para a validação por RT-qPCR.....	44
Quadro 4	Características dos iniciadores utilizados na PCR e pirosequenciamento de <i>AIR1Sat</i> e <i>AluYb8</i>	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASI	Atipia de Significado Indeterminado
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
CBDT-BP	Carcinoma Bem Diferenciado de Tireoide de Bom Prognóstico
CBDT-PP	Carcinoma Bem Diferenciado de Tireoide de Pior Prognóstico
CCH	Carcinoma de Células de Hürtle
cDNA*	Complementary DNA
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFT	Carcinoma Folicular de Tireoide
CGI	Ilhas CpG
CH₃	Radical Metil
CIP*	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
CMT	Carcinoma Medular de Tireoide
cN0	Linfonodo Clinicamente Negativo
CpG	Citosina-fosfato-Guanina
CPDT	Câncer Pouco Diferenciado de Tireoide
CPT	Carcinoma Papilífero de Tireoide
CT	Câncer de Tireoide
DEPC	Água tratada com Dietil Pirocarbonato
DGCR8*	Di George syndrome critical region gene 8
DLDA*	Diagonal Linear Discriminant Analysis
DNA*	Deoxyribonucleic Acid
DMEM*	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO*	Dimethyl sulfoxide

DNMTs	DNA metiltransferases
dNTP*	Deoxynucleotide Triphosphates
DTT*	Dithiothreitol
EDTA*	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
FC*	Fold Change
GEO*	Gene Expression Omnibus
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPA*	Ingenuity Pathways Analysis
KOBAS*	KEGG Orthology Based Annotation System
LBT	Lesões Benignas de Tireoide
LFSI	Lesão Folicular de Significado Indeterminado
MAF*	Minor Allele Frequency
MAPK*	Mitogen Activated Protein Kinase
mM	Milimolar
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCI*	National Cancer Institute
ng	Nanograma
Ni	Não Informado
NF	Neoplasia Folicular
NTC*	No Template Control
OCTDF	Outros Carcinomas de Tireoide Derivados de Células Foliculares
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PACT*	Protein Kinase RNA Activator
pb	Pares de base
PBS*	Phosphate-buffered saline
PCR*	Polymerase Chain Reaction
PI3K*	Phosphatidylinositol 3-Kinase
pN0	Linfonodo patologicamente negativo
pN1	Linfonodo patologicamente positivo

RET*	Proto-oncogene Ret
RI	Radioiodo
RISC*	RNA-Induced Silencing Complex
RNA*	Ribonucleic Acid
rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR*	Reverse Transcription – quantitative PCR
SEER*	Surveillance, Epidemiology and End Results
SM	Suspeito de Malignidade
SNF	Suspeito de Neoplasia Folicular
SNP*	Single Nucleotide Polymorphism
TCGA*	The Cancer Genome Atlas
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TERT*	Telomerase Reverse Transcriptase
TN	Tecido Não Neoplásico
TP	Tireoidectomia Parcial
TRBP*	Transactivation Response RNA Binding Protein
TSH*	Thyroid-stimulating hormone
TSS*	Transcription Start Site
TT	Tireoidectomia Total
U	Unidade
UTR*	Untranslated Region
vcCPT	Variante clássica de CPT
vdeCPT	Variante difusa esclerosante de CPT
vfCPT	Variante folicular de CPT

*siglas ou abreviaturas derivadas do inglês

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de tireoide	1
1.2	Carcinoma papilífero de tireoide (CPT)	4
1.3	Diagnóstico	5
1.4	Alterações genéticas em CPT	8
1.5	Alterações epigenéticas em CPT	10
1.5.1	Metilação do DNA.....	11
1.5.2	microRNAs	15
1.5.3	Regulação da expressão de miRNAs	17
2	JUSTIFICATIVA.....	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo Geral.....	23
3.2	Objetivos Específicos	23
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1	Módulo 1: Identificação de miRNAs potencialmente regulados por metilação	27
4.1.1	Controle de qualidade e análise de sondas diferencialmente metiladas	27
4.1.2	Integração dos dados dos miRNAs diferencialmente metilados e expressos (TCGA).....	28
4.1.3	Predição de alvos dos miRNAs	29
4.2	Módulo 2: Confirmação e validação dos miRNAs diferencialmente metilados	30
4.2.1	Casuística e caracterização das amostras	30
4.2.2	Extração de ácidos nucleicos	33
4.2.3	Modificação de DNA por bissulfito de sódio	33

4.2.4	Análise do padrão de metilação dos genes de miRNAs por pirosequenciamento.	34
4.2.5	Análise da expressão de miRNAs	41
4.2.6	Análise da expressão de transcritos alvos de miRNAs.....	42
4.2.7	Análise da mutação em <i>BRAF</i>	45
4.3	Módulo 3: estudos em linhagens celulares para confirmação da regulação dos genes mir21 e mir146b por metilação	47
4.3.1	Cultura de linhagens celulares	47
4.3.2	Teste do 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT).....	48
4.3.3	Tratamento com 5-Aza-2'-Deoxicitidina para confirmação da regulação dos genes por metilação	49
4.3.4	Análise estatística.....	51
5	RESULTADOS.....	53
5.1	Módulo 1: Identificação de miRNAs potencialmente regulados por metilação e seus respectivos alvos	55
5.1.1	Dados de metilação global revelam genes de miRNAs potencialmente regulados por metilação	55
5.1.2	Identificação de miRNAs diferencialmente expressos e integração com dados de metilação e de expressão global (TCGA)	57
5.1.3	Predição de alvos de miRNAs e integração entre dados de expressão de miRNAs e mRNAs	61
5.2	Módulo 2: Confirmação e validação dos miRNAs diferencialmente metilados e mRNAs alvos.....	63
5.2.1	Hipometilação em genes codificadores de <i>MIR21</i> e <i>MIR146B</i> em CPT	63
5.2.2	Aumento da expressão de hsa-miR-21-5p e hsa-miR-146b-5p associado com a hipometilação dos genes desses miRNAs.....	64
5.2.3	Expressão reduzida de sete transcritos alvos dos miRNAs em CPT	68
5.2.4	Associação dos achados com características clínico-patológicas.....	71
5.2.5	Mutação em <i>BRAF</i> está associada com hipometilação e expressão	

	aumentada dos genes <i>MIR21</i> e <i>MIR146B</i>	77
5.3	Módulo 3: Estudos em linhagens celulares para confirmação da regulação dos genes <i>MIR21</i> e <i>MIR146B</i> por metilação	79
5.3.1	Metilação basal das células BCPAP, K1 e TPC1 nas regiões do <i>MIR21</i> e <i>MIR146B</i>	79
5.3.2	Teste de viabilidade celular	81
5.3.3	Confirmação da desmetilação após tratamento com 5-Aza-dC.....	81
5.3.4	Gene <i>MIR146B</i> é potencialmente regulado por metilação	82
6	DISCUSSÃO	85
7	CONCLUSÃO	107
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	109

ANEXOS

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

Anexo 2 mRNAs diferencialmente expressos (TCGA) e interações entre miRNAs e mRNAs associados com dados clínicos-patológicos (dados externos - TCGA).

Anexo 3 Transcritos alvos de miRNAs selecionados para a validação por RT-qPCR usando o banco de dados do TCGA.

Anexo 4 Funções biológicas dos transcritos alvos validados por RT-qPCR.

APÊNDICES

Apêndice 1 Identificação de 67 microRNAs diferencialmente expressos ao comparar CPT com TN pelo banco de dados do TCGA.

Apêndice 2 Top 10 vias canônicas significativas ($P < 0,05$) enriquecidas pelos transcritos alvos de hsa-miR-146b (5p e 3p) e hsa-miR-21-5p (112, 82 e 60 vias $p < 0,05$,

respectivamente) identificadas pelo KOBAS (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/home.do>).

Apêndice 3 Porcentagem de células das linhagens BCPAP e TPC1 originadas de carcinomas papilíferos de tireoide viáveis no teste de viabilidade celular (MTT).

Apêndice 4 Figura suplementar 4.1. Pirograma representativo dos ensaios de desmetilação das regiões *AIR1Sat* (a esquerda) e *AluYb8* (a direita) na linhagem TPC1.

Figura suplementar 4.2. Pirograma representativo dos ensaios de desmetilação das regiões *AIR1Sat* (a esquerda) e *AluYb8* (a direita) na linhagem K1 originada de carcinoma papilífero de tireoide. **Figura suplementar 4.3.** Pirograma representativo dos ensaios de desmetilação das regiões *AIR1Sat* (a esquerda) e *AluYb8* (a direita) na linhagem BCPAP.

Apêndice 5 Análise de expressão global de miRNAs. **Figura suplementar 5.1.** Dados de expressão global de microRNAs. **Tabela suplementar 5.1.** miRNAs diferencialmente expressos após o tratamento com 5-Aza-2'-deoxicitidina nas linhagens celulares BCPAP e TPC1 derivadas de carcinomas papilíferos de tireoide comparadas com células não tratadas.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE TIREOIDE

O câncer de tireoide (CT) é a neoplasia mais comum e de maior incidência do sistema endócrino (SIEGEL 2017). Nos últimos anos, houve um aumento na sua incidência (>5% ao ano, tanto em homens como em mulheres) comparado aos outros tipos de cânceres (KILFOY et al. 2013; SIEGEL et al. 2017; *National Cancer Institute*-NCI 2015).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a ocorrência desse tumor para o ano de 2016 foi estimada em 7.000 novos casos, seis casos a cada 100 mil mulheres, o que coloca o CT como o oitavo tipo mais incidente no sexo feminino (excluindo o câncer de pele não melanoma) (Ministério da Saúde 2015).

Segundo o banco de dados do *Surveillance, Epidemiology and End Results*-SEER (2015), a incidência dessa neoplasia triplicou nos últimos 35 anos. Esse aumento varia entre diferentes populações e possivelmente está relacionado com fatores étnicos e ambientais (ROMAN et al. 2017). Todavia, apesar do aumento da incidência, a taxa de mortalidade manteve-se estável, o que se deve, provavelmente, à melhoria nas técnicas diagnósticas e ao tratamento (NIKIFOROV e NIKIFOROVA 2011; DAVIES e WELCH 2014).

A etiologia do câncer de tireoide inclui histórico familiar, fatores hormonais, deficiência de iodo e principalmente exposição à radiação (VIGLIETTO e DE MARCO 2011; LIU et al. 2017). A radiação é o fator de

risco mais estudado devido ao seu amplo uso na terapia médica (FAN et al. 2017; KANYILMAZ et al. 2017; WANG et al. 2017) e a exposição resultando de acidentes nucleares, como exemplo, em Chernobyl (WILLIAMS 2008; FUCIC et al. 2016; BAZYKA et al. 2016)

Os carcinomas de tireoide originam-se das células epiteliais foliculares e parafoliculares ou células C (ELISEI e PINCHERA 2012), sendo subdivididos em quatro grupos distintos de acordo com suas características histopatológicas. Os carcinomas originados das células foliculares classificam-se em carcinomas diferenciados, incluindo papilífero (CPT) e folicular (CFT), pouco diferenciados (insular), não diferenciados ou anaplásicos (CAT) e os medulares derivados das células C (RODRÍGUEZ-RODERO et al. 2013). Estes últimos correspondem de 3 a 5% dos tumores (ELISEI e PINCHERA 2012) (Quadro 1).

Os tumores de tireoide, em sua maioria, são originados de células foliculares, abrangendo mais de 90% das neoplasias (XING 2013), sendo os carcinomas bem diferenciados de duas a quatro vezes mais frequentes (SHERMAN 2003; CABANILLAS et al. 2016). Esses carcinomas aparecem em idade mais precoce no gênero feminino (mulheres: 40-50 anos e homens: 50 - 60 anos) (JIN et al. 2013). Em adição, são relativamente indolentes, podendo ser removidos por tireoidectomia total ou parcial e posteriormente, ablação com radioiodo, se necessário (KONDO et al. 2006). Quando o diagnóstico é precoce e os pacientes são tratados em estágios iniciais, o prognóstico é favorável, havendo sobrevida aumentada e sem alterações significativas na qualidade de vida (WARD et al. 2007).

Quadro 1 - Características principais dos tumores de tireoide de acordo com os subtipos histopatológicos.

Tipo de Tumor	Carcinoma papilífero de tireoide (CPT)	Carcinoma folicular de tireoide (CFT)	Carcinoma pouco diferenciado de tireoide (CPDT)	Carcinoma anaplásico de tireoide (CAT)	Carcinoma medular de tireoide (CMT)
Célula de origem	Células foliculares	Células foliculares	Células foliculares	Células foliculares	Células C ou parafoliculares
Variante	Clássica, folicular, células altas e raras	Carcinoma de células de Hürthle (CCH)	-	-	-
Prevalência	84%	2-5%	6%	1%	3-5%
Características	Bem diferenciado com arquitetura papilífera, núcleos grandes com formato oval, cromatina hipodensa, fendas nucleares, propensão para metástases linfáticas	Bem diferenciado, hiper celular com padrões microfoliculares, sem características do CPT, invasão capsular ou vascular	Pouco diferenciado, sobreposição com os CPT e CFT. Agressividade intermediária entre carcinomas bem e indiferenciados	Indiferenciado, células pleomórficas gigantes, epitelióides ou fusiformes. Agressivo. Surgimento a partir de CPT, CFT e PDT ou <i>de novo</i>	Agressividade moderada, mutações em <i>RET</i> . Forma familiar
Tratamento	Tireoidectomia, ablação com radioiodo (casos selecionados)	Tireoidectomia, ablação com radioiodo	Cirurgia, radioiodo terapia (casos selecionados) quimioterapia, radioterapia, novas drogas cuidados paliativos	Cirurgia, quimioterapia, radioterapia, novas drogas cuidados paliativos	Cirurgia, quimioterapia, radioterapia, novas drogas
Prognóstico	Favorável (exceção para a variante de células altas). Propensão para metástase linfática	Favorável (exceção para células de Hürthle). Propensão para metástase via corrente sanguínea	Desfavorável. Agressividade intermediária entre carcinomas diferenciados e indiferenciados	Muito ruim. Extremamente invasivo e metastático	Intermediário. Moderadamente agressivo. Propensão para metástase linfática

Fonte: Dados adaptados de XING (2013) e FAGIN e WELLS (2016).

1.2 CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREOIDE (CPT)

Dentre os carcinomas bem diferenciados, os carcinomas papilíferos da tireoide (CPT) são os mais frequentes e correspondem aproximadamente a 85% dos casos diagnosticados, com ocorrência até quatro vezes maior em mulheres e predominância em indivíduos de 30-50 anos (XING 2013; FAGIN e WELLS 2016). Os CPT são também responsáveis pelo aumento da incidência de câncer de tireoide no mundo (ITO et al. 2013).

Esses tumores são facilmente distinguidos dos demais tipos tumorais (MAITRA e ABBAS et al. 2005). A forma clássica do carcinoma papilífero apresenta diferenciação das células foliculares, sendo caracterizada pela formação de papilas, um conjunto distinto de alterações nucleares (maior volume, alongamento, aglomeração, sobreposição de cromatina dispersa) e invaginações do citoplasma (RIESCO-EIZAGUIRRE e SANTISTEBAN 2007; ELSHEIKH et al. 2009).

Os subtipos histológicos dos CPT são fatores importantes a serem considerados na avaliação do risco, pois algumas variantes estão associadas com maior agressividade enquanto outras a um comportamento indolente (PENNA et al. 2016).

A forma mais agressiva é observada na variante de células altas, enquanto as variantes clássica e folicular são consideradas menos agressivas (HU et al. 2006). A variante de células altas é caracterizada por predomínio (> 50%) de células tumorais oncocíticas cuja altura é pelo menos três vezes a sua largura (HAUGEN et al. 2016). Esta variante é observada

principalmente em pacientes idosos em estágios mais avançados da doença (OSTROWSKI e MERINO 1996; LEUNG et al. 2008) e apresentam maior taxa de recorrência e sobrevida diminuída (PENNA et al. 2016).

Embora os CPT, em geral, apresentem bom prognóstico, uma pequena porcentagem é agressiva, podendo ocorrer recidiva e levar o paciente a morte (SCHLUMBERGER et al. 1998, KONDO et al. 2006; MAZZAFERRI 2006; WARD et al. 2007). Entre as características clínico-patológicas consideradas como fatores de alto-risco de recidiva e mortalidade para pacientes com CPT estão idade avançada ao diagnóstico, tumor primário de grande dimensão, invasão extra-tireoidiana, variantes de células altas, metástase linfonodal e metástase à distância (SECCO e CARVALHO 2010). Estes fatores são utilizados para o estadiamento clínico e são fundamentais para determinar decisões como extensão da cirurgia, indicação de radioiodoterapia e periodicidade de vigilância durante o seguimento clínico do paciente (SHERMAN et al. 1998; COOPER et al. 2009).

1.3 DIAGNÓSTICO

A presença de nódulos tireoidianos é a principal manifestação clínica das doenças associadas à glândula tireoide. O diagnóstico pode ser realizado por palpação ou ultrassonografia, sendo muitas vezes o nódulo descoberto em exames de rotina (FRATES et al. 2005). Uma meta análise composta por 11 estudos norte-americanos revelou que a maioria dos casos

encontrados é composta por lesões benignas, englobando bócios multinodulares, adenomas foliculares, cistos e tireoidites crônicas (WANG et al. 2011). A identificação do potencial maligno dos nódulos com rapidez e acurácia tem sido um grande desafio (NIKIFOROV e NIKIFOROVA 2011; RAHMAN et al. 2017).

A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é o padrão ouro para o diagnóstico dos nódulos de tireoide, seguida de análise histopatológica da amostra (COOPER et al. 2009). Este procedimento apresenta o melhor custo-benefício, pois permite a identificação dos casos em que são necessários tratamentos cirúrgicos (BOSE e WALTZ 2012; SCHNEIDER e CHEN 2013). Todavia, há limitações relacionadas à qualidade do material coletado e determinadas características dos nódulos.

O critério utilizado para a definição do diagnóstico é o de Bethesda subdividido em seis categorias: I- Não diagnóstico/Insatisfatório; II- Benigno; III- Atipia de significado indeterminado/Lesão folicular de significado indeterminado (ASI/LFSI); IV- Neoplasia folicular/Suspeito de neoplasia folicular (NF/SNF); V- Suspeito de malignidade (SM); VI- Maligno (CIBAS e ALI 2009).

Em uma meta análise, WANG et al. (2011) relataram que a grande maioria das PAAFs resulta em um diagnóstico de lesões benignas (72%), 5% são malignas, 6% não são passíveis de serem diagnosticadas e 17% das lesões apresentam um diagnóstico indeterminado. Essas lesões classificadas nas categorias III e/ou IV do critério de Bethesda possuem características citológicas de lesões com padrão de crescimento folicular,

tornando difícil determinar a existência ou ausência de lesões malignas (NIKIFOROV et al. 2009; FERRAZ et al. 2011).

Dados em literatura evidenciam que inúmeros pacientes são expostos aos riscos de cirurgias desnecessárias devido ao resultado indeterminado da citopatologia das punções aspirativas por agulha fina (GONÇALVES FILHO e KOWALSKI 2004; GONÇALVES FILHO e KOWALSKI 2005). Por este fato, muitos estudos buscam marcadores diagnósticos baseados na expressão global de mRNA, miRNA e padrões diferenciais de metilação que possam ser utilizados em amostras de PAAFs e passíveis de serem aplicados na rotina clínica (RODRÍGUEZ-RODERO et al. 2013; ROSSING 2013; WISEMAN et al. 2013, BARROS-FILHO et al. 2015; ZHANG et al. 2017; CHOU et al. 2017).

Recentemente, nosso grupo elaborou um teste molecular baseado na expressão de três genes alvos (Registro de Patente PI 102015015096-2), capaz de classificar tumores e amostras não tumorais com alta sensibilidade e especificidade (BARROS-FILHO et al. 2015). Resumidamente, o perfil global de expressão de 61 CPT foi comparado com 13 tecidos não neoplásicos (TN) adjacentes. Foram utilizados os dados externos provenientes do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e *Gene Expression Omnibus* (GEO), englobando 138 pares de amostras CPT/TN. Esta análise contribuiu para a seleção de 28 genes os quais foram avaliados para a expressão de transcritos (RT-qPCR). Um algoritmo diagnóstico foi desenhado pela combinação de *CLDN10*, *HMGA2* e *LAMB3* em um grupo de amostras composto por 23 TN, oito lesões benignas de tireoide (LBT) e

86 CPT. O modelo foi validado em um grupo independente compreendendo 10 TN, 140 LBT, 120 CPT e 12 outros carcinomas de tireoide derivados de células foliculares (OCTDF), demonstrando 94% de sensibilidade e 96% de especificidade em discriminar lesões malignas de benignas da tireoide. Em adição, os maiores escores do algoritmo diagnóstico foram associados com o envolvimento de linfonodos. Um estudo prospectivo está sendo realizado por nosso grupo com o objetivo de confirmar o poder diagnóstico e aplicabilidade dos testes baseados em expressão de transcritos e metilação de DNA em amostras provenientes de PAAFs.

1.4 ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM CPT

O conhecimento das alterações genéticas no câncer de tireoide tem se expandido consideravelmente. Em CPT, a alteração mais comumente encontrada é a mutação em ponto no gene *BRAF* (aproximadamente 60% dos casos), onde a substituição T1799A leva a troca do aminoácido valina pelo ácido glutâmico (V600E) (RICARTE-FILHO et al. 2009; FAGIN e WELLS 2016). Além dessa, outras alterações também são descritas em CPT, porém em menor frequência, incluindo mutações em ponto em *RAS* (15%) e rearranjos cromossômicos que levam a expressão alterada dos domínios quinases de *BRAF* e de receptores de tirosina quinase como *RET*, *NTRK* e *ALK* (12%) (NIKIFOROV 2011; XING 2013; FAGIN e WELLS 2016).

Relatos em literatura de CPT revelam uma associação entre prognóstico desfavorável e a presença da mutação em *BRAF* (NIKIFOROVA

et al. 2003; XING 2005; ADENIRAN et al. 2006; LUPI et al. 2007; XING 2007; KIM et al. 2012; LIU e XING 2016; JIN et al. 2016). Entretanto, tem sido demonstrado que apenas a presença da mutação em *BRAF* não é efetiva para a predição de risco de recidiva ou morte (TROVISCO et al. 2005; PELTTARI et al. 2012).

Em paralelo, as mutações C228T e C250T (1 295 228 C>T e 1 295 250 C>T, respectivamente) na região promotora do gene *TERT* (*telomerase reverse transcriptase*) aumentam sua atividade transcricional e estão associados a carcinomas de tireoide mais agressivos e metástase linfonodal (LIU et al. 2013; HORN et al. 2013; HUANG et al. 2013; XING et al. 2014; LEE et al. 2017). Além disso, mutações em *TERT* foram também associadas a um pior prognóstico em CPT, especialmente quando acompanhados de *BRAF* mutado (LIU et al. 2013; OISHI et al. 2017). A associação entre estas duas mutações foi observada em aproximadamente 9% de CPT e com frequência alta em CPDT (40%) e CAT (>70%) (FAGIN e WELLS 2016). Alguns fatores de transcrição são alvos da via de sinalização MAPK, e quando ocorre mutação na região promotora de *TERT*, são originados sítios de ligação para esses fatores de transcrição. Uma vez ativados pela via de sinalização MAPK promovida por *BRAFFV600E*, ocorre o aumento da expressão de *TERT* (VINAGRE et al. 2013). A co-existência das mutações em *TERT* e *BRAF* em CPT apresentaram maior taxa de recidiva quando comparado a tumores com apenas uma das mutações, revelando ainda um efeito sinérgico para um pior prognóstico (LIU e XING 2016).

Um estudo realizado pelo TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) permitiu uma abrangente análise do genoma de 496 amostras de CPT e investigou o papel de muitas alterações que estão envolvidas no desenvolvimento e progressão do câncer de tireoide (*THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK* 2014).

1.5 ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS EM CPT

Adicionalmente às alterações genéticas descritas em CPT, as alterações epigenéticas foram relacionadas ao desenvolvimento deste tipo tumoral (RODRÍGUEZ-RODERO et al. 2014; *THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK* 2014; BELTRAMI et al. 2017). Essas alterações podem modificar o padrão de expressão de genes fundamentais para o desenvolvimento do câncer (KANWAL e GUPTA 2012).

Os eventos epigenéticos são mudanças herdáveis que desempenham um papel fundamental na regulação da expressão gênica sem alterar a sequência de nucleotídeos do DNA (FEINBERG 2007; SAWAN 2008; FEINBERG 2013). Os principais mecanismos epigenéticos compreendem: as modificações pós-transcricionais das proteínas histonas, a regulação por pequenos RNAs não codificadores e a metilação do DNA em dinucleotídeos CpG, estando este, envolvido em processos biológicos tais como a inativação do cromossomo X e o *imprinting* genômico (Revisado por INBAR-FEINBERG et al. 2013).

As alterações epigenéticas têm um papel essencial na tumorigênese. A metilação do DNA, por exemplo, está associada, na maioria dos casos, à inibição da transcrição e ao silenciamento gênico, podendo ser um mecanismo de inativação de genes supressores tumorais (FEINBERG 2007; SHENOUDA e ALAHARI 2009). De maneira similar, a expressão alterada de microRNAs (miRNAs) vem sendo relacionada a diversos tipos tumorais, podendo funcionar como oncogenes ou genes supressores de tumor (JANSSON e LUND 2012).

1.5.1 Metilação do DNA

O processo de metilação ocorre por uma modificação covalente causada pela adição de grupos metil (CH_3) na posição 5 do anel pirimídico que forma a citosina, transformando-a em uma 5-metil-citosina. Este processo ocorre em citosinas seguida de uma guanina (dinucleotídeos CpG) e requer a atividade enzimática das DNA metiltransferases (DNMTs) (ROBERTSON 2005).

A maior parte dos dinucleotídeos CpGs estão relacionados a regiões repetitivas do DNA e se encontram densamente metilados. Os dinucleotídeos CpG também podem estar condensados em regiões não repetitivas, formando as “ilhas CpG” (CGI) (STIRZAKER et al. 2014). Calcula-se que existam aproximadamente 30 mil CGI distribuídas no genoma humano (COCOZZA et al. 2011), e estima-se que 70% delas estejam localizadas nos promotores de genes (SAXONOV et al. 2006). Em células normais, as ilhas CpGs se apresentam não metiladas, permitindo a

acessibilidade aos fatores de transcrição e, conseqüentemente, a regulação da expressão gênica (STIRZAKER et al. 2014). Além de CGI e regiões repetitivas, os dinucleotídeos CpGs também podem estar mapeados em sítios de início de transcrição, corpo de gene, regiões regulatórias e regiões intergênicas (JONES 2012).

Recentemente, abordagens para investigar o perfil de metilação global do câncer de tireoide levou a identificação de novas regiões envolvidas no processo neoplásico, tais como CGI *shore/shelf*, região não promotora, *open sea* e *enhancer* (SANDOVAL e ESTELLER 2012; JONES 2012; WHITE et al. 2016). No entanto, o papel de marcas epigenéticas nestes locais ainda não está totalmente esclarecido. Igualmente, é pouco explorada a metilação como um mecanismo de regulação da expressão gênica em CPT, mesmo no estudo robusto realizado pelo TCGA (*The Cancer Genome Atlas Research Network* 2014).

Durante o processo tumoral, regiões repetitivas que são densamente metiladas perdem radicais metil, em um quadro de hipometilação global, enquanto regiões normalmente não metiladas apresentam-se hipermetiladas, levando ao silenciamento da expressão gênica. Estes processos podem levar a inativação de genes supressores de tumor e ativação de proto-oncogenes e instabilidade cromossômica (JONES e BAYLIN 2007; SANDOVAL e ESTELLER 2012). A alteração do padrão de metilação do DNA em genes supressores de tumor e proto-oncogenes são eventos comuns em carcinomas de tireoide. Os principais genes epigeneticamente alterados em câncer de tireoide são *PTEN*, *RASSF1A*,

TIMP3, *SLC5A8*, *DAPK*, *RAP β 2* e *RAP1GAP* (revisado por FAAM et al. 2015).

Nosso grupo está desenvolvendo estudos utilizando a análise de metilação do DNA com o objetivo de identificar biomarcadores diagnósticos de lesões tireoidianas (DOS REIS 2015) avaliaram 50 TN, 17 LBT, 60 CPT e 14 OCTDF (incluindo 10 FTC e 4 CAT) pela plataforma *Infinium® Human Methylation450 BeadChip* (Illumina). A combinação de nove sondas alteradas por metilação permitiu distinguir as lesões malignas das benignas com 97% de sensibilidade e 82% de especificidade. Utilizando um banco de dados externos (código de acesso GSE53051) foi verificada que o algoritmo apresentava 92% de sensibilidade e 78% de especificidade. Neste estudo foi desenvolvido um classificador prognóstico baseado na análise global de metilação de DNA. Foram utilizadas 7700 sondas mapeadas nas regiões promotoras obtidas a partir da comparação entre CAT e CPDT com TN. Um total de 21 sondas foi observado ao comparar carcinomas bem diferenciados de tireoide de pior prognóstico (CBDT-PP) com casos de carcinomas bem diferenciados de tireoide de bom prognóstico (CBDT-BP). Estas sondas foram submetidas a uma análise discriminante diagonal linear (DLDA) para treinar um classificador prognóstico, o qual permitiu distinguir CBDT-PP de CBDT-BP com 63% de sensibilidade e 92% de especificidade. O desempenho de acordo com a estratificação do modelo preditivo foi dividido em baixo, intermediário e alto risco. A análise de sobrevida livre de doença revelou maior risco de recorrência de acordo com o escore de estratificação. A predição de alto risco foi considerada um marcador independente de pior

prognóstico em uma análise multivariada ($P < 0,001$). O classificador prognóstico encontrado nessa análise foi testado usando os dados de metilação do TCGA em amostras de CPT, confirmando uma precisão preditiva similar (64% de sensibilidade e 88% de especificidade) (dados não publicados).

Em outro estudo do nosso grupo, BELTRAMI et al. (2017) analisaram o perfil de metilação diferencial em 41 CPT e 41 TN adjacentes (p ajustado $< 0,05$; $|\Delta\beta| \geq 0,15$). Esta análise revelou 6070 sondas diferencialmente metiladas, das quais 89% (5425 sondas) estavam hipometiladas nos tumores. Uma análise supervisionada revelou dois grupos, um composto exclusivamente pelos CPT e o outro com todos os TN e seis casos CPT. Utilizando o banco de dados do TCGA, 4995 das 6070 sondas foram confirmadas como diferencialmente metiladas. Houve um enriquecimento das sondas mapeadas em regiões não-promotoras (76 vs 59% representadas pela plataforma, $p < 0,0001$), longe de ilha CpG chamado "open sea" (66 vs 33%, $p < 0,0001$) e *enhancers* (54 vs. 21%, $p < 0,0001$). A análise integrada entre os dados de metilação e expressão gênica revelou 867 sondas representando 420 genes diferencialmente expressos. Um total de 214 e 49 genes foram avaliados com correlação negativa e positiva (185 e 38 foram confirmados pelo TCGA), respectivamente, com sondas de metilação. Foi observado que cerca de metade das sondas com correlação negativa (163) foram encontradas em regiões promotoras e 2% estavam mapeadas em CGI, o oposto foi observado na correlação positiva, a qual revelou 10% (6) das sondas em regiões promotoras ($p < 0,0001$) e 21% (11)

em CGI ($p < 0,0001$). Não foram observadas diferenças significativas em *enhancers* ($p = 0,299$) (BELTRAMI et al. 2017).

1.5.2 microRNAs

Durante as últimas décadas, diversos tipos de RNAs não codificadores vem ganhando destaque na regulação da expressão gênica, em especial os microRNAs (miRNAs). miRNAs são descritos como pequenas moléculas de RNA de fita simples, compostos por 19 a 25 nucleotídeos de comprimento (MULERO-NAVARRO e ESTELLER 2008). A modulação da expressão mediada por miRNAs ocorre quando estes se ligam seletivamente por meio do pareamento de bases à região não traduzida (3'UTR) do RNA mensageiro (mRNA) alvo. O grau de complementaridade entre miRNA-mRNA determina se o mRNA alvo será degradado ou se a tradução será inibida (BRATTACHARYYA et al. 2006). De maneira geral, a clivagem do mRNA ocorre quando a complementariedade é total, sendo este evento mais comum em plantas (LLAVE et al. 2002). Em animais, o pareamento é parcial e menos extenso e a inibição da tradução é o processo mais comum, reduzindo a concentração do seu mRNA alvo. Sob esse grau de inibição, grande parte das proteínas ainda se mantém ativa e tal processo é denominado ajuste de expressão proteica de “modulação fina” (GUO et al. 2010).

Estima-se que essas pequenas moléculas regulem mais de um terço dos genes humanos e aproximadamente 60% dos mRNA transcritos sejam alvos potenciais de miRNAs (FRIEDMAN et al. 2009). Sendo assim os

miRNAs apresentam um papel importante em processos fisiológicos distintos que incluem a resposta ao estresse, metabolismo, renovação, diferenciação, proliferação celular e apoptose (HWANG e MENDELL 2006).

Um complexo de múltiplas proteínas está envolvido na biogênese dos miRNAs. Pela via canônica, os genes são transcritos pela RNA polimerase II no núcleo, formando uma longa cadeia com cerca de 70-110 nucleotídeos, denominada pri-miRNA. Ainda no núcleo, o pri-miRNA é processado por uma RNase III conhecida como Drosha (endonuclease), juntamente ao cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) e uma helicase, formando os precursores de miRNA (pré-miRNA) (LEE et al. 2003). O pré-miRNA é exportado do núcleo para o citoplasma ativamente pelo complexo exportina-5/RanGTP. No citoplasma este precursor é processado por uma RNase III citoplasmática, conhecida como DICER (HUTVÁGNER et al. 2001), além dos cofatores PACT (*Protein Kinase RNA Activator*) e TRBP (*Transactivation Response RNA Binding Protein*) responsáveis por clivar a alça do *hairpin* formando uma dupla fita do miRNA. A fita madura é então incorporada a um complexo ribonucleoproteico de silenciamento, denominado RISC, e a outra fita geralmente é degradada. O complexo formado se liga por complementariedade à região 3' UTR do mRNA alvo levando à inibição da sua tradução (TANG 2005).

Segundo o banco de dados miRBase (<http://www.mirbase.org>) estão registrados 2588 miRNAs maduros em humanos (Atualização em Julho/2017). Vários estudos evidenciam o envolvimento dos miRNAs na iniciação, desenvolvimento e progressão de neoplasias em diversos tecidos

(LU et al. 2017; QIAN et al. 2017; CHEN et al. 2017; LIU et al. 2017), incluindo câncer de tireoide (ZHAO et al. 2015). Entretanto, os mecanismos de desregulação de miRNAs ainda não são totalmente compreendidos.

1.5.3 Regulação da expressão de miRNAs

O controle transcricional é considerado a principal etapa de regulação durante sua biogênese (MELO e ESTELLER 2011). Existem diversos mecanismos moleculares envolvidos na regulação da expressão dos genes codificadores de miRNAs. Esses genes podem estar mapeados em regiões envolvidas com amplificação e deleção, como também em pontos de quebra associados com outras alterações estruturais como translocação. Alteração nos fatores de transcrição dos genes de miRNAs também podem afetar seus níveis de expressão, assim como defeitos na maquinaria de biogênese dessas moléculas (PENG e CROCE 2016). Além disso, de modo semelhante aos genes que codificam proteínas, os miRNAs são transcritos por genes e podem ser alvos de eventos epigenéticos que modulam sua expressão (WANG et al. 2017) (Figura 1).

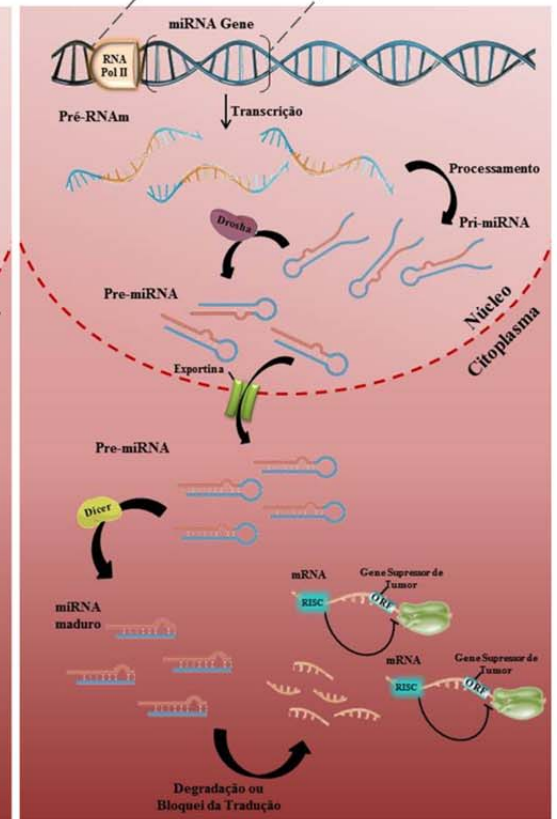
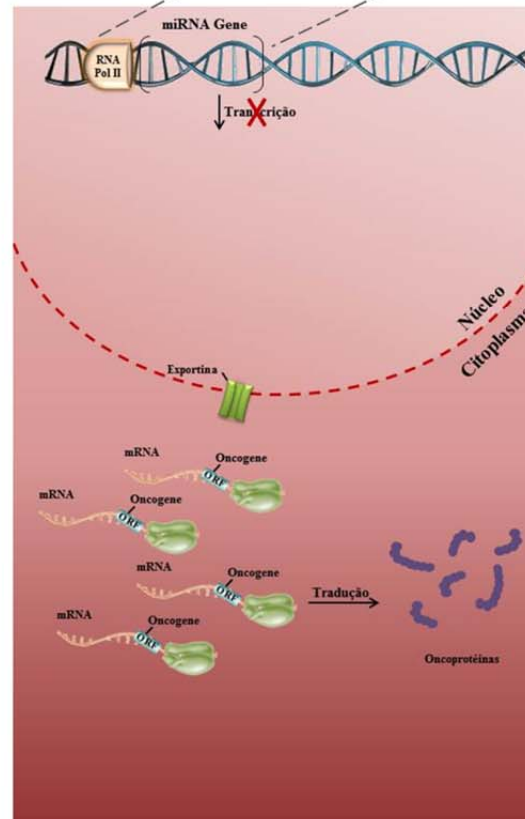
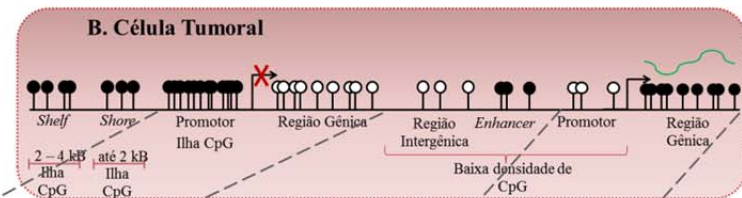
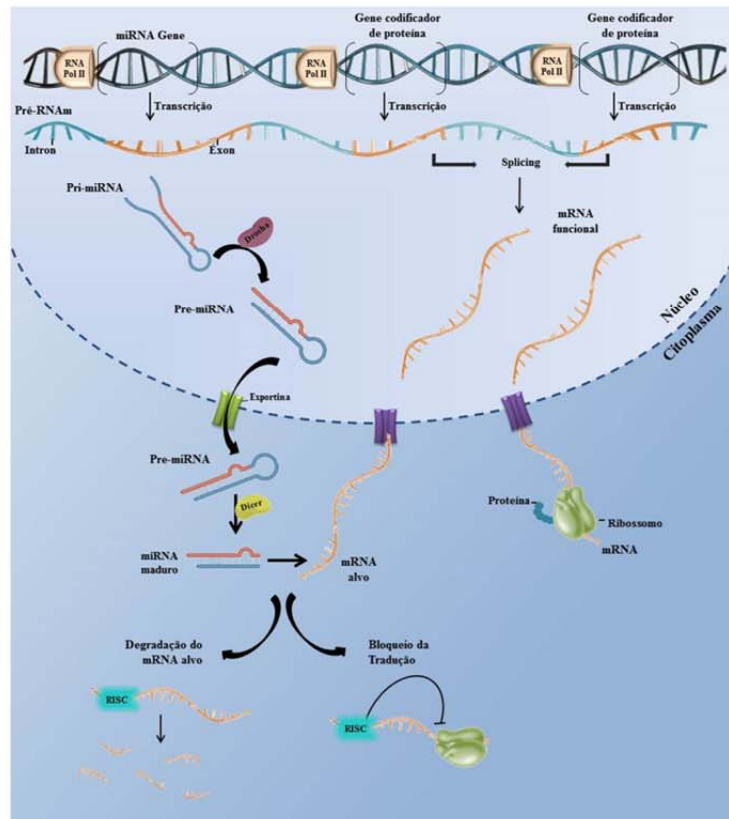
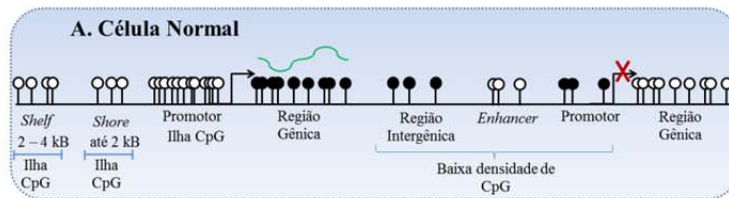


Figura 1 - Processo de metilação do DNA em regiões de genes codificadores de miRNAs. **A.** Processo de metilação em células normais, nas quais é comum encontrar ilhas CpG não metiladas em regiões promotoras possibilitando a transcrição dos genes. Após a transcrição há a formação de uma estrutura denominada pri-miRNA. Ainda no núcleo, os pri-miRNAs são processados por um complexo que inclui uma endonuclease (Drosha) e uma proteína de ligação de RNA. A estrutura resultante, designada miRNA precursor (pre-miRNA), é exportada para o citoplasma por meio da exportina. No citoplasma, os pre-miRNAs são processados pela Dicer que cliva a alça na estrutura *stem-loop*, formando uma dupla fita do miRNA. O miRNA maduro é incorporado a um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), no qual ocorre a separação das duas fitas. Uma destas fitas permanece associada ao RISC e se liga por complementariedade à região 3' UTR do mRNA alvo levando à inibição da sua tradução, ao passo que a fita complementar é degradada. **B.** Processo de metilação em células tumorais. À esquerda, ocorre a hipermetilação em genes codificadores de miRNAs que regulam oncogenes levando ao silenciamento da transcrição e biogênese desses miRNAs. Consequentemente os protooncogenes perdem o mecanismo de sua regulação (oncogenes ativos), são traduzidos em oncoproteínas. À direita é observado que a hipometilação dos genes codificadores de miRNAs que atuam regulando genes supressores de tumor podem levar ao aumento da transcrição destes miRNAs. Como resultado, pode ocorrer o bloqueio da tradução ou degradação dos genes supressores de tumor.

A metilação do DNA desempenha um papel importante na regulação da expressão de miRNAs (SUZUKI et al. 2012). O número de miRNAs descritos como regulados por essa modificação tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (LOPEZ-SERRA e ESTELLER 2012; SUZUKI et al. 2016).

Recentemente diversos estudos dão evidências de que genes que contém miRNA podem ser regulados por metilação (tanto o gene como o miRNA) (Revisado por WANG et al. 2017). Por exemplo, genes que tem regiões ricas em CpG e que tem miRNAs mapeados em sua proximidade podem apresentar hiper e hipometilação, e tais modificações podem alterar drasticamente a função normal dos miRNAs. Em adição, genes responsáveis pelas alterações epigenéticas (DNA metiltransferases, por exemplo) também podem ser regulados por miRNAs (WANG et al. 2017).

Em estudos prévios do grupo, foram avaliados perfis de metilação de DNA de CPT pareados com TN adjacentes (50 casos) pela plataforma *Infinium® Human Methylation 450 Bead Chip* (Illumina, San Diego, CA, USA) (DOS REIS 2015; BELTRAMI et al. 2017). Esses dados gerados foram utilizados no presente estudo para a busca de genes codificadores de miRNAs potencialmente regulados por metilação.

No presente estudo foi avaliado o padrão de metilação do DNA e a expressão de miRNAs em CPT e linhagens celulares de câncer de tireoide. Até o momento, apenas um estudo (TCGA) identificou miRNAs regulados epigeneticamente em câncer de tireoide não apresentando análises mais detalhadas. O objetivo deste estudo é explorar o papel da metilação em

genes codificadores de miRNAs e avaliar o efeito das alterações com parâmetros clínicos e patológicos.

2 JUSTIFICATIVA

O CPT é a neoplasia maligna mais frequentemente encontrada na tireoide, sendo o principal responsável pelo aumento da incidência de câncer de tireoide no mundo. A caracterização das alterações epigenéticas e o seu papel funcional no controle da expressão de miRNAs ainda é pouco explorada em CT. Esse conhecimento poderá contribuir para a melhor compreensão da biologia dos carcinomas papilíferos da tireoide. Além disso, poderá levar a descoberta de novas ferramentas diagnósticas, prognósticas e de alvos terapêuticos úteis para o tratamento deste tipo tumoral.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e confirmar o papel da metilação nos genes codificadores de miRNAs detectados previamente em carcinomas papilíferos de tireoide por meio da análise de metilação global e integração com dados de expressão global de miRNAs.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar genes codificadores de miRNAs com alterações no padrão de metilação de DNA em amostras de CPT comparadas ao TN;
- Utilizar os dados depositados no TCGA para confirmar os resultados de metilação assim como integrar os dados de metilação, expressão de miRNAs e mRNA alvos para selecionar os candidatos para validação;
- Avaliar o padrão de metilação e a expressão diferencial dos genes codificadores de miRNAs e mRNA alvos em amostras independentes dos arrays (CPT e tecidos não neoplásicos);
- Buscar um algoritmo diagnóstico baseado na expressão dos miRNAs diferencialmente metilados em lesões tireoidianas;
- Associar o padrão diferencial de metilação e a expressão de

transcritos com características clínico-patológicas (idade, tamanho e estágio do tumor, presença de metástase linfonodal, invasão vascular);

- Investigar a associação entre a mutação *BRAFV600E* com o padrão alterado de metilação e expressão de miRNAs;
- Comprovar o papel da metilação do DNA na expressão de miRNAs utilizando linhagens de câncer de tireoide (ensaio de desmetilação);

4 MATERIAL E MÉTODOS

O desenho do estudo está resumido no fluxograma abaixo e contém três módulos que estão detalhados nesta seção (Figura 2).

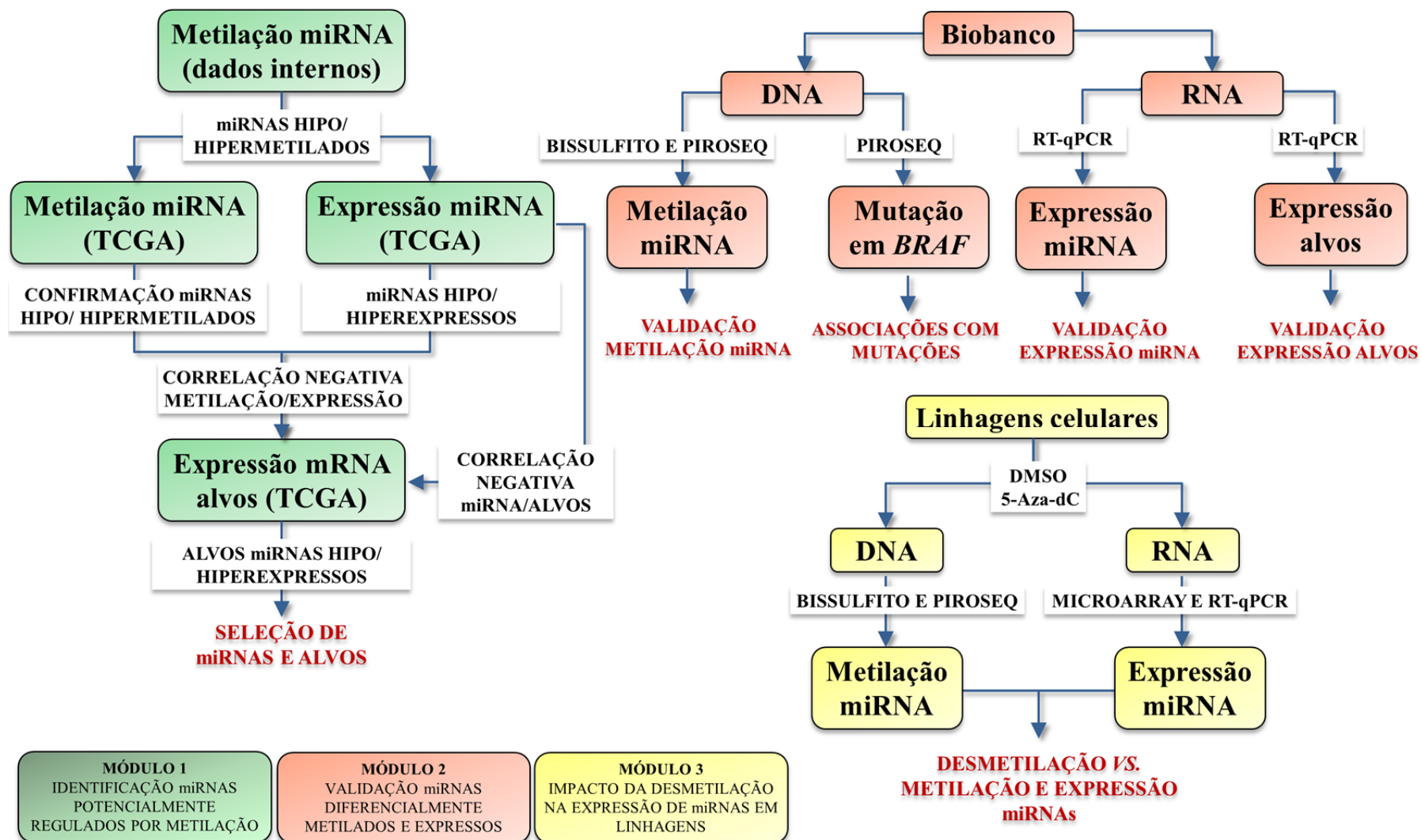


Figura 2 - Fluxograma ilustrando os módulos do estudo. Os dados de metilação global de DNA foram reanalisados (estudos prévios do grupo), buscando identificar miRNAs potencialmente regulados por metilação (Módulo 1). Nessa estratégia, foi utilizado o banco de dados do TCGA para confirmar os resultados e integrar dados de metilação de genes codificadores de miRNAs com a expressão dos mesmos e de RNAm alvos. Em uma segunda etapa, foi incluído um novo grupo de amostras, compreendendo carcinomas papilíferos (CPT), tecidos não neoplásicos (TN) e lesões benignas de tireoide (LBT) (Módulo 2). O objetivo dessa etapa foi confirmar a metilação diferencial de algumas regiões codificadoras de miRNAs (modificação de DNA por bissulfito de sódio seguida de análise por pirosequenciamento) e seu impacto na expressão desses miRNAs e de seus RNAm alvos (RT-qPCR). Neste módulo de validação, também foi realizado ensaios de pirosequenciamento para a detecção de mutação em *BRAF*. Um estudo funcional (Módulo 3) foi realizado utilizando linhagens celulares de câncer de tireoide, com o objetivo de comprovar experimentalmente a metilação como mecanismo principal de modulação dos miRNAs avaliados.

4.1 MÓDULO 1: IDENTIFICAÇÃO DE MIRNAS POTENCIALMENTE REGULADOS POR METILAÇÃO E SEUS RESPECTIVOS ALVOS

4.1.1 Controle de qualidade e análise de sondas diferencialmente metiladas

Os dados de metilação global foram obtidos de 50 amostras de CPT pareadas com TN adjacente utilizando a Plataforma *Infinium® Human Methylation450 BeadChip* (Illumina, San Diego, CA, USA). Os dados foram gerados em estudos prévios do grupo (número de acesso GEO, GSE86961 e GSE97466) e reanalisados neste estudo (DOS REIS 2015; BELTRAMI et al. 2017).

O controle de qualidade dos dados brutos obtidos da leitura dos *arrays* foi realizada utilizando o programa R versão 3.0.2 e o pacote de

análise do Bioconductor *WateRmelon* (SCHALKWYK et al. 2013). A análise inicial incluiu a filtragem de sondas contendo SNPs (*minor allele frequency* > 5%), sondas mapeadas nos cromossomos X e Y, sondas que co-hibridizam em sequências alternativas homólogas (≥ 49 bases) (CHEN et al. 2013), sondas com valores de $p > 0,05$ e contagem de beads < 3 em, no mínimo, 5% das amostras. Em seguida foi realizado o ajuste do viés da cor, a normalização entre as amostras pelo método *quantile* e entre sondas pelo método *BMIQ* (*Beta-Mixture Quantile Normalization*). As possíveis variações nos resultados gerados pela posição das amostras nos *arrays* foram corrigidas com a análise de *batch effects* utilizando o pacote SVA (LEEK et al. 2012).

As sondas diferencialmente metiladas entre os grupos amostrais pareados (CPT versus TN) foram obtidas a partir do pacote *limma* (RITCHIE et al. 2015) adotando valor de P ajustado (Bonferroni) < 0,05 e delta-beta ($\Delta\beta$) < -0,15 ou > +0,15.

4.1.2 Integração dos dados dos miRNAs diferencialmente metilados e expressos (TCGA)

Os dados obtidos resultantes da comparação entre o tecido tumoral e não neoplásico foram confirmados utilizando dados externos. Para isso, os dados normalizados de *microarray* de metilação de amostras de CPT e TN, utilizando a mesma plataforma do presente estudo, foram obtidos do banco de dados público TCGA (*The Cancer Genome Atlas* - <https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>). Os dados de metilação (Plataforma *Infinium® Human*

Methylation450 BeadChip) de 515 amostras de CPT e 56 TN foram obtidos a partir da opção "*Thyroid Carcinoma*" no portal TCGA (P ajustado $< 1 \times 10^{-7}$, $|\Delta\beta| > 0,1$).

Os dados de expressão de miRNAs analisados pela Plataforma *Illumina HiSeq 2000 RNA Sequencing Version 2* foram obtidos do TCGA sendo composto por 510 amostras de CPT e 59 TN (P ajustado $< 1 \times 10^{-7}$; *Fold change* [FC] > 2). Os dados externos (banco de dados do TCGA) foram integrados utilizando as sondas diferencialmente metiladas e os miRNAs diferencialmente expressos com valores significativos pelo teste de correlação de Pearson ($P < 0.05$ corrigido por Bonferroni).

4.1.3 Predição de alvos dos miRNAs

Para a predição de alvos dos miRNAs diferencialmente metilados e expressos foi utilizado o banco de dados *online* miRWalk 2.0 (<http://www.umh.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>). Este software permite a busca de miRNAs preditos como funcionais em 12 bancos de dados independentes. Como critério de inclusão foram utilizadas as interações preditas em ao menos dois de quatro algoritmos selecionados (*miRWalk*, *miRanda*, *RNAhybrid* e *Targetscan*) com correlação de Person negativa significativa ($P < 0.05$ corrigido por Bonferroni) entre o miRNA e o alvo. A expressão diferencial de genes alvos dos miRNAs foi avaliada utilizando os dados de expressão de mRNA de 509 CPT e 59 TN (P ajustado $< 1 \times 10^{-7}$; FC > 2) (Plataforma *Illumina HiSeq 2000 RNA Sequencing Version 2* depositados no TCGA).

4.2 MÓDULO 2: CONFIRMAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MIRNAS DIFERENCIALMENTE METILADOS E MRNAS ALVOS

4.2.1 Casuística e caracterização das amostras

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (CEP nº 2138/15) (Anexo 1) e os pacientes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) autorizando o uso do material biológico para pesquisa. As amostras utilizadas neste estudo foram provenientes de pacientes submetidos a tratamento no A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, SP.

A confirmação dos dados (RT-qPCR para análise de expressão dos miRNAs/transcritos e pirosequenciamento para análise de metilação) foi realizada em 103 amostras de CPT, 40 amostras de tecidos normais, 32 amostras de LBT (composto por 14 adenomas, 17 bóciós e 1 tireoidite). Estes casos são independentes da análise de metilação global.

Foram excluídos casos em que as informações clínico-patológicas eram incompletas e pacientes com histórico de neoplasias malignas prévias (com exceção de carcinoma basocelular de pele).

A Tabela 1 apresenta a caracterização dos pacientes com CPT incluídos nesse estudo. A maioria dos pacientes era do sexo feminino (78%) e com idade inferior a 55 anos (81%). A maioria dos tumores apresentou tamanho superior a 1 cm (70%), ausência de multicentricidade (60%) e predominância da variante clássica (72%). Em 12% dos casos foi observado invasão vascular e 34% apresentaram extensão extratireoidiana.

A maioria dos pacientes evoluiu de forma favorável (90,6%) e apenas 2% apresentaram metástases a distância, 36% metástases linfonodais e 9,4% tiveram recidivas.

Tabela 1 - Características clínico-patológicas dos pacientes incluídos no estudo.

Características pacientes	No. Pacientes (%)
Idade; mediana (intervalo interquartil)	42 (31.8-48.3)
<55 anos	83 (80.6)
≥55 anos	20 (19.4)
Gênero	
Feminino	80 (77.7)
Masculino	23 (22.3)
Tamanho; mediana (intervalo interquartil)	1.5 (1-2)
≤1cm	31 (30.1)
>1cm	72 (69.9)
Multicentricidade	
Não	62 (60.2)
Sim	41 (39.8)
Variante predominante	
Clássica	74 (71.8)
Folicular	22 (21.4)
Outra*	7 (6.8)
Invasão vascular	
Não	89 (88.1)
Sim	12 (11.9)
Ni	2
Extensão extratireoidiana	
Não	68 (66)
Sim	35 (34)
Metástase linfonodal	
Não (cN0, pN0)	66 (64.1)
Sim (pN1)	37 (35.9)
Metástase à distância	
Não	101 (98.1)
Sim	2 (1.9)
Evolução clínica	
Favorável (livre de doença)	77 (90.6)
Recidiva	8 (9.4)
Ni [#]	18
Morte	
Não	101 (98.1)
Sim	2 (2)

Legenda: No: número. Ni: não informado. *sete variantes foram agrupadas como outros: 1 de células altas, 3 esclerosantes, 1 oncocítica e 2 sólidas. cN0: linfonodo clinicamente negativo. pN0: linfonodo patologicamente negativo. pN1: linfonodo patologicamente positivo. #pacientes com elevação de tireoglobulina sérica sem evidência de doença por exames de imagem ou confirmação patológica durante o seguimento ou sem evidência de recidiva com seguimento inferior a cinco anos.

4.2.2 Extração de ácidos nucleicos

A extração do DNA genômico das amostras tumorais e normais foi baseada em protocolos convencionais incluindo a degradação enzimática com proteinase K, seguida da purificação com solventes orgânicos (fenol/clorofórmio) e tratamento com RNase (*Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA*). As amostras de DNA obtidas foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

A extração do RNA das amostras foi baseada no método TRIZOL[™] (Invitrogen, Life Technologies, CA, EUA) (1 mL reagente/50-100mg de tecido) e uso do kit Precellys[®] (Bertin Technologies, Orleans, França). A quantificação e a qualidade do RNA foram avaliadas utilizando-se o *NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade)* e *Bioanalyzer (RNA 6000 NanoLabChip kit 2100, Agilent Technologies)*, respectivamente.

As amostras de ácidos nucleicos foram obtidas do banco de macromoléculas do *A.C.Camargo Cancer Center, SP*.

4.2.3 Modificação de DNA por bissulfito de sódio

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. O protocolo é baseado no tratamento do DNA com bissulfito de sódio, o qual promove a conversão das citosinas não metiladas em uracilas por um processo de deaminação, não afetando as citosinas

metiladas que ficam protegidas da ação do sal pelo radical metil associado ao carbono 5 da base nitrogenada.

A primeira etapa consiste na modificação do DNA usando 130 μL da solução *CT Conversion* em 20 μL de DNA (500ng), resultando num volume total de 150 μL de reação. A conversão foi realizada pela incubação das amostras no termociclador (Veriti, *Applied Biosystems*, California, EUA) nas seguintes condições: 16 ciclos a 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 600 μL do tampão *M-Binding*. Posteriormente, foram acrescentados 100 μL do tampão *M-Wash*, 200 μL do tampão *M-Desulphonation* sendo repetidas mais duas etapas de lavagem com 200 μL do tampão *M-Wash*. Ao final do processo, o DNA convertido foi eluído em 20 μL do tampão *M-Elution*. Após o tratamento do DNA com bissulfito de sódio, foi realizada a padronização dos iniciadores selecionados e a seguir, foram realizadas as amplificações pela PCR.

4.2.4 Análise do padrão de metilação dos genes de miRNAs 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 ação enzimática e liberação de pirofosfato, com a detecção de um sinal quimioluminescente quando o nucleotídeo está ligado ao seu molde. Este procedimento é qualitativo e quantitativo fornecendo, com precisão, a quantidade de metilação de dinucleotídeos CpGs específicos de

maneira rápida e eficaz. Este método também possibilita a avaliação da qualidade da conversão por bissulfito de sódio por meio de nucleotídeos controles inseridos na ordem de dispensação durante o sequenciamento.

Após o tratamento do DNA com bissulfito de sódio, a região de interesse foi amplificada pela PCR com iniciadores marcados com o fluoróforo biotina na extremidade 5' (Sigma, Darmstadt, Germany). Nessa etapa, foram selecionadas duas regiões correspondentes às sondas que apresentaram maior correlação com expressão dos miRNAs, identificadas pela análise integrada usando dados do TCGA (metilação de DNA e expressão de miRNA) (Figura 3). Os iniciadores foram desenhados para avaliar dois genes codificadores de miRNAs (*MIR146B* e *MIR21*), seguindo os critérios: (i) iniciadores com tamanho entre 18 e 24 pares de bases, (ii) sem 3 guaninas (G) ou citosinas (C) na extremidade 5', (iii) mesma quantidade de C e G nos iniciadores direto e reverso (iv) presença de pelo menos 50% do conteúdo C e G, (v) *amplicon* menor que 300 pares de bases e (vi) temperatura de *melting* entre 55-62°C (Quadro 2).

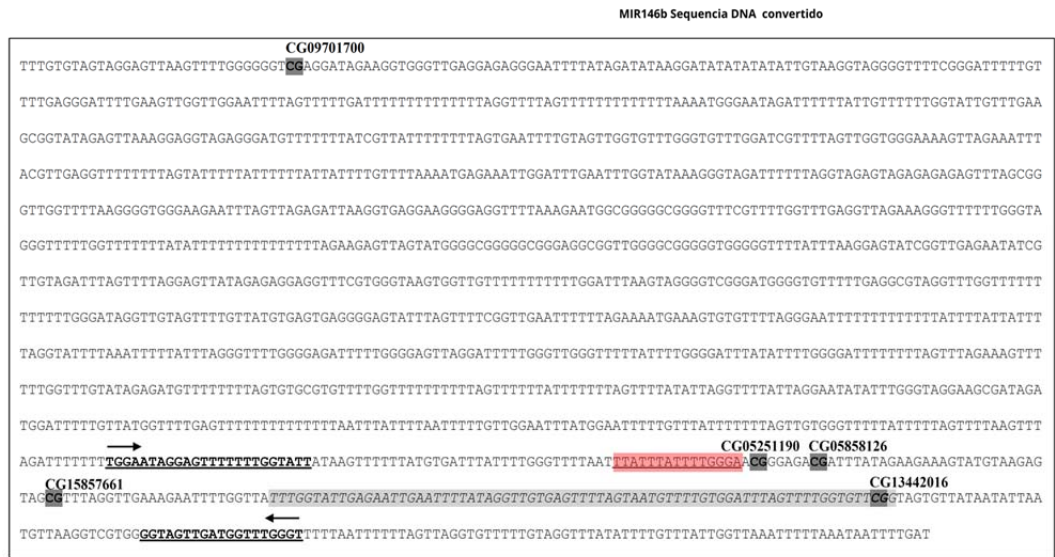
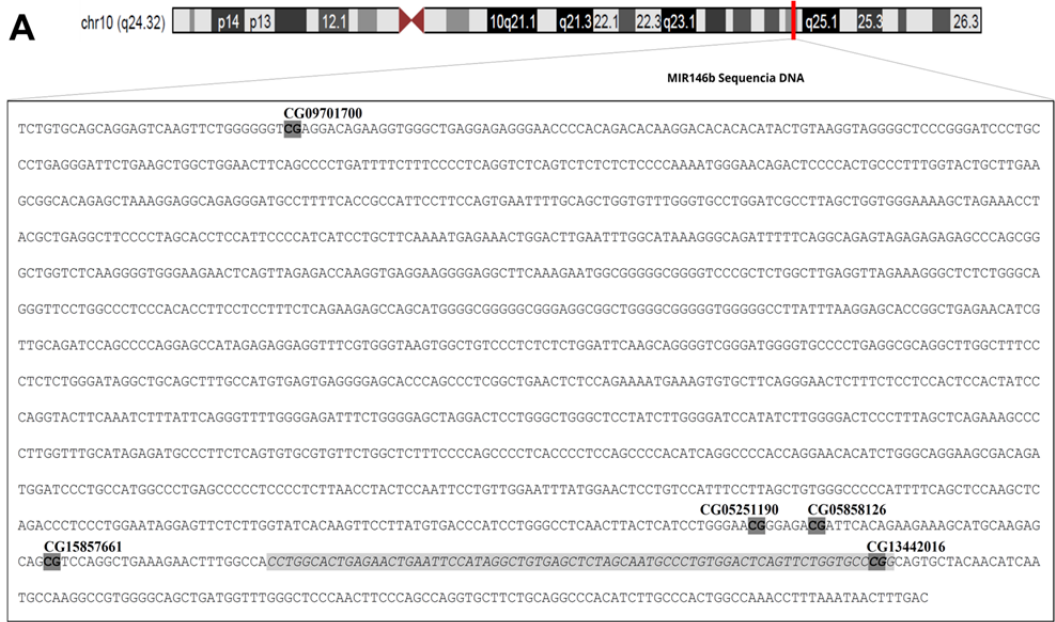


Figura 3 - Dados do mapeamento das regiões alvo do ensaio de pirosequenciamento para os genes *MIR21* e *MIR146B*. Estão indicadas as sequências de DNA e o mapeamento das sondas contendo CpG diferencialmente metiladas (cinza escuro) (abaixo do cromossomo) assim como sequência de DNA após conversão por bissulfito de sódio (parte inferior). Essas sequências foram utilizadas para o desenho dos iniciadores (*Forward* e *Reverse*) representados em negrito/sublinhado. Os iniciadores desenhados amplificam um fragmento de 253 pares de bases contendo 4 dos 5 CpGs diferencialmente metiladas para o *MIR146B* (A) e um fragmento de 233 pares de bases contendo 4 CpGs diferencialmente metiladas para o *MIR21* (B). Os iniciadores do sequenciamento estão representados pelas sequências sublinhadas. As sondas validadas para o *MIR146* (A) foram: cg05251190, cg05858126 e cg15857661 localizadas em sítios de início de transcrição (TSS200), enquanto que para o *MIR21* (B) foram: cg02515217 (TSS200) e cg15759721 (mapeada em corpo de gene) (maior correlação com a expressão dos miRNAs). A sequência de DNA referente aos pré-miR-21 e -146b (sequências stem-loop precursoras) estão marcadas em cinza claro. Fontes: *Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway, assembly: Dec. 2013 (GRCh19/hg19)* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) e *miRBase* (<http://www.mirbase.org/index.shtm>). Acesso em agosto de 2017.

Quadro 2 - Características dos iniciadores utilizados na PCR e pirosequenciamento dos genes codificadores de miRNAs (*MIR146B* e *MIR21*).

Gene	Sequência	pb	CpG	TM	TA
<i>MIR21</i>	F: 5' TGTTAGAATAGAATAGAATTGGGG 3'	233	2	60,7°C	55°C
	R: 5' [Btn] TACCAAAATATCAACAACCCATC 3'				
	Seq1 - 5' TGTTTTGTTTATTAT 3'				
	Py 5' CG TGATATTTTATGGTTGTATTATTTTGT CG GG 3'				
<i>MIR146B</i>	F: 5' TGGAATAGGAGTTTTTTTGGTATT 3'	253	3	59,7°C	54°C
	R: 5' [Btn] ACCCAAACCATCAACTACC 3'				
	Seq1 - 5' TTATTTATTTTGGGA 3'				
	Py - 5' AC GGGAGAC CG ATTATAGAAGAAAGTATGTAAGAGTAG CG T3'				

Legenda: F: *Forward*; R: *Reverse*; Btn: Biotina; Seq: Iniciador de sequenciamento; pb: pares de base; CpG: quantidade de sítios CpG avaliados; TM: temperatura de *melting*; TA: temperatura de anelamento; Py: Sequência de referência. Em negrito, CGs indicando os CpGs analisados.

A amplificação pela PCR foi realizada em um volume de 50 µL contendo: 2 µL de DNA (20 ng), Tampão 10x, 15 mM de MgCl₂, 10 µM de cada dinucleotídeo, 10 µM de cada iniciador e 1 U de *HotStartTaq DNA polimerase* (Qiagen, Valencia, CA). A desnaturação inicial a 90 °C ocorreu

por 15 min, seguido por 50 ciclos a 95 °C por 30s, a fase de anelamento (54°C - 55°C) por 30s e a de extensão 72 °C por 45s, seguido de uma extensão final de 72 °C por 10 min. Dois microlitros do produto amplificado das amostras controles foram submetidos a uma corrida em gel de agarose 1% corado com *Gel Red Nucleic Acid Stain* (Biotium, Fremont, CA) para avaliação da qualidade e intensidade da banda.

Posteriormente, foi realizado o preparo da fita simples de DNA para o pirosequenciamento usando o *Vacuum Prep Tool* (Qiagen, Valencia, CA), segundo as instruções do fabricante. Resumidamente, 25µL do produto da PCR foi transferido para uma placa de 24 poços e retido por uma mistura de reação contendo *beads* de sefarose (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) (2µL de *beads streptavidin-coated Sepharose*; 40µL de *Binding Buffer* e água DEPC em um volume final de 80µL. A placa foi agitada a 1500 rpm por 10 minutos e levada ao *Vacuum Prep Tool* para lavagem e purificação dos produtos da PCR. Em seguida foi realizada a lavagem em álcool 70%, seguida por denaturação em uma solução de NaOH 0,2M (*PyroMark Denaturation Solution*, Qiagen, Valencia, CA) e uma nova lavagem em um tampão contendo 10nM de Tris-Acetate (*PyromarkWash Buffer*, Qiagen, Valencia, CA).

Em uma placa especial para pirosequenciamento (*PyroMark Q24 plate*) (Qiagen, Valencia, CA) foi adicionado o produto purificado em uma mistura de reação contendo 100µM do iniciador de sequenciamento (Quadro 1) diluído em tampão de anelamento. Em seguida, a placa foi incubada em termobloco a 80°C por 2min, sendo então mantida à temperatura ambiente

por 5 min para o anelamento dos iniciadores. Os produtos purificados e ligados ao iniciador foram transferidos para o equipamento *PyroMark Q24* (Qiagen, Valencia, CA), onde foi realizado o sequenciamento em tempo real das regiões a serem validadas. Os reagentes utilizados nesse processo foram os recomendados pelo fabricante (*Pyromark Gold Q24*, Qiagen, Valencia, CA). Para garantir a confiabilidade dos dados foram utilizados DNA comerciais metilados e não metilados como controles positivos e negativos (Zymo Research, Irvine, CA, USA), respectivamente (Figura 4).

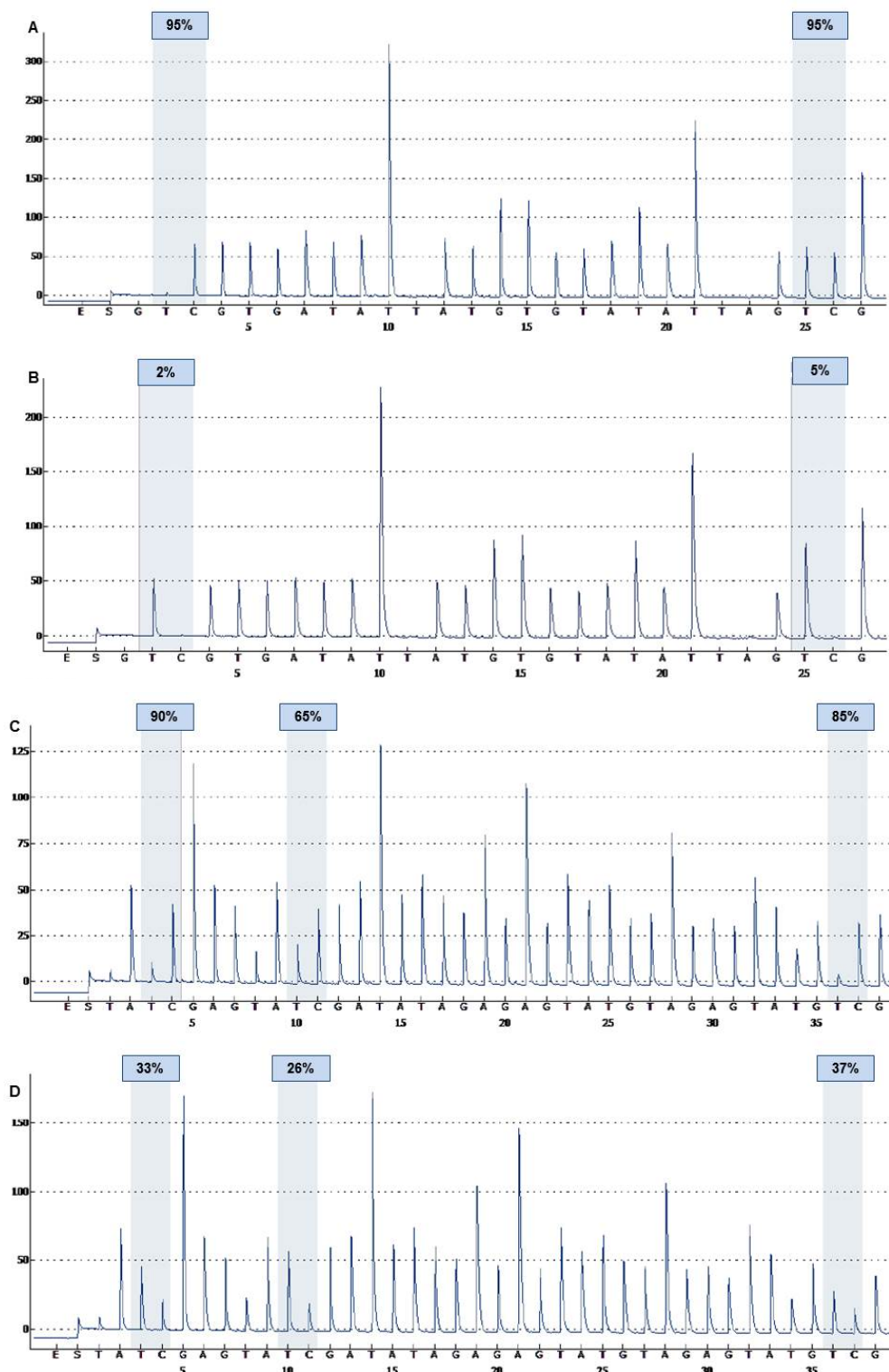


Figura 4 - Pirograma dos controles de metilação para o *MIR21* e *MIR146B*. **A-B.** Pirograma representativo do controle positivo (DNA 100% metilado) e do controle negativo (DNA não metilado) para o *MIR21*. **C-D.** Pirograma representativo do controle positivo e negativo para o *MIR146B*.

4.2.5 Análise da expressão de miRNAs

Para a síntese do cDNA, foi utilizado o *TaqMan® MiRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems CA, EUA). Para análise dos níveis de expressão dos miRNAs selecionados foi utilizado *TaqMan® MiRNA Assays* (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. Os genes *RNU44* e *RNU48* foram selecionados como controles endógenos, pois são comumente utilizados em CPT (SHEU et al. 2010; DETTMER et al. 2013a; DETTMER et al. 2013b).

O RNA total obtido das amostras foi diluído a 2ng/μL para a síntese do cDNA. A mistura de reação para o cDNA consistiu em 100mM de dNTPs, 50U/μL de *MultiScribe Reverse Transcriptase*, 10X *Reverse Transcription Buffer*, 20U/μL de *RNase Inhibitor*, 0,2μM dos *primers RT*, 2,5μL de RNA e água livre de nucleases em um volume final de 7,5μL. As amostras foram incubadas nas seguintes condições: 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e uma fase final de 85°C por 5 minutos. Foram adicionados 30μL de água ultrapura estéril ao cDNA para diluição em 1:5, resultando em um volume final de 37,5μL. As amostras foram armazenadas em -20°C até o uso.

Em seguida, 4μL do cDNA (1:5) dos dois miRNAs foi incorporado a uma mistura de reação contendo 1,4μL de água livre de nucleases, 6μL de *TaqMan® 2x Universal PCR Master Mix* e 0,6μL dos iniciadores (*TaqMan® miRNA Assays*). Todas as reações foram analisadas em duplicata, executadas pelo pipetador automático (*QIAgility System*, Qiagen) e submetidas às seguintes condições de amplificação: 95°C por 10 minutos

seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto no equipamento *7900HT Real Time PCR System (Applied Biosystems)*. Para a normalização dos miRNAs foi utilizado o método proposto por PFAFFL (2001) utilizando a média geométrica dos genes de referência (*RNU44* e *RNU48*) e eficiência igual à 100%.

4.2.6 Análise da expressão de transcritos alvos de miRNAs

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 2µg de RNA em um volume total de 10µL de reação. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. 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 ao RNA purificado 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). Em seguida, as amostras foram incubadas por 5 minutos a 65°C e por dois minutos no gelo. Após esse período de incubação, foi adicionado 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. As amostras foram armazenadas em -20°C até o uso.

Dentre os 348 transcritos alvos de miRNAs (162 para o hsa-miR-146b-5p; 172 para o hsa-miR-146b-3p; 104 para o hsa-miR-21-5p), encontrados na análise integrada (expressão de microRNA e alvos), foram selecionados sete genes (*MPPED2*, *STXBP5L*, *MRO*, *FHL1*, *FLRT1*, *DOK6* e *MOB3B*) para validação por RT-qPCR (Quadro 3). Estes alvos foram selecionados de acordo com os valores de correlação negativa entre a expressão dos transcritos e de miRNA, nível de expressão em tecido normal de tireoide (disponíveis em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genes>), maiores valores de *Fold Change* e resultados significativos de associação com fatores clínico-patológicos segundo o banco de dados TCGA e GEO (Anexo 3).

Os iniciadores utilizados para a detecção dos sete genes alvos foram desenhados a partir da sequência de mRNA do gene em questão (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), pelo programa *Primer-Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Essa ferramenta permite que o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores considere alinhamentos, mesmo que parciais, com outras sequências potencialmente amplificáveis pelos iniciadores. Para evitar a amplificação de DNA genômico por possível contaminação, os iniciadores desenhados flanqueavam junções éxon-éxon ou com íntron de mais de 1.000 pares de bases entre os éxons. Para que a reação de amplificação apresentasse alta eficiência, foi considerado um tamanho máximo de 150 pares de bases.

O programa *Oligoanalyzer* (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer>) foi utilizado para verificar possíveis formações de

estruturas secundárias estáveis (*hairpins*) e dímeros de iniciadores (homo e heterodímeros, no caso de estrutura estável com 3' livre), que podem levar a redução da eficiência da reação. Os controles endógenos utilizados foram *EIF2B1* e *PUM1*, previamente selecionados de um estudo prévio (BARROS-FILHO et al. 2015). As sequências dos iniciadores para os genes alvo e referência estão descritas no Quadro 3.

Quadro 3 - Características e curva de eficiência dos iniciadores dos transcritos alvos de miRNAs selecionados para a validação por RT-qPCR.

Gene	Transcrito	Sequência 5'- 3'	Tamanho do Fragmento	Inclinação	Eficiência
MPPED2	NM_001145399.1	F: CTATGGATCGCCTGCTCGC R: CCGCTGTGCATTTCTTTCCC	78 pb	-3.50	1.93
STXBP5L	NM_014980.2	F: CAGCCCAGCTTCCTTCTTCA R: CCGTGTCTTCACATTGAGGC	104 pb	-3.19	2.06
MRO	NM_031939.3	F: GGCATGAGGGAAGAAGGAGG R: GCCCTGAATTCCTTTGCTTCC	86 pb	-3.38	1.98
FHL1	NM_001159702.2	F: CCACGCAGCACCTTGGAA R: CGCTGGATGTGTGGCAGATA	77 pb	-3.50	1.93
FLRT1	NM_013280.4	F: CTGAGGTCTGCGTCCCTAGT R: CCTGGAGCCTGAATACCTCC	188 pb	-3.50	1.93
DOK6	NM_152721.5	F: ACTGGCATCACATCACTCGT R: GAACCAAACCCATGACCTTGC	70 pb	-3.48	1.94
MOB3B	NM_024761.4	F: AGAGTCCCTTGCGTGGATTG R: CTCATGTTCTTTCCGTGGGG	141 pb	-3.20	2.05
PUM1	NM_001020658.1	F: CACAGACACCACCTCCTTCC R: CCATTCGTGAGTCCTCCAG	72 pb	-3.51	1.93
EIF2B1	NM_001414.3	F: ACCTGTCTTCATCCTCCCCT R: GCTGCTTTTCGCCTGCATC	71 pb	-3.44	1.95

Legenda: F: Forward; R: Reverse; pb: pares de bases; TA: temperatura de anelamento.

A expressão de transcritos foi investigada por RT-qPCR pelo sistema de detecção *SYBR® Green PCR Master Mix*. Para a amplificação do produto foi utilizado 20ng de cDNA, 1x de *Sybr Green Master Mix* (Applied Biosystems), 200 µM de cada iniciador (*foward/ reverse*) para um volume

final de 12,5µL. Todas as reações foram processadas utilizando o pipetador automático (*QIAgility System*, Qiagen) em duplicatas e submetidas às seguintes condições: 95°C por 10 minutos; 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto no sistema PCR 7900 Real Time PCR (*Applied Biosystems*, California, EUA).

Inicialmente, a eficiência da reação de amplificação foi determinada para cada par de iniciadores, por meio de uma curva de diluição de cDNA de um pool de amostras (9 CPT, 8 BTL e 8 TN) em concentrações seriadas (60 ng, 15 ng, 3,8 ng, 0,9 ng e 0,2 ng). Os valores de C_q (ciclo de quantificação) para cada diluição de cDNA e as concentrações respectivas de RNA (log₁₀) foram utilizados para a obtenção da curva-padrão. As curvas de dissociação apresentaram picos bastante definidos (demonstrando especificidade do produto amplificado) e a eficiência de amplificação apresentou uma variação de apenas 10% do ideal (100% igual a uma duplicação a cada ciclo) (Quadro 3).

Para a normalização dos genes alvos também foi utilizado o método proposto por PFAFFL (2001) utilizando a média geométrica dos genes de referência (*EIF2B1* e *PUM1*) e padronizando eficiência de amplificação igual a 100% (eficiência=2) para todos os pares de iniciadores utilizados.

4.2.7 Análise da mutação em *BRAF*

Um total de 102 das 103 amostras de CPT foi avaliado por pirosequenciamento para a detecção da mutação em *BRAF* (códon 600), utilizando o equipamento *PyroMark Q24* (Qiagen, Valencia, EUA). A região

de interesse foi amplificada pela PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando o iniciador biotinilado ADS871 (FBP e RP) (Epigendx, Worcester MA, Inglaterra).

Para a reação de pirosequenciamento foram utilizados 20ng de DNA de cada amostra, incluindo um controle positivo para mutação em *BRAF* (linhagem celular de câncer de cólon WiDr), um controle negativo para a mutação (controle de DNA humano não metilado Epitech, Qiagen) e um controle sem amostra (*No Template Control*). O resultado obtido nos controles negativos e positivos para a mutação *BRAFV600E* foi o esperado: 0% de alelos alterados nos controles negativos e 27,3% para os controles positivos (Figura 5).

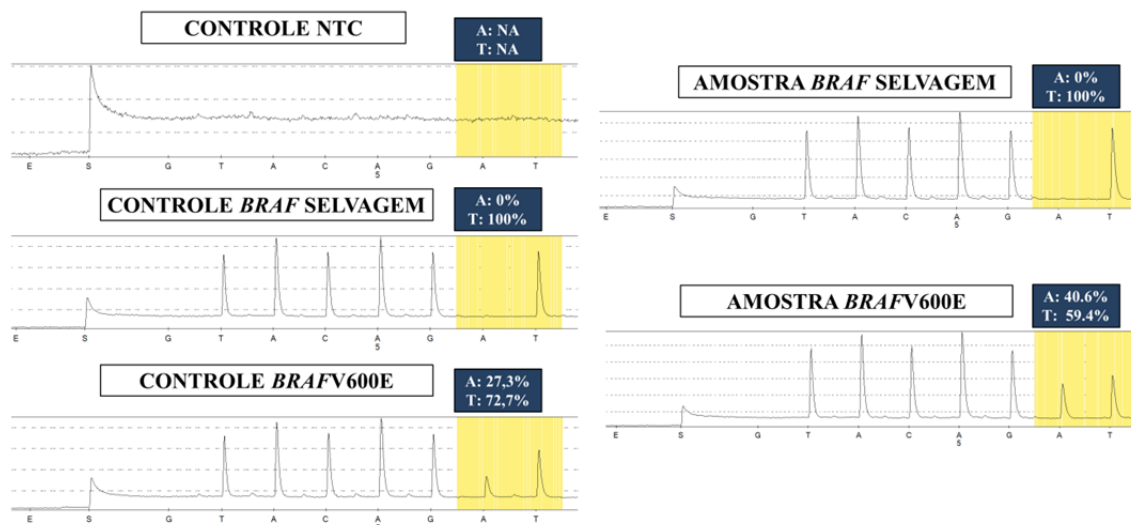


Figura 5 - Pirogramas de controles e amostras após o pirosequenciamento para a detecção de mutação em *BRAF*. O controle NTC (*No Template Control*) não apresenta a incorporação de bases, enquanto é observada a incorporação nos controles e amostras positivas e negativas para a mutação. No controle negativo e amostra negativa para a alteração (Selvagem), não existe a troca de T por A na região destacada em amarelo, enquanto no controle positivo e amostra positiva para alteração é observado um percentual de trocas T por A em (27,3% e 40,6% dos alelos, respectivamente).

Os dados gerados foram avaliados quanto à qualidade, observando a altura dos picos e fluorescência de incorporação e interpretados quanto à presença ou não da mutação (troca da base T por A no códon 600 em *BRAF*). Foram considerados positivos para as mutações os casos com um limiar de 10% de alelos alterados (BARROS-FILHO et al. 2015; BELTRAMI et al. 2017).

4.3 MÓDULO 3: ESTUDOS EM LINHAGENS CELULARES PARA CONFIRMAÇÃO DA REGULAÇÃO DOS GENES *MIR21* E *MIR146B* POR METILAÇÃO

4.3.1 Cultura de linhagens celulares

As linhagens celulares de CPT utilizadas para as análises funcionais foram TPC1 (*BRAF wild type*), BCPAP (*BRAFV600E*) e K1 (*BRAFV600E* – mutação heterozigota) (SAISELET et al. 2012). Estas linhagens celulares foram selecionadas como modelo do estudo, pois são as frequentemente descritas em literatura. A linhagem TPC1 foi cedida gentilmente pela Dra. Janete Maria Cerutti (Universidade Federal de São Paulo) e a BCPAP pela Dra. Edna Tekuro Kimura (Universidade de São Paulo). A linhagem K1 foi obtida comercialmente (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany).

As células foram armazenadas em solução de congelamento contendo 10% de soro bovino fetal (Gibco, Grand Island, NY, EUA) e 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em nitrogênio líquido. No momento do uso, as células foram descongeladas e cultivadas em monocamada. As linhagens celulares foram cultivadas em

frascos apropriados para cultura de células de 25 cm³, em meio de cultura DMEM/F-10 (Gibco, Grand Island, NY, EUA) para BCPAP, RPMI (Gibco, Grand Island, NY, EUA) para TPC1 e DMEM: HAM-F12: MCDB-105 (2:1:1) com 2mM de Glutamina (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) para a linhagem K1 e suplementados com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, EUA) e antibióticos (estreptomicina 1% e penicilina 1%) (Gibco, Auckland, NZ). As células em cultura foram mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após confluência (60-70% do frasco) foi realizado o procedimento de repicagem no qual o meio de cultura foi removido, as células lavadas com 5 mL de PBS 1X e então incubadas a 37°C com 1 mL de solução 0,25% Tripsina/EDTA 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Após o desprendimento total das células, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 5 mL de meio completo.

4.3.2 Teste do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT)

O ensaio de viabilidade celular MTT foi realizado nas linhagens celulares TPC1 e BCPAP de acordo com o protocolo descrito por MOSMANN (1983), com algumas modificações. Neste ensaio foi utilizado o indicador indireto de citotoxicidade de doses de 5-Aza-2'-deoxicitidina (5-Aza-dC; Sigma). As células quando incubadas com o MTT, tem seu substrato quebrado por enzimas, o qual promove a mudança de coloração (composto amarelo converte-se em um composto azul - Formazan). A

viabilidade das células é demonstrada pela produção do Formazan, que reflete o estado funcional da cadeia respiratória.

As duas linhagens foram semeadas em microplacas de 96 poços (aproximadamente 1×10^4 células por poço em 200 μ L de meio completo). Estas foram expostas a concentrações diferentes de 5-Aza-dC (0,1 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M; 2 μ M e 3 μ M) por 24, 48, 72 e 96 horas. Após os tempos de tratamento, o meio foi aspirado e as células foram incubadas com solução de MTT (0,5 mg/mL) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) por 4 horas a 37°C. Ao final deste período, a mistura da reação foi cuidadosamente aspirada e foram acrescentados em cada poço 200 μ L de DMSO. Após 10 minutos foi realizada a análise em espectrofotômetro de leitor de placas a 550 nm. Controles negativos (tratamento com DMSO) e sem células foram conduzidos em condições idênticas e serviram como parâmetro de comparação. Os dados são apresentados como percentual (%) de atividade mitocondrial $\pm$ desvio padrão dos experimentos independentes na mesma placa.

4.3.3 Tratamento com 5-Aza-2'-Deoxicitidina para confirmação da regulação dos genes por metilação

As linhagens celulares TPC1, BCPAP e K1 foram semeadas (1×10^5) em duplicata em frascos de 25 cm^3 . Após 24 horas de crescimento, foi adicionado ao meio de cultura apropriado para cada linhagem (como descrito acima) 1 μ M e 3 μ M de 5-Aza-dC (Sigma) seguido de incubação a 37°C durante 96 horas. Durante este período, o meio de cultura foi trocado

por meio novo contendo a mesma concentração de 5-Aza-dC a cada 24 horas.

O tratamento controle foi realizado com DMSO (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany). Após o período de tratamento, as células passaram por um período de recuperação de 24 horas antes da extração de DNA e RNA, utilizando os *kits ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) e *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA), respectivamente e de acordo com as especificações do fabricante.

O DNA das amostras foi convertido por bissulfito de sódio com o *kit EZ DNA Methylation Gold* (Zymo, Irvine, CA, USA), conforme supracitado.

A metilação basal das três linhagens celulares nas regiões dos genes *MIR21* e *MIR16B*, assim como a análise de metilação e expressão foram avaliadas de acordo com os protocolos acima descritos. A confirmação da desmetilação do DNA após o tratamento com azacitidina foi realizado utilizando os iniciadores para regiões repetitivas *AluYb8* e *AIR1Sat*, conforme descrito por CHOI et al. (2009) (Quadro 4).

Quadro 4 - Características dos iniciadores utilizados na PCR e pirosequenciamento de *AIR1Sat* e *AluYb8*.

Gene	Sequência	pb	CpG	TM	TA
<i>AIR1Sat</i>	F: 5' GATAGAGTAGTTTGAAATATTTGTTT 3' R: 5' [Btn] CTTCTATCTAACATTATATAAAAAATCCC 3' Seq: 5' GTGGATATTTGGATT Py: 5' TTTTGGAGGTTTT CG GTTGGAAAC CG GG 3'	109	2	59°C	54°C
<i>AluYb8</i>	F: 5' AGATTATTTGGTTAATAAG 3' R: 5' [Btn] AACTAC RA ACTACAATAA 3' Seq: 5' GTTTGTAGTTTTAGTTATT Py: 5' CG GGGAGGTTGAGGTAGGAGAATGG CG GTGAAT T CG GGGAAG CG G 3'	178	4	43°C	49°C

Legenda: F: *Forward*; R: *Reverse*; Btn: Biotina; Seq: *Primer* de sequenciamento; pb: pares de base; CpG: quantidade de sítios CpG avaliados; TM: temperatura de melting; TA: temperatura de anelamento; Py: Sequência de referência. Em negrito, CGs indicando os CpGs analisados.

4.3.4 Análise estatística

O programa SPSS (*Statistics Packet for Social Sciences*), versão 21.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) e *BRB Array Tools* v. 4.4.0 (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>) foram utilizados para análises estatísticas.

Os resultados de pirosequenciamento relacionados à metilação do DNA (porcentagem de metilação de cada região avaliada), expressão dos miRNAs e expressão dos mRNAs foram avaliados por testes paramétricos (teste t pareado, teste t não pareado, ANOVA com pós-teste de Tukey e teste de correlação de Pearson). O teste F de Levene foi utilizado para assumir ou não variâncias iguais entre os grupos comparados (teste t não pareado). A hipótese nula foi rejeitada quando o valor de *P* bicaudado foi $\leq 0,05$. Para a construção de algoritmos classificadores diagnósticos foi utilizada a análise discriminante de Fisher (treinamento). As representações

gráficas foram feitas também pelo programa *Graphpad Prism 5.0* (*GraphPad Software Inc.*, La Jolla, CA).

A análise de sobrevida livre de doença foi realizada pelo método de Kaplan-Meier (KAPLAN e MEIER 1958) e teste de log rank (PETO e PETO 1972), categorizando os dados de metilação de DNA (pirosequenciamento após conversão por bissulfito) e expressão gênica (RT-qPCR) abaixo e acima da mediana.

5 RESULTADOS

A Figura 6 resume os principais resultados obtidos neste estudo, utilizando diferentes abordagens por meio de análises de dados globais gerados previamente pelo nosso grupo e dos bancos de dados TCGA.

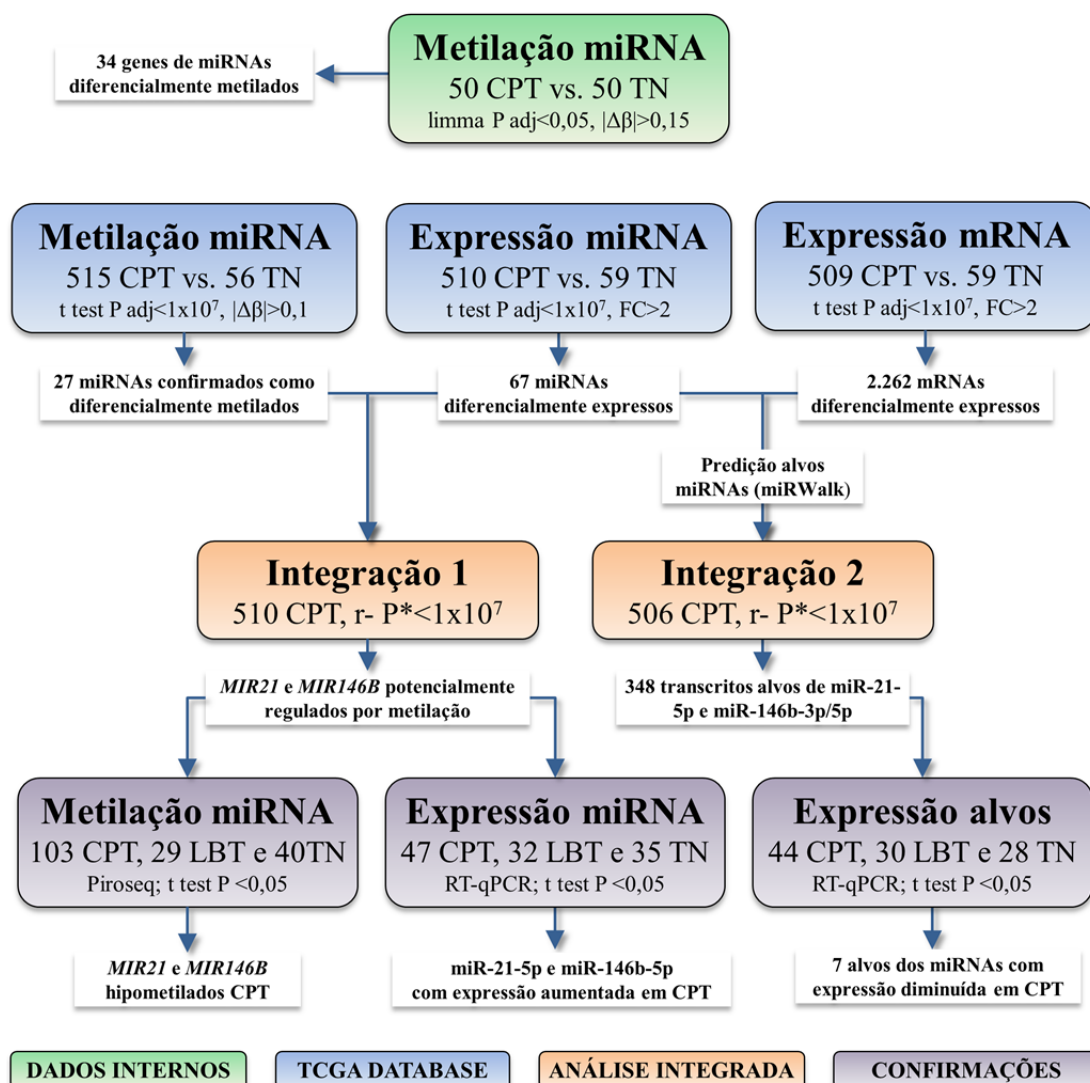


Figura 6 - Fluxograma ilustrando os resultados obtidos usando ferramentas de bioinformática para identificar genes codificadores de miRNA potencialmente regulados por metilação, seus respectivos transcritos alvos e as confirmações dos achados do estudo. Dados prévios do grupo de metilação global foram reavaliados, onde a comparação entre 50 CPT e 50 TN revelou 34 genes codificadores de miRNA diferencialmente metilados (anotação da Illumina 450k). Utilizando o banco de dados do TCGA (plataforma Illumina 450k) para uma validação externa (515 CPT e 56 TN), foi possível confirmar 27 genes codificadores de miRNA diferencialmente metilados. Dados de expressão de miRNAs (510 CPT e 59 TN) provenientes do TCGA (plataforma de sequenciamento de RNA Illumina) também foram utilizados no estudo, onde foram identificados 67 miRNAs diferencialmente expressos. A análise integrada 1 (metilação e expressão dos miRNAs) revelou relações inversas altamente significativas entre a metilação da região promotora do miRNA e expressão dos *MIR21* e *MIR146B* nas amostras de CPT avaliadas. Três miRNAs foram selecionados (hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-146b-3p e hsa-miR-21-5p) como candidatos a serem regulados por metilação. Estes miRNAs apresentaram expressão aumentada e sondas hipometiladas. No presente estudo, a metilação dos miRNAs foi confirmada pela técnica de pirosequenciamento em 103 CPT, 29 LBT e 40 TN, assim como a expressão dos miRNAs por RT-qPCR em 47 CPT, 32 LBT e 35 TN. Foi observada a hipometilação e expressão aumentada dos genes *MIR21* e *MIR146B* em CPT. A expressão diferencial de genes alvos dos miRNAs (509 CPT e 59 TN) foi avaliada utilizando os dados do TCGA (plataforma de sequenciamento de RNA Illumina). Foram identificados 2.262 transcritos como diferencialmente expressos em CPT. A análise integrada 2 (expressão dos miRNA e seus alvos) revelou 348 transcritos alterados preditos como alvos dos três miRNAs (hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-146b-3p e hsa-miR-21-5p) e com correlação negativa entre os resultados da análise de miRNAs e mRNA. A expressão de sete genes alvos foi validada por RT-qPCR em 44 CPT, 30 LBT e 28 TN, a qual foi confirmada como aumentada em CPT. **Legenda:** CPT: Carcinoma papilífero de tireoide; TN: tecido não neoplásico; P adj: valor de P ajustado, $|\Delta\beta|$: módulo de delta beta; FC: *fold change*; r-: correlação negativa; *teste de correlação de Pearson.

5.1 MÓDULO 1: IDENTIFICAÇÃO DE MIRNAS POTENCIALMENTE REGULADOS POR METILAÇÃO E SEUS RESPECTIVOS ALVOS

5.1.1 Dados de metilação global revelam genes de miRNAs potencialmente regulados por metilação

Os dados de metilação global de dois estudos prévios do grupo (DOS REIS 2015; BELTRAMI et al. 2017) foram compilados, totalizando 50 pares de amostras de CPT e TN. A comparação entre o tecido tumoral e normal revelou 50 sondas diferencialmente metiladas (43 hipometiladas e sete hipermetiladas) representando 34 genes de miRNAs (anotação da Illumina 450k) (Tabela 2).

Utilizando o banco de dados do TCGA (plataforma Illumina 450k, <https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>) para validação externa (515 CPT e 56 TN), foi possível confirmar 42 das 50 sondas diferencialmente metiladas (teste t, P corrigido $<1 \times 10^{-7}$), representando 27 genes codificadores de microRNA.

Tabela 2 - Cinquenta sondas correspondendo a regiões diferencialmente metiladas identificadas nos dados de metilação global do nosso grupo (CPT versus TN). Destas, 42 foram confirmadas como alteradas nos dados obtidos do TCGA (oito sondas não foram avaliadas no banco de dados do TCGA – dados externos).

Sonda(ID)	miRNA gene	Distribuição funcional genômica	Conteúdo CpG	Dados internos			Dados TCGA		
				delta β	P	P adj.	delta β	P	FDR
cg03221073	MIR548F1	Body		-0,41	< 1e-07	< 1e-07	-0,34	< 1e-07	< 1e-07
cg19019198	MIRLET7G	TSS200		-0,36	< 1e-07	< 1e-07	-0,49	< 1e-07	< 1e-07
cg15857661	MIR146B	TSS200	Shelf	-0,33	< 1e-07	< 1e-07	-0,34	< 1e-07	< 1e-07
cg05858126	MIR146B	TSS200	Shelf	-0,32	< 1e-07	< 1e-07	-0,33	< 1e-07	< 1e-07
cg05878887	MIR548G	Body		-0,31	< 1e-07	< 1e-07	-0,33	< 1e-07	< 1e-07
cg21175685	MIR548G	Body		-0,31	< 1e-07	< 1e-07	-0,24	< 1e-07	< 1e-07
cg05251190	MIR146B	TSS200	Shelf	-0,30	< 1e-07	< 1e-07	-0,29	< 1e-07	< 1e-07
cg13309012	MIR155HG	Body		-0,30	< 1e-07	< 1e-07	-0,30	< 1e-07	< 1e-07
cg13442016	MIR146B	Body	Shelf	-0,29	< 1e-07	< 1e-07	-0,29	< 1e-07	< 1e-07
cg08096702	MIR211	TSS1500		-0,29	< 1e-07	< 1e-07	-0,34	< 1e-07	< 1e-07
cg02145866	MIR548G	Body		-0,29	< 1e-07	< 1e-07	-0,30	< 1e-07	< 1e-07
cg25874148	MIR548F5	Body		-0,28	< 1e-07	< 1e-07	NA	NA	NA
cg26664528	MIR548H4	Body	Shore	-0,28	< 1e-07	< 1e-07	NA	NA	NA
cg26620021	MIR641	TSS1500	Shore	-0,28	< 1e-07	< 1e-07	NA	NA	NA
cg25591377	MIR1288	TSS1500		-0,27	< 1e-07	< 1e-07	-0,24	< 1e-07	< 1e-07
cg13449535	MIR200B	TSS1500	Shore	-0,25	< 1e-07	< 1e-07	-0,37	< 1e-07	< 1e-07
cg04805065	MIR33B	TSS1500	Shore	-0,25	< 1e-07	< 1e-07	-0,29	< 1e-07	< 1e-07
cg04522625	MIR548A2	Body		0,24	< 1e-07	< 1e-07	0,30	< 1e-07	< 1e-07
cg14144728	MIR200B	TSS1500	Shore	-0,23	< 1e-07	< 1e-07	-0,21	< 1e-07	< 1e-07
cg17670263	MIR520C	TSS1500		-0,21	< 1e-07	1,00E-07	-0,27	< 1e-07	< 1e-07
cg09701700	MIR146B	TSS1500	Shelf	-0,20	< 1e-07	< 1e-07	-0,19	< 1e-07	< 1e-07
cg09186408	MIR33B	TSS1500	Shore	-0,20	< 1e-07	< 1e-07	-0,23	< 1e-07	< 1e-07
cg02558026	MIR762	TSS1500	Shore	-0,20	< 1e-07	< 1e-07	-0,24	< 1e-07	< 1e-07
cg11539052	MIR548N	Body	Shore	-0,20	< 1e-07	< 1e-07	NA	NA	NA
cg01243312	MIR128-1	Body		0,20	< 1e-07	< 1e-07	0,23	< 1e-07	< 1e-07
cg07181702	MIR21	Body		-0,19	< 1e-07	< 1e-07	-0,20	< 1e-07	< 1e-07
cg14910227	MIR495	Body		-0,19	< 1e-07	< 1e-07	-0,27	< 1e-07	< 1e-07
cg10734581	MIR134	TSS1500		-0,19	< 1e-07	< 1e-07	NA	NA	NA
cg18697991	MIR548A2	Body		0,19	< 1e-07	< 1e-07	0,20	< 1e-07	< 1e-07
cg13204193	MIR942	Body		0,19	< 1e-07	< 1e-07	NA	NA	NA
cg04276626	MIR21	TSS200		-0,18	< 1e-07	< 1e-07	-0,16	< 1e-07	< 1e-07
cg10583119	MIR518D	TSS1500		-0,18	< 1e-07	< 1e-07	-0,22	< 1e-07	< 1e-07
cg02515217	MIR21	TSS200		-0,17	< 1e-07	< 1e-07	-0,16	< 1e-07	< 1e-07
cg15759721	MIR21	Body		-0,17	< 1e-07	< 1e-07	-0,14	< 1e-07	< 1e-07
cg11721554	MIR377	TSS1500	Shelf	-0,17	< 1e-07	< 1e-07	-0,20	< 1e-07	< 1e-07
cg20547131	MIR412	TSS1500	Shore	-0,17	< 1e-07	< 1e-07	-0,15	< 1e-07	< 1e-07
cg01719718	MIR548F5	Body		-0,17	< 1e-07	2,00E-07	-0,18	< 1e-07	< 1e-07
cg09031823	MIR575	TSS1500		-0,17	< 1e-07	7,00E-04	-0,25	< 1e-07	< 1e-07
cg11978784	MIR512-1	TSS1500		-0,17	< 1e-07	< 1e-07	NA	NA	NA

Cont/ Tabela 2

Sonda(ID)	miRNA gene	Distribuição funcional genômica	Conteúdo CpG	Dados internos			Dados TCGA		
cg06277638	MIR570	TSS1500		-0,17	< 1e-07	< 1e-07	NA	NA	NA
cg05966699	MIR567	TSS1500		-0,16	< 1e-07	< 1e-07	-0,24	< 1e-07	< 1e-07
cg19619576	MIR33B	TSS1500	Shelf	-0,16	< 1e-07	1,00E-07	-0,21	< 1e-07	< 1e-07
cg21513316	MIR410	Body	Island	-0,16	< 1e-07	< 1e-07	-0,14	< 1e-07	< 1e-07
cg05865548	MIR543	TSS200		-0,16	< 1e-07	< 1e-07	-0,22	< 1e-07	< 1e-07
cg18948646	MIR575	TSS200		-0,16	< 1e-07	< 1e-07	-0,13	< 1e-07	< 1e-07
cg02746110	MIR1301	TSS1500		0,16	< 1e-07	4,00E-07	0,18	< 1e-07	< 1e-07
cg01940297	MIR1207	TSS1500		0,16	< 1e-07	3,00E-06	0,25	< 1e-07	< 1e-07
cg05138957	MIR377	TSS1500	Shelf	-0,15	< 1e-07	< 1e-07	-0,19	< 1e-07	< 1e-07
cg11035122	MIR758	TSS1500		-0,15	< 1e-07	2,00E-06	-0,18	< 1e-07	< 1e-07
cg25037841	MIR1286	TSS1500		0,15	< 1e-07	< 1e-07	0,18	< 1e-07	< 1e-07

Legenda: NA: sondas não avaliadas pelo TCGA; P Adj: valor de P ajustado por Bonferroni; FDR: *false discovery ratio*. TSS: Sítio de início transcrição. *Body*: Corpo de gene. *N_shelf*: De 2 a 4kbde CGI. *N_shore*: Até 2kb de CGI. Em negrito, estão indicados os dois miRNAs selecionados para este estudo: *MIR21* e *MIR146B*.

5.1.2 Identificação de miRNAs diferencialmente expressos e integração com os dados de metilação e de expressão global (TCGA)

Foram utilizados dados de expressão de miRNAs provenientes do TCGA (59 TN e 510 CPT, plataforma de sequenciamento de RNA, Illumina). Esta análise permitiu identificar 67 miRNAs diferencialmente expressos ($P < 1 \times 10^{-7}$, $FC > 2$) (Apêndice 1). Entretanto, apenas os miRNAs hsa-miR-146b (5p e 3p) e hsa-miR-21-5p apresentaram expressão diferencial e alteração do padrão de metilação confirmados por dados externos (todas as sondas mostrando hipometilação e transcritos com aumento de expressão). A análise de correlação de Pearson entre as amostras de CPT avaliadas tanto pela plataforma de metilação como de expressão de miRNAs pelo TCGA (510 casos) revelou relações inversas altamente significativas entre a expressão dos miRNAs e as respectivas regiões diferencialmente metiladas ($P < 1 \times 10^{-7}$).

A expressão do hsa-miR-146b-3p foi associada com as cinco sondas alteradas por metilação previamente identificadas (maior correlação negativa, $r = -0.825$; P Pearson = 9×10^{-128}) assim como hsa-miR-146b-5p (maior correlação negativa, $r = -0.820$; P Pearson = 8×10^{-124}). A expressão de hsa-miR-21-5p foi associada com as quatro sondas alteradas por metilação (maior correlação negativa, $r = -0.625$; P Pearson = 1×10^{-56}) (Tabela 3).

Tabela 3 - Integração entre sondas diferencialmente metiladas e os respectivos miRNAs representados.

ID da sonda	Gene de miRNA	hsa-mir-21-5p		hsa-mir-146b-3p		hsa-mir-146b-5p	
		r	P	r	P	r	P
cg02515217	<i>MIR21</i>	-0.592	1E-49	-	-	-	-
cg04276626	<i>MIR21</i>	-0.518	2E-36	-	-	-	-
cg07181702	<i>MIR21</i>	-0.577	1E-46	-	-	-	-
cg15759721	<i>MIR21</i>	-0.625	1E-56	-	-	-	-
cg05251190	<i>MIR146B</i>	-	-	-0.818	2E-124	-0.816	8E-123
cg05858126	<i>MIR146B</i>	-	-	-0.755	3E-95	-0.750	3E-93
cg09701700	<i>MIR146B</i>	-	-	-0.685	9E-72	-0.690	3E-73
cg13442016	<i>MIR146B</i>	-	-	-0.785	1E-107	-0.777	3E-104
cg15857661	<i>MIR146B</i>	-	-	-0.825	9E-128	-0.819	1E-124

Legenda: r: coeficiente de correlação de Pearson. P: p-valor obtido pelo teste de correlação de Pearson. Em negrito, sondas que apresentaram maior correlação com a expressão dos miRNAs, selecionadas para validação.

A representação gráfica com a localização do *MIR21* (17q23.1) e *MIR146B* (10q23-32) e o mapeamento das sondas diferencialmente metiladas selecionadas para análises detalhadas estão apresentadas nas Figura 6 e 7, respectivamente. As sondas diferencialmente metiladas do *MIR21* e *MIR146B* estão presentes em regiões de elementos regulatórios (observado pelos altos picos das marcas de histonas H3K4Me1, H3K4Me3 e

H3K27Ac) e em sítio de hipersensibilidade à DNase I (Figuras 7 e 8). Estes achados indicam que a cromatina apresenta-se acessível a fatores de transcrição.

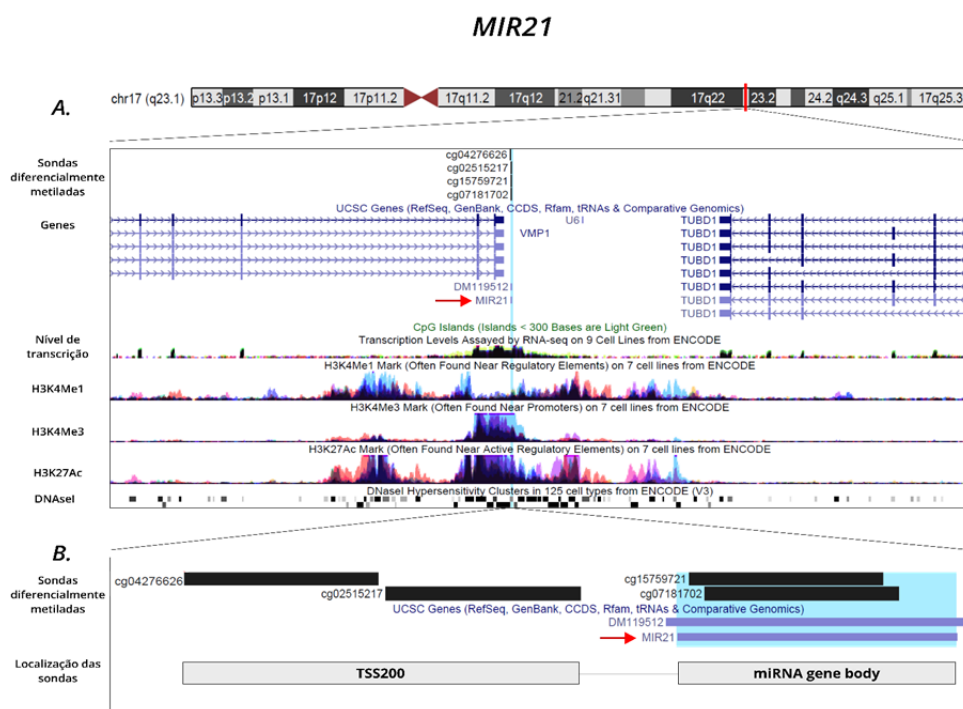


Figura 7 - Representação esquemática do *MIR21* e mapeamento das sondas diferencialmente metiladas. **A.** O *MIR21* está mapeado em 17q23.1 e apresentou quatro sondas diferencialmente metiladas mapeadas em elementos regulatórios. O miRNA está localizado em uma região intergênica, próximo a região 3'UTR do gene *VMP1* (linha azul vertical). As sondas diferencialmente metiladas que estão presentes coincidem com os picos das marcas de histonas H3K4Me1, H3K4Me3 e H3K27Ac e com um sítio de hipersensibilidade a DNase I. **B.** Imagem expandida indicando o *MIR21* e as quatro sondas diferencialmente metiladas. Duas sondas encontram-se mapeadas no corpo do gene de miRNA e duas sondas encontram-se a aproximadamente 200 pares de bases dos sítios de início de transcrição. Imagem gerada pelo <https://genome.ucsc.edu> com modificações. **Legenda:** TSS: *Transcription start site* (Sítio de início de transcrição); TSS200: sonda mapeada a 200 pares de bases do sítio de início de transcrição; TSS1500: sonda mapeada a 1500 pares de bases do sítio de início de transcrição; UTR: *untranslated region* (região não traduzida).

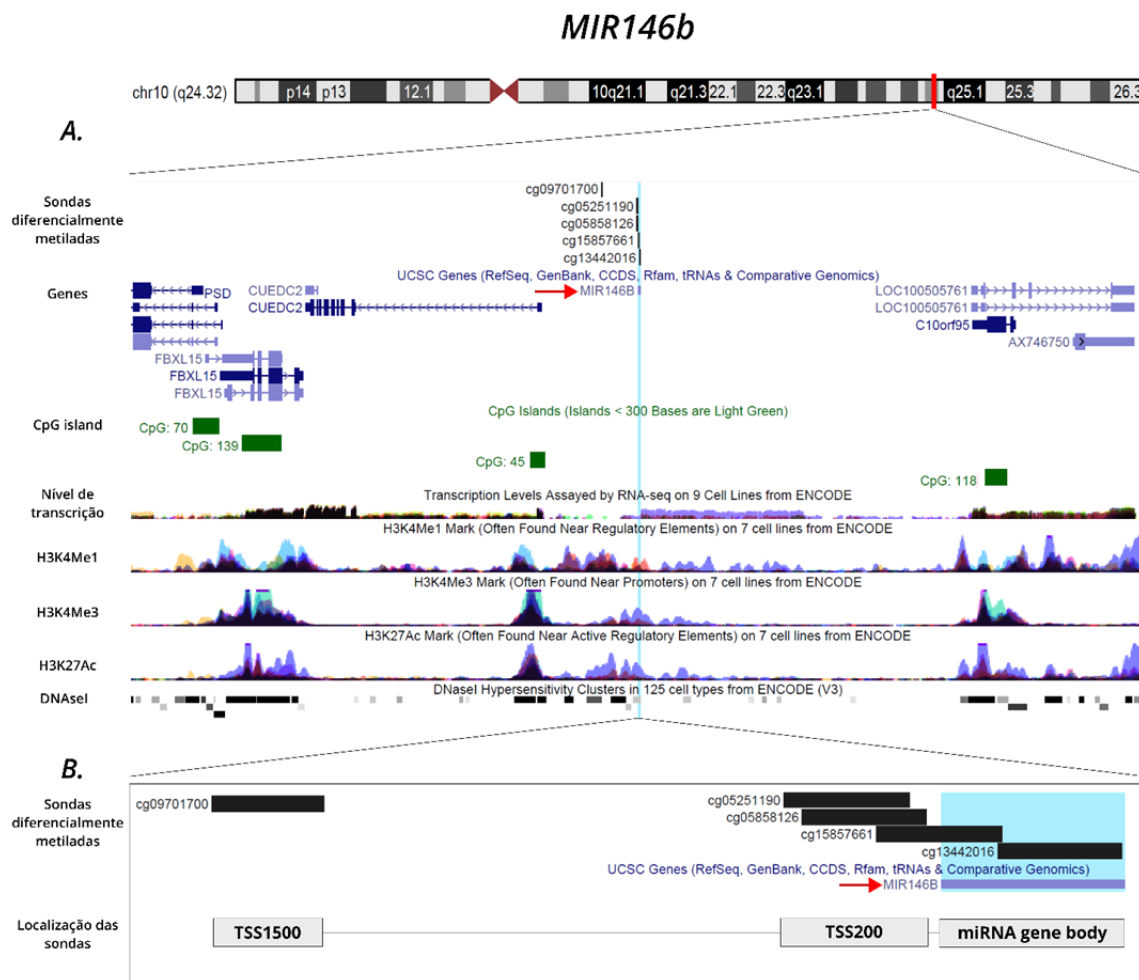


Figura 8 - Representação esquemática do *MIR146B* e mapeamento das sondas diferencialmente metiladas. **A.** O *MIR146B* está mapeado em 10q23-32 e apresentou cinco sondas diferencialmente metiladas. O miRNA está localizado em uma região intergênica (linha azul vertical). As sondas estão mapeadas em regiões de elementos regulatórios (picos das marcas de histonas H3K4Me1, H3K4Me3 e H3K27A) e em um sítio de hipersensibilidade à DNase I (o que indica que a cromatina apresenta-se acessível a fatores de transcrição). **B.** Imagem expandida indicando o *MIR146B* e as cinco sondas diferencialmente metiladas. Duas sondas encontram-se mapeadas no corpo do gene de miRNA, duas sondas encontram-se a aproximadamente 200 pares de bases dos sítios de início de transcrição e uma sonda encontra-se a 1500 pares de bases dos sítios de início de transcrição. **Legenda:** TSS: *Transcription start site* (Sítio de início de transcrição); TSS200: sonda mapeada a 200 pares de bases do sítio de início de transcrição; TSS1500: sonda mapeada a 500 pares de bases do sítio de início de transcrição; UTR: *untranslated region* (região não traduzida).

5.1.3 Predição de alvos de miRNAs e integração entre dados de expressão de miRNAs e mRNAs

A expressão diferencial de genes alvos dos miRNAs foi avaliada utilizando os dados do TCGA. Nessa abordagem, foram identificados 2.262 transcritos (de variadas isoformas) diferencialmente expressos em CPT comparado com TN adjacente (teste t, P corrigido $<1 \times 10^{-7}$, $FC > 2$) (Informações detalhadas no Anexo 2). Desses transcritos, 348 apresentaram correlação negativa ($P < 1 \times 10^{-7}$) e foram preditos como alvos, para no mínimo, um dos três miRNAs potencialmente regulados por metilação (hsa-miR-146b-3p, hsa-miR-146b-5p e hsa-miR-21-5p). Análises *in silico* (*Ingenuity Pathway Analysis*) revelaram que estes genes participam de importantes funções biológicas relacionadas ao transporte de moléculas, apoptose e produção de hormônios, entre outras ($P < 0,05$) (Tabela 4). Estes achados foram também confirmados usando a ferramenta KOBAS (*KEGG Orthology Based Annotation System* - <http://kobas.cbi.pku.edu.cn/home.do>) (Apêndice 2).

Tabela 4 - Dez vias canônicas mais significativas enriquecidas pelos transcritos alvos de hsa-miR-146b-3p, hsa-miR-146b-5p e hsa-miR-21-5p identificadas pelo IPA.

hsa-miR-146b-3p		hsa-miR-146b-5p		hsa-miR-21-5p	
Vias Biológicas	P	Vias Biológicas	P	Vias Biológicas	P
Papel dos osteoblastos, osteoclastos e condrócitos na artrite reumatoide	0,011	Esclerose amiotrófica lateral	<0,001	Indução de apoptose por HIV1	0,003
Esclerose lateral amiotrófica	0,012	<i>HIF1α</i>	0,002	Sinalização mediada pela proteína 14-3-3	0,004
Indução de apoptose pelo HIV1	0,013	Sinalização mediada pela proteína 14-3-3	0,003	Papel da MAPK na patogênese do Influenza	0,005
<i>PCP</i>	0,015	Células pequenas do câncer de pulmão	0,004	Depressão sináptica <i>Long Term</i>	0,005
Carcinoma de célula basal	0,019	Proteína G acoplada com o receptor	0,005	Ceramida	0,010
<i>STAT3</i>	0,021	<i>eNOS</i>	0,009	Sumoilação	0,011
Proteína G acoplada com o receptor	0,022	Oxido nítrico no sistema cardiovascular	0,011	Metabolismo de Xenobioticos	0,012
<i>BMP</i>	0,022	<i>HGF</i>	0,011	Produção de óxido nítrico e espécies de oxigênio reativo em macrófagos	0,014
Metabolismo de Tironamina e Iodotironamina	0,023	Junção das células Sertoli	0,011	Netrina	0,015
Biosíntese do hormônio da tireoide	0,023	Adenocarcinoma Pancreático	0,012	Diabetes Mellitus tipo I	0,016

Legenda: P: teste exato de Fisher. *PCP*: polaridade celular plana. *STAT3*: transdutor de sinal e ativador da transcrição 3. *BMP*: proteínas morfogenéticas dos ossos. *HGF*: fator de crescimento de hepatócitos. *HIF1α*: Fator induzível de hipoxia 1-alfa. *eNOS*: Síntese de óxido nítrico endotelial.

5.2 MÓDULO 2: CONFIRMAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MIRNAS DIFERENCIALMENTE METILADOS E MRNAS ALVOS

5.2.1 Hipometilação em genes codificadores do *MIR21* e *MIR146B* em CPT

A análise de pirosequenciamento confirmou os resultados de metilação diferencial da região promotora dos miRNAs selecionados (Figura 9). Os genes *MIR21* e *MIR146B* apresentaram hipometilação significativa nas amostras CPT comparadas com TN adjacente e LBT. Esse ensaio permitiu a distinção dos três grupos (CPT, TN e LBT), revelando seu potencial como marcadores diagnósticos.

Foi possível observar nessa análise que a região correspondente ao *MIR21* apresentava perda de metilação em nível basal (mediana= 13,6 e intervalo interquartil= 7,5), ao contrário da região correspondente ao *MIR146B* (mediana= 45,4 e intervalo interquartil= 11,6). Não foi possível obter o resultado de metilação para todas as 103 amostras de CPT (DNA insuficiente ou amostras que não passaram nos critérios de qualidade do pirosequenciamento). Foram analisadas 99 CPT, 40 TN e 28 LBT para o *MIR21* e 100 CPT, 40 TN e 27 LBT para o *MIR146B*.

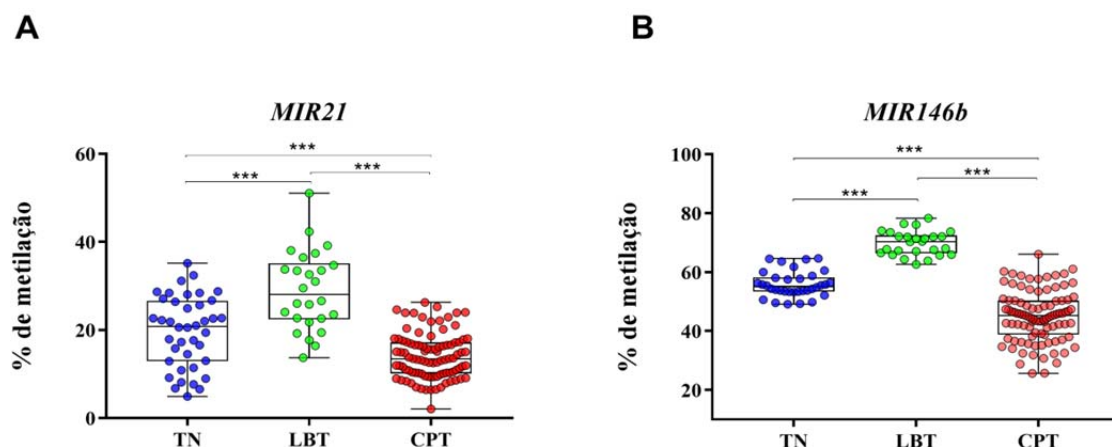


Figura 9 - Confirmação dos achados de metilação aberrante do *MIR21* e *MIR146B* pelo método de pirosequenciamento. **A.** O gene *MIR21* (hsa-miR-21-5p) estava significativamente hipometilado em CPT quando comparado ao tecido normal e benigno. **B.** A hipometilação do gene *MIR146B* (hsa-miR-146b-5p) foi significativa nas amostras tumorais comparadas com o tecido não tumoral e benigno. Os *boxplots* indicam os valores mínimos e máximos dos níveis de metilação após a remoção de valores extremos. **Legenda:** *** $P < 0,001$ (ANOVA e pós-teste de Tukey). TN: tireoide não neoplásica (azul); LBT: lesões benignas da tireoide (verde); CPT: carcinoma papilífero de tireoide (vermelho).

Os mesmos miRNAs selecionados para a confirmação do padrão de metilação foram validados quanto aos níveis de expressão gênica por RT-qPCR.

5.2.2 Aumento da expressão de hsa-mir-21-5p e hsa-mir-146b-5p associado com a hipometilação dos genes desses miRNAs

A análise de resultados de sequenciamento dos miRNAs obtida em 510 CPT do banco de dados TCGA revelou que o hsa-miR-146b-3p apresentou uma alta correlação com a expressão do hsa-miR-146b-5p ($r=0,970$ e P de Pearson não computável). Por essa razão, o hsa-miR-146b-3p não foi selecionado para a análise por RT-qPCR. A seleção do hsa-miR-

146b-5p foi também baseada no fato de ser a isoforma mais prevalente (maior média de *reads per million*; dados do TCGA).

Os níveis de expressão dos dois miRNAs selecionados, hsa-miR-21-5p e hsa-miR-146b-5p apresentaram-se significativamente aumentado nas amostras de CPT em relação ao TN e LBT (Figura 10A). A expressão combinada do hsa-miR-21-5p e hsa-miR-146b-5p pela análise linear discriminante de Fisher, permitiu a distinção de 45/47 CPT dos 66/67 tecidos não-malignos (96% de sensibilidade e 99% de especificidade) (Figura 10B).

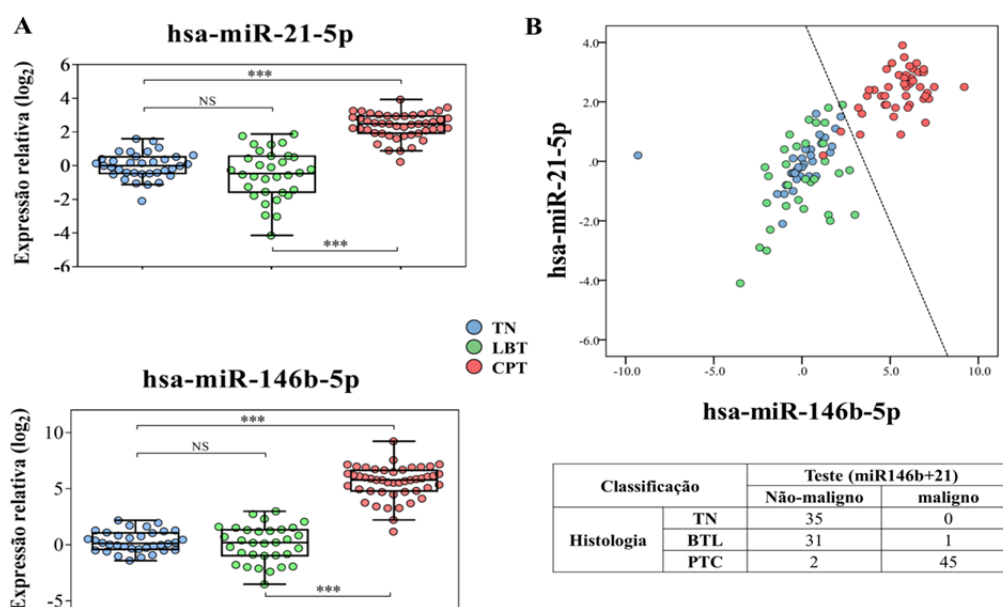


Figura 10 - Confirmação dos achados de expressão dos *MIR21* e *MIR146B* pelo método de RT-qPCR. **A.** Expressão de hsa-miR-21-5p e hsa-miR-146b-5p nas amostras incluídas no estudo (35 TN, 32 LBT e 47 CPT). **B.** Gráfico bidimensional com os valores de expressão relativa de hsa-miR-21-5p e hsa-miR-146b-5p. O classificador (linha tracejada) foi treinado com a análise linear discriminante de Fisher. **Legenda:** TN: tireoide não neoplásica (azul); LBT: lesões benignas da tireoide (verde); CPT: carcinoma papilífero de tireoide (vermelho); NS > 0,05; *** P < 0,001 (ANOVA - pós-teste de Tukey). Não foi possível obter o resultado de expressão dos miRNAs para todos os casos (RNA insuficiente, critérios de qualidade da RT-qPCR, RNA extraído pelo Kit *RNAeasy* pelo Biobanco o qual não permite a análise de expressão de miRNAs).

Na análise pareada por paciente foi observado o aumento da expressão relativa dos genes *MIR21* e *MIR146B* assim como a hipometilação de ambos miRNAs (Figura 11).

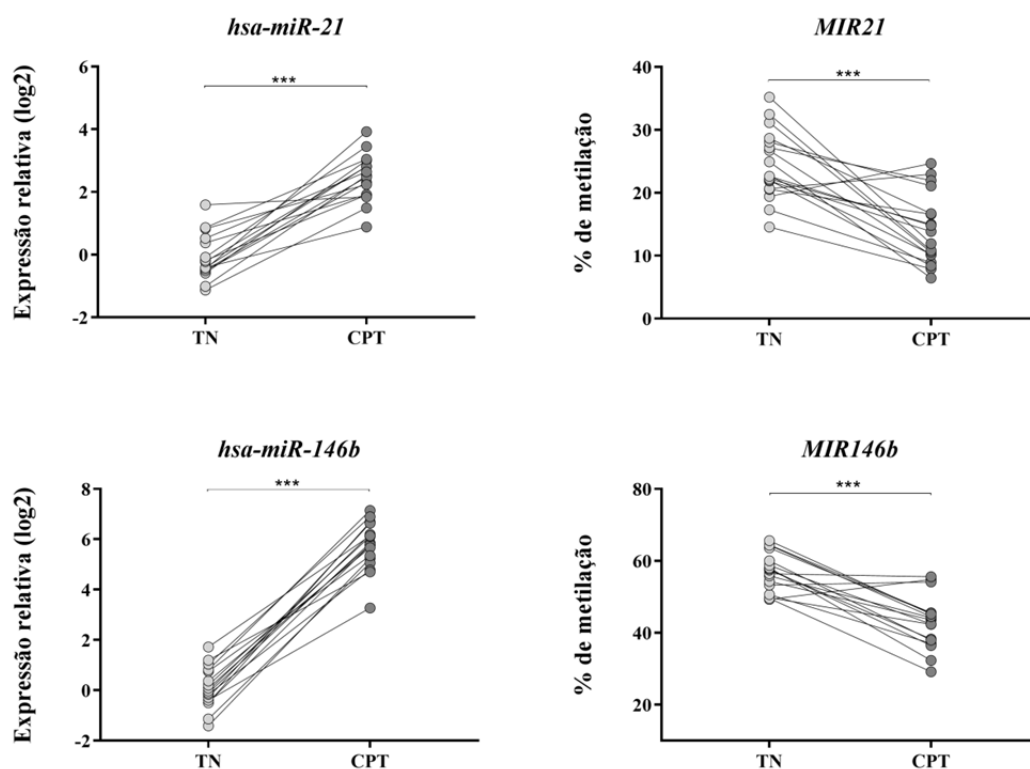


Figura 11 - Análise pareada de expressão e metilação da região correspondente ao *MIR21* e *MIR146B*. A esquerda, expressão relativa do hsa-miR-21-5p e hsa-miR-146b-5p em casos pareados de CPT e TN. Foi possível observar um aumento de expressão significativo em CPT para ambos os miRNAs. A direita, porcentagem de metilação dos genes *MIR21* e *MIR146B* em casos pareados de CPT e TN. É observado hipometilação nos CPT para os genes de miRNAs. **Legenda:** CPT: carcinoma papilífero de tireoide. TN: tecido não neoplásico. *** $P < 0,001$ (teste t pareado).

Foi observada uma correlação negativa entre o padrão de metilação dos genes *MIR21* ($r = -0,393$; $P < 0,001$) e *MIR146B* ($r = -0,649$; $P < 0,001$) e a expressão dos miRNAs em amostras avaliadas pelas técnicas de

pirosequenciamento e RT-qPCR, respectivamente. A combinação dos dados de metilação e expressão dos miRNAs pela análise discriminante de Fisher, permitiu a distinção de 41/45 CPT (91% sensibilidade) dos 55/60 tecidos não neoplásicos (92% especificidade) para o gene *MIR21*, enquanto que para o gene *MIR146B* 45/47 CPT (96% sensibilidade) dos 61/61 TN/LBT (100% especificidade) (Figura 12).

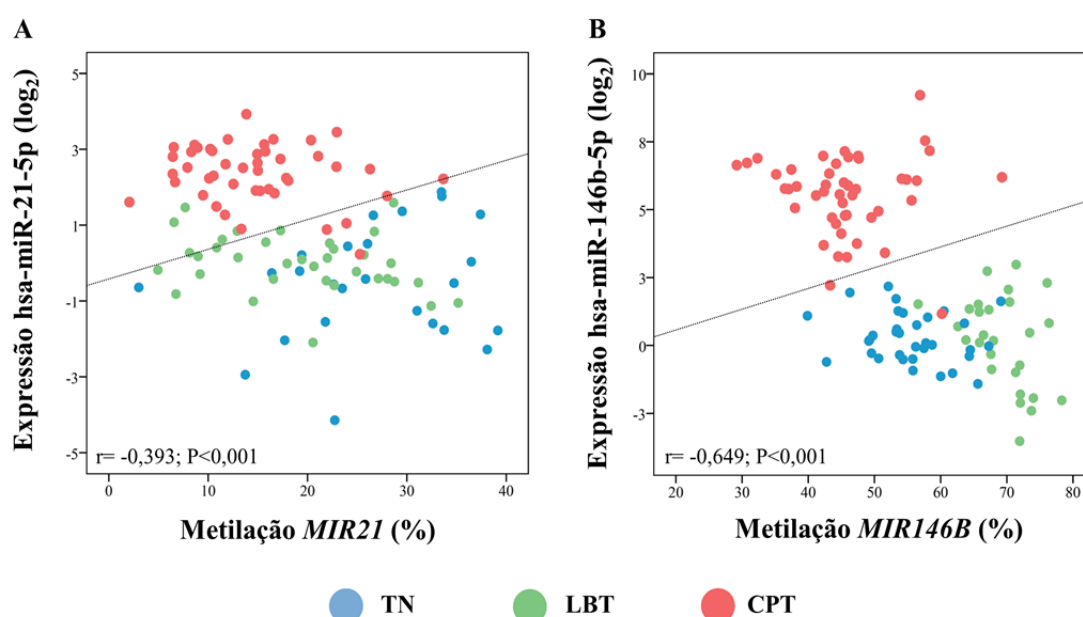


Figura 12 - Correlação inversa entre a metilação dos genes de miRNAs e sua expressão em amostras pareadas. **A.** Correlação inversa significativa ($r = -0,393$; $P < 0,001$) observada entre a porcentagem de metilação com a expressão relativa do gene *MIR21*. **B.** Correlação negativa alta ($r = -0,649$; $P < 0,001$) entre a porcentagem de metilação e expressão relativa do gene *MIR146B*. **Legenda:** r: coeficiente de correlação de Pearson; P: teste de correlação de Pearson. Linha tracejada: classificador treinado com a análise linear discriminante de Fisher. Azul: tireoide não neoplásica; Verde: lesões benignas da tire; Vermelho: carcinoma papilífero de tireoide.

5.2.3 Expressão reduzida de sete transcritos alvos dos miRNAs em CPT

Foi observado que os sete genes alvos (*MPPED2*, *STXBP5L*, *MRO*, *FHL1*, *FLRT1*, *DOK6* e *MOB3B*) selecionados para análise por RT-qPCR apresentaram uma expressão significativamente mais baixa em CPT quando comparado a TN ($p < 0,001$ e $p < 0,05$) e LBT ($p < 0,001$) (Figura 12). Não houve uma diferença significativa entre o valor de expressão de TN e LBT, com exceção dos genes *DOK6* e *FLRT1* ($p < 0,05$).

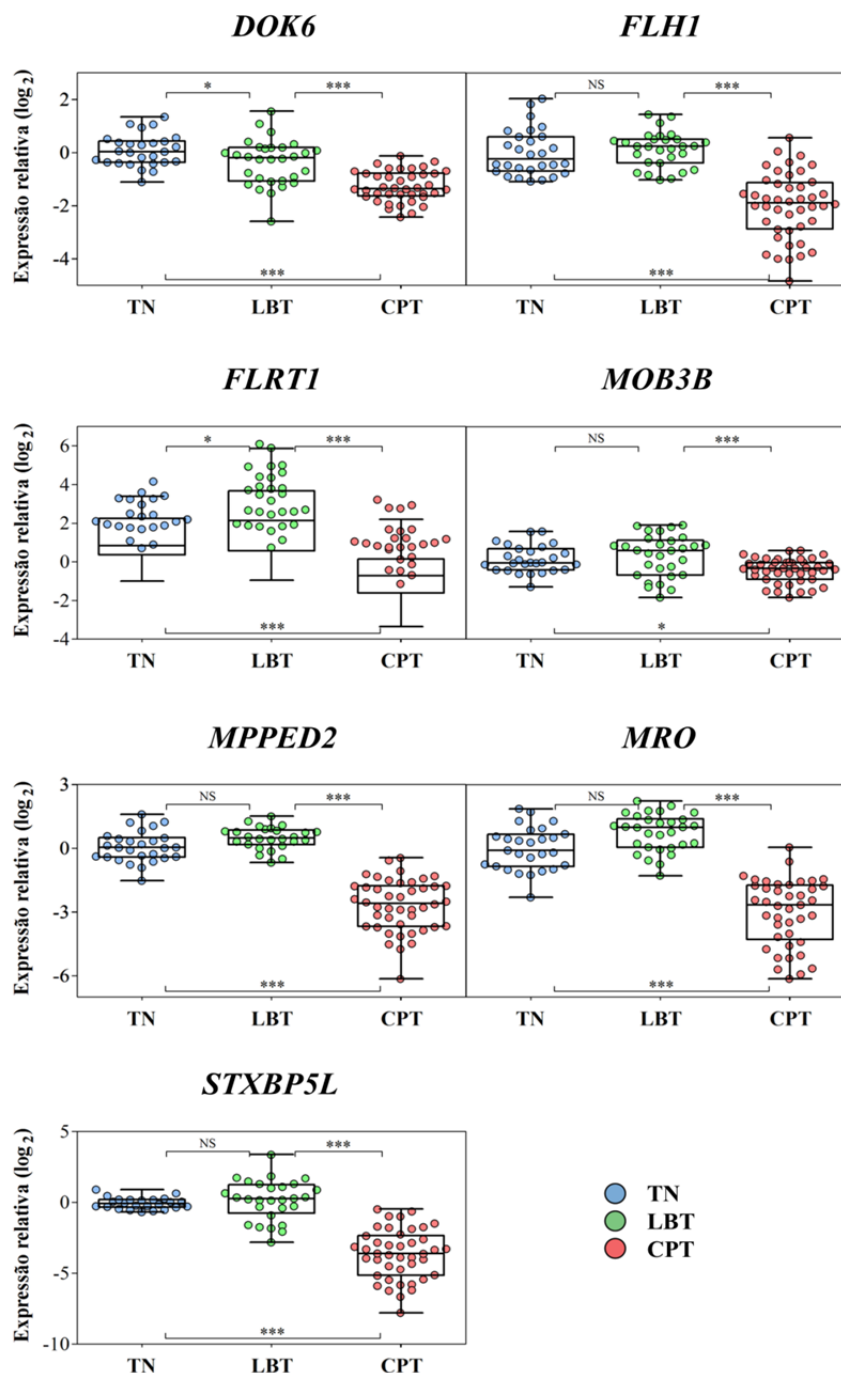


Figura 13 - Níveis de expressão de sete transcritos alvos do hsa-miR-21-5p e hsa-miR-146b-5p em CPT e amostras não neoplásicas por RT-qPCR. Os CPT apresentaram baixa expressão para os sete transcritos em comparação a TN e LBT. Não foi observada diferença significativa entre a expressão de TN e LBT, com exceção dos genes *DOK6* e *FLRT1*. **Legenda:** NS> 0,05; *** P< 0,001; *P< 0,05 (ANOVA - pós-teste de Tukey). Azul: tireoide não neoplásica; Verde: lesões benignas da tireoide; Vermelho: carcinoma papilífero de tireoide.

A expressão dos transcritos foi correlacionada com a expressão dos miRNAs (avaliados na mesma casuística) e comparados com dados clínico-patológicos. Os setes alvos possuem predição de interação com o hsa-miR-146b-5p, enquanto três (*DOK6*, *MPPED2* e *STXBP5L*) apresentam predição com o hsa-miR-21-5p. Nessa análise, foi confirmada uma correlação inversa significativa ($P < 0,001$) em todas as interações preditas entre transcritos e seus respectivos miRNAs (Figura 14).

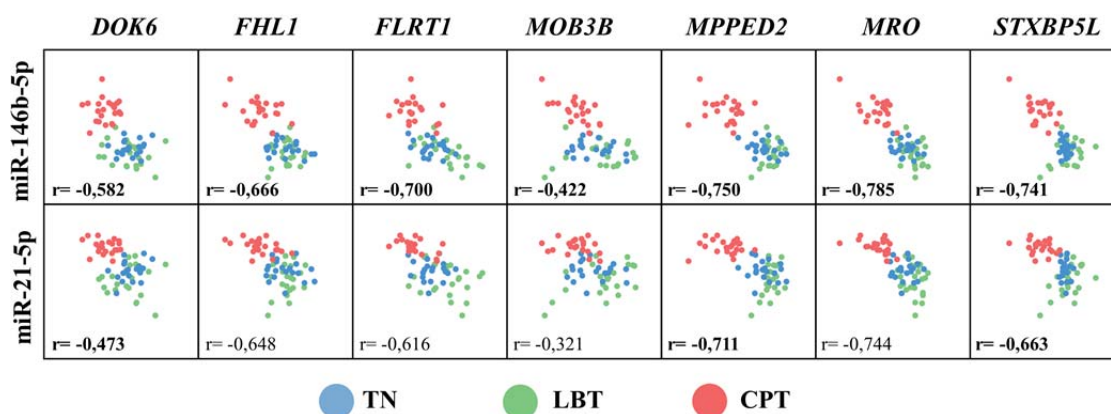


Figura 14 - Correlação entre a expressão dos transcritos (*DOK6*, *FHL1*, *FLRT1*, *MOB3B*, *MPPED2*, *MRO* e *STXBP5L*) e a expressão do hsa-miR-146b-5p e hsa-miR-21-5p. Os setes genes alvos apresentaram correlação negativa alta com seus respectivos alvos. **Legenda:** r: coeficiente de correlação de Pearson (r em negrito: Alvos com predição de interação com o hsa-miR-146b-5p e hsa-miR-21-5p, respectivamente). P: teste de correlação de Pearson ($P < 0,001$ para os sete genes). Azul: tireoide não neoplásica; Verde: lesões benignas da tireoide e Vermelho: carcinoma papilífero de tireoide

5.2.4 Associação dos achados com características clínico-patológicas

A associação com os dados clínicos e histopatológicos foi realizada em duas etapas, sendo a primeira delas usando os dados depositados no TCGA. As sondas resultantes da análise de metilação correspondentes ao *MIR146B* (cinco sondas) e *MIR21* (quatro sondas), a expressão de hsa-miR-146b (5p e 3p) e hsa-miR-21 (5p) e seus respectivos transcritos alvos (348) foram associados com o estadiamento clínico IV, metástase linfonodal, extensão extratireoidiana, variante de células alta e mutação em *BRAF* ($P < 0,001$, FDR 5% e $FC > 1,5$ ou $\Delta \beta > |0.1|$) oriundos do TCGA. Curiosamente, a hipometilação e expressão aumentada do *MIR146B* (hsa-miR-146b-5p e 3p) foram associadas com estadiamento clínico IV, metástase linfonodal, extensão extratireoidiana e mutação em *BRAF*. A hipometilação e expressão aumentada do gene codificador do *MIR21* (hsa-miR-21-5p) também foram associados com metástase linfonodal, variante de células alta e mutação em *BRAF* (informações detalhadas no Anexo 2).

Em adição, foram observadas diversas associações significativas com os transcritos alvos desses miRNAs, principalmente com acometimento linfonodal e mutação em *BRAF*. A Tabela 5 apresenta os resultados da análise dos dados obtidos do TCGA comparando a expressão dos três miRNAs e seus transcritos alvos com as características clínicas dos pacientes.

Tabela 5 - Número de transcritos alvos dos três miRNAs e comparação com achados clínicos e histopatológicos.

Dados clínicos	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-21-5p
Número de alvos com expressão diminuída			
Estadiamento clínico avançado (IV)	34	32	20
Acometimento linfonodal	80	83	51
Extensão extra tireoidiana	62	65	42
Variante de células altas	54	50	27
Mutação em <i>BRAF</i>	150	154	111
TOTAL DE ALVOS	190	195	128

Legenda: Dados obtidos do TCGA em Janeiro de 2017. Esses achados estão detalhados no Anexo 2.

A segunda etapa de comparação dos achados do padrão de metilação, assim como a expressão dos genes *MIR21* e *MIR146B* com dados clínicos foi realizada utilizando os dados obtidos neste estudo. Foi verificada uma associação entre a porcentagem de metilação e a expressão relativa (Tabela 6) do gene *MIR146B*, após correção de Bonferroni, com a presença da mutação *BRAFV600E*. Baixos níveis de metilação e o aumento de expressão destes genes foram significativamente associados com os tumores positivos para mutação em *BRAF*.

Tabela 6 - Resultados da porcentagem de metilação (pirosequenciamento) e expressão relativa (RT-qPCR) dos *MIR21* e *MIR146B* associados com características clínico-patológicas dos pacientes com CPT (N=103) do presente estudo.

Características	Classes	N=103	<i>MIR21</i>		<i>MIR146B</i>		N=47	hsa-miR-21-5p		hsa-miR-146b-5p	
			média*	P	média*	P		média [#]	P	média [#]	P
Idade	<55 anos	83	15,6	0,160	46,3	0,359	39	2,3	0,077	5,5	0,486
	>55 anos	20	13,2		43,9		8	2,8		5,9	
Gênero	Feminino	80	14,9	0,493	46,3	0,391	38	2,4	0,698	5,5	0,557
	Masculino	23	16,1		44,2		9	2,3		5,8	
mCPT	miCPT	72	14,3	0,455	46,9	0,472	39	2,2	0,590	5,1	0,311
	CPT	31	15,5		45,3		8	2,4		5,7	
Variante**	Clássica	74	14,5	0,069	44,4	0,074	31	2,4	0,861	5,4	0,541
	Folicular	22	17,7		48,8		15	2,3		5,7	
Multicentricidade	Ausente	62	15,1	0,889	44,5	0,109	28	2,3	0,298	5,3	0,110
	Presente	41	15,3		47,8		19	2,5		6,0	
Extensão extra-tireoidiana	Ausente	68	15,8	0,147	46,6	0,258	32	2,3	0,301	5,4	0,078
	Presente	35	13,7		44,1		15	2,5		6,0	
Invasão angiolinfática***	Ausente	89	15,0	0,600	46,5	0,122	39	2,3	0,143	5,5	0,526
	Presente	12	16,1		41,7		7	2,8		5,9	
Status linfonodal	Nx/N0p	66	16,0	0,077	47,1	0,077	29	2,3	0,344	5,3	0,132
	N1p	37	13,4		43,4		18	2,5		5,9	
Mutação <i>BRAF</i> ***	WT	42	16,8	0,036	51,1	<0,001	18	2,1	0,030	4,9	0,002
	V600E	60	13,8		41,9		28	2,6		6,1	

Legenda: N: número amostral. mCPT: microcarcinoma papilífero de tireoide. Nx/N0p: linfonodos regionais não avaliados/sem evidência de metástase linfonodal. N1p: linfonodos comprometidos ao diagnóstico. WT: wild-type. V600E: substituição do aminoácido valina pelo glutamato no códon 600. P: teste exato de Fisher ($P < 0,05$). Valores em negrito: valor significativo após a correção de Bonferroni ($9 \text{ variáveis} \times 0,05 = P < 0,0056$). *Porcentagem de metilação obtida por pirosequenciamento pós-conversão por bissulfito. #Expressão relativa obtida por RT-qPCR. **Outras variantes (1 de células altas, 3 esclerosantes, 1 oncocítica e 2 sólidas), não foram comparadas nessa etapa. ***Presença de casos com características não informadas.

Não foi observado resultado significativo na análise de sobrevida livre de doença comparando a metilação dos genes *MIR21* (P log rank = 0,726) e *MIR146B* (P log rank = 0,268) e os níveis de expressão dos mesmos (nos dois casos, P log rank = 0,956) (Figura 15).

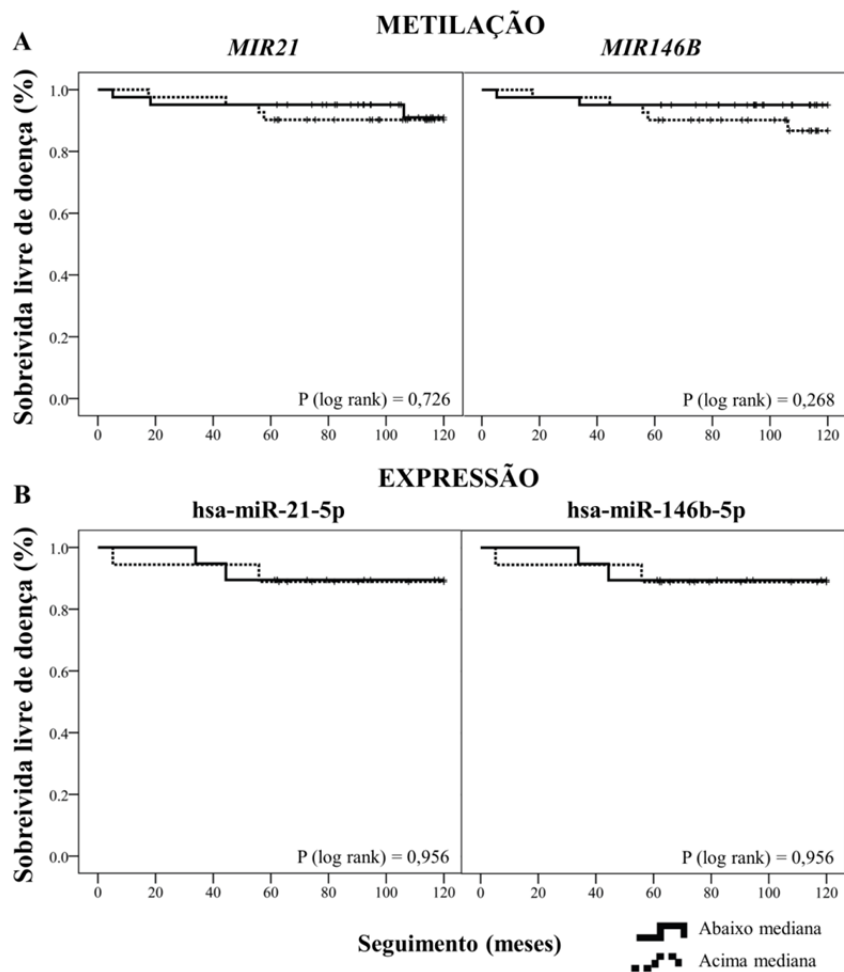


Figura 15 - Curvas de sobrevida livre de doença em relação aos dados do padrão de metilação e expressão dos genes *MIR21* e *MIR146B*. Não foram observadas diferenças significativas. **Legenda:** P análise de log rank.

Os dados de expressão dos alvos (*DOK6*, *FHL1*, *FLRT1*, *MOB3B*, *MPPED2*, *MRO* e *STXBP5L*) foram relacionados com os fatores prognósticos dos pacientes com CPT. Foi verificada uma associação significativa, após correção de Bonferroni, entre baixos níveis de expressão dos genes *FHL1* e *MRO* com a presença de tumores positivos para a mutação em *BRAF*. Foi também observada uma significância marginal ($p=0,006$) na comparação entre o menor nível de expressão do gene *STXBP5L* com a presença da mutação *BRAFV600E* (Tabela 7).

Tabela 7 - Níveis relativos de expressão dos setes genes alvos comparados com características clínico-patológicas dos pacientes com CTP.

Características	Classes	N=44*	DOK6		FHL1		FLRT1		MOB3B		MPPED2		MRO		STXBP5L	
			média	P	média	P	média	P	média	P	média	P	média	P	média	P
Idade	<55 anos	36	-1,3	0,547	-1,9	0,257	-0,6	0,507	-0,5	0,712	-2,7	0,894	-2,8	0,106	-3,5	0,152
	>55 anos	8	-1,2		-2,4		-1,2		-0,4		-2,7		-3,8		-4,5	
Gênero	Feminino	36	-1,3	0,649	-2,0	0,647	-0,8	0,283	-0,4	0,650	-2,7	0,206	-3,0	0,784	-3,7	0,777
	Masculino	8	-1,2		-1,8		0,2		-0,5		-2,4		-2,9		-3,5	
mCPT	miCPT	37	-1,3	0,301	-2,0	0,559	-0,7	0,963	-0,5	0,060	-2,8	0,154	-3,2	0,088	-3,9	0,063
	CPT	7	-1,1		-1,7		-0,6		0,0		-2,1		-2,1		-2,5	
Variante**	Clássica	28	-1,3	0,943	-2,2	0,228	-0,8	0,540	-0,3	0,120	-2,6	0,582	-3,1	0,685	-3,7	0,773
	Folicular	15	-1,3		-1,7		-0,4		-0,6		-2,8		-2,9		-3,5	
Multicentricidade	Ausente	25	-1,3	0,526	-2,0	0,874	-0,6	0,877	-0,4	0,275	-2,7	0,965	-2,9	0,624	-3,5	0,453
	Presente	19	-1,2		-2,0		-0,7		-0,6		-2,7		-3,1		-3,9	
Extensão extra-tireoidiana	Ausente	30	-1,3	0,493	-2,0	0,763	-0,6	0,951	-0,5	0,674	-2,7	0,815	-3,0	0,922	-3,7	0,859
	Presente	14	-1,2		-1,9		-0,7		-0,4		-2,6		-3,0		-3,6	
Invasão angiolinfática***	Ausente	36	-1,3	0,642	-1,9	0,191	-0,6	0,761	-0,5	0,386	-2,8	0,324	-2,9	0,339	-3,4	0,242
	Presente	7	-1,2		-2,6		-0,9		-0,2		-2,2		-3,6		-4,7	
Status linfonodal	Nx/N0p	27	-1,3	0,267	-2,3	0,014	-0,6	0,724	-0,5	0,683	-2,9	0,172	-3,3	0,095	-3,9	0,377
	N1p	17	-1,1		-1,5		-0,8		-0,4		-2,4		-2,5		-3,4	
Mutação BRAF***	WT	17	-1,0	0,070	-1,2	<0,001	-0,7	0,793	-0,5	0,831	-2,3	0,059	-2,2	0,004	-2,7	0,006
	V600E	26	-1,4		-2,5		-0,8		-0,4		-3,0		-3,6		-4,3	

Legenda: N: número amostral. mCPT: microcarcinoma papilífero de tireoide. Nx/N0p: linfonodos regionais não avaliados/sem evidência de metástase linfonodal. N1p: linfonodos comprometidos ao diagnóstico. WT: *wild type*. V600E: substituição do aminoácido valina pelo glutamato no códon 600. P: teste exato de Fisher. Valores em negrito: significativo após correção de Bonferroni (9 variáveis x 0,05 = P< 0,0056). Expressão relativa obtida por RT-qPCR. *Menor número amostral devido à insuficiência de RNA. **Outras variantes não comparadas nessa etapa. ***Presença de casos com características não informadas.

5.2.5 Mutação em *BRAF* está associada com hipometilação e expressão aumentada dos genes *MIR21* e *MIR146B*

Entre os 103 casos de CPT incluídos no estudo, 102 foram genotipados por pirosequenciamento para a mutação *BRAFV600E*. A mutação foi observada em 59% (60/102) dos casos sendo significativamente associada com maior expressão de hsa-miR-21-5p ($p < 0,01$) e hsa-miR-146b-5p ($p < 0,001$) e com perda de metilação de DNA nos genes codificadores destes miRNAs ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 16).

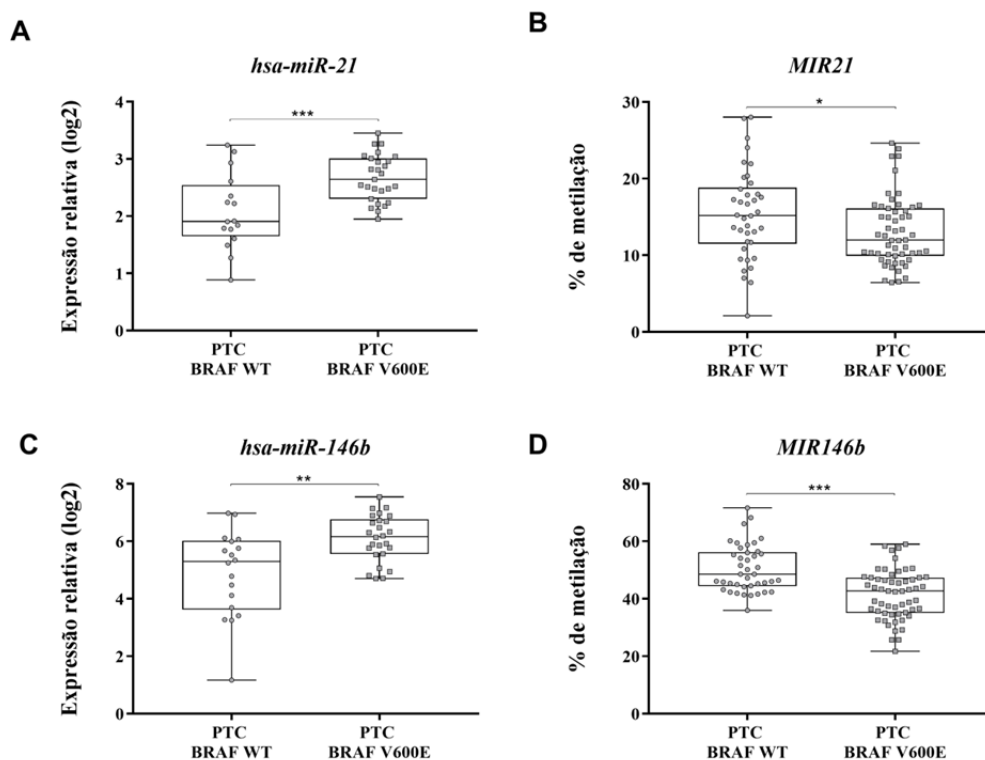


Figura 16 - Análise do padrão de metilação e expressão do *MIR21* (hsa-miR-21-5p) e *MIR146B* (hsa-miR-146b-5p) em relação à presença de mutação em *BRAF*. **A e B.** A presença de mutação em *BRAF* foi significativamente associada com aumento de expressão (A) e baixos níveis de metilação (B) para o hsa-miR-21-5p. **C e D.** Os casos positivos para mutação em *BRAF* apresentaram aumento de expressão (C) e hipometilação (D) do hsa-miR-146b-5p. Os *boxplots* indicam os valores mínimos e máximos da porcentagem de metilação após a remoção de valores extremos. **Legenda:** *BRAF WT*: amostra sem alteração em *BRAF*; *BRAFV600E*: amostra com mutação em *BRAF*; PTC: Carcinoma papilífero de tireoide; * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$; *** $P < 0,01$ (ANOVA e pós-teste de *Tukey*).

5.3 MÓDULO 3: ESTUDOS EM LINHAGENS CELULARES PARA CONFIRMAÇÃO DA REGULAÇÃO DOS GENES *MIR21* E *MIR146B* POR METILAÇÃO

5.3.1 Metilação basal das células BCPAP, K1 E TPC1 nas regiões do *MIR21* e *MIR146B*

O nível de metilação basal (células não tratadas) dos genes *MIR146B* e *MIR21* nas linhagens de câncer de tireoide (BCPAP, K1 e TPC1) foi avaliado quanto ao status de metilação antes do ensaio de desmetilação com 5-Aza-dC.

O gene *MIR146B* apresentou uma porcentagem alta de metilação basal para TPC1 (média de 60%), K1 (média de 49%) e BCPAP (média de 51%), enquanto que a média do nível de metilação inicial para o *MIR21* foi de 6% para as três linhagens. Com base nestes resultados, os experimentos para avaliar o papel da metilação na regulação dos genes de microRNA foram realizados apenas para o *MIR146B* (Figura 17).

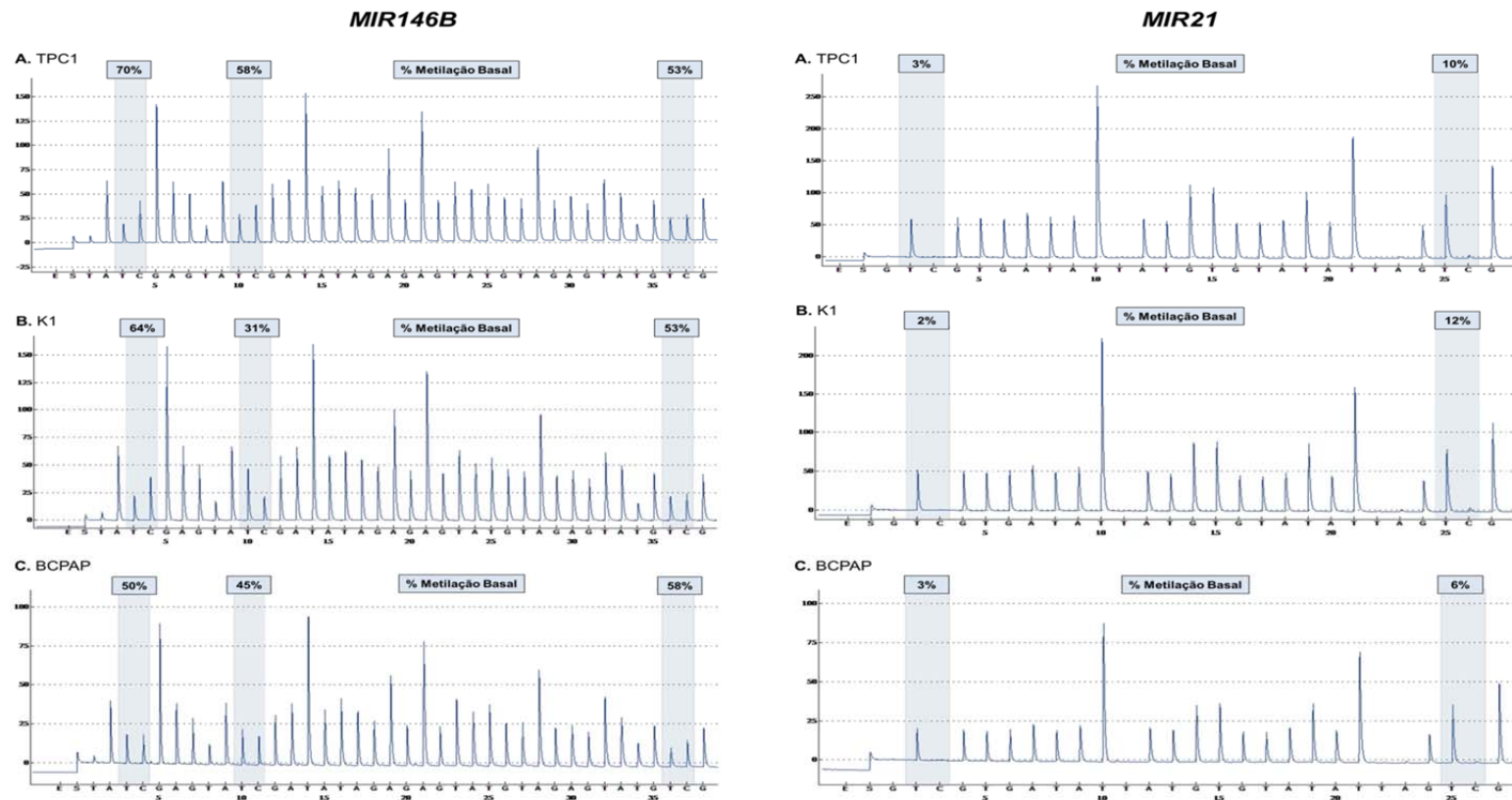


Figura 17 - Pirograma representativo da porcentagem de metilação basal das linhagens celulares TPC1, K1 e BCPAP para os genes codificadores *MIR146B* e *MIR21*. **Legenda:** À esquerda é observada a porcentagem de metilação do gene *MIR146B* para as três linhagens, na qual a média basal de metilação foi de 53%. Foram analisados três dinucleotídeos CpGs (lista transversal cinza). À direita destacamos a média de metilação igual a 6% do *MIR21* para as três linhagens celulares. Foram analisados dois dinucleotídeos CpGs (lista transversal cinza).

5.3.2 Teste de viabilidade celular

Os resultados do teste do MTT mostraram que as concentrações testadas (0,1 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M; 2 μ M e 3 μ M) da 5-Aza-dC não foram capazes de diminuir significativamente a viabilidade celular das linhagens BCPAP e TPC1 (Apêndice 3). Esse ensaio não foi realizado na linhagem K1.

Baseado nestes achados e em dados da literatura foram selecionadas as concentrações de 1 μ M e 3 μ M de 5-Aza-dC para serem usadas nos ensaios subsequentes (DI CROCE et al. 2002; YUAN et al. 2004; YAMASHITA et al. 2006; COSTA PRANDO et al. 2011).

5.3.3 Confirmação da desmetilação após tratamento com 5-Aza-dC

As linhagens celulares TPC1, K1 e BCPAP foram tratadas com 5-Aza-dC nas concentrações de 1 μ M e 3 μ M por 96 horas. O nível de metilação de sequências repetitivas das regiões *AluYb8* e *AIR1Sat* foi avaliado por pirosequenciamento nas três linhagens tratadas com 5-Aza-dC e controles (DMSO). Os pirogramas representativos do ensaio de desmetilação dessas regiões estão detalhados no Apêndice 4 (Figura suplementar 4.1, 4.2 e 4.3).

A porcentagem de metilação inicial de *AIR1Sat* e *AluYb8*, assim como o nível de metilação nas concentrações de 1 μ M e 3 μ M de 5-Aza-dC para as linhagens TPC1, K1 e BCPAP estão detalhadas na Tabela 8.

Foi observada a diminuição da porcentagem de metilação das regiões *AIR1Sat* e *AluYb8* nas três linhagens celulares tratadas com 1 μ M. Na linhagem BCPAP foi observado perda de metilação nas duas doses testadas (1 μ M e 3 μ M) para as regiões *AIR1Sat* e *AluYb8*.

Tabela 8 - Porcentagem de metilação de sequências repetitivas *AIR1Sat* e *AluYb8* nas linhagens TPC1, K1, BCPAP tratadas com 1 μ M e 3 μ M de 5-Aza-dC e DMSO (Controle: 0 μ M de 5-Aza-dC).

5-Aza-dC	TPC1		K1		BCPAP	
	<i>AIR1Sat</i>	<i>AluYb8</i>	<i>AIR1Sat</i>	<i>AluYb8</i>	<i>AIR1Sat</i>	<i>AluYb8</i>
0 μM*	60%	76%	40%	69%	58%	63%
1 μM	15%	60%	15%	54%	25%	38%
3 μM	23%	71%	35%	67%	20%	33%

Legenda: *Tratamento com DMSO (controle).

Estes resultados indicaram que houve diminuição dos níveis de metilação nas regiões testadas para as duas concentrações de 5-Aza-dC testadas. Para os ensaios subsequentes foram utilizadas as concentrações de 1 μ M e 3 μ M de 5-Aza-dC para confirmar a regulação dos genes de miRNAs por metilação.

5.3.4 Gene *MIR146B* é potencialmente regulado por metilação

Após o tratamento com 5-Aza-dC (1 μ M e 3 μ M) nas linhagens celulares TPC1, K1 e BCPAP, foi realizado uma avaliação por pirosequenciamento (Figura 18) e a confirmação dos achados por RT-qPCR para o gene *MIR146B*.

O nível de metilação inicial nas células tratadas com DMSO (controle) foi de 59%, 50% e 50% em TPC1, K1 e BCPAP, respectivamente. Foi possível observar uma desmetilação sutil na linhagem celular TPC1 (55% e 45%) e BCPAP (46% e 44%), nas concentrações de 1 μ M e 3 μ M, respectivamente. Para K1 (39% e 56%) não foi possível observar o mesmo efeito, pois na concentração de 3 μ M a porcentagem de metilação aumentou (Figura 19A).

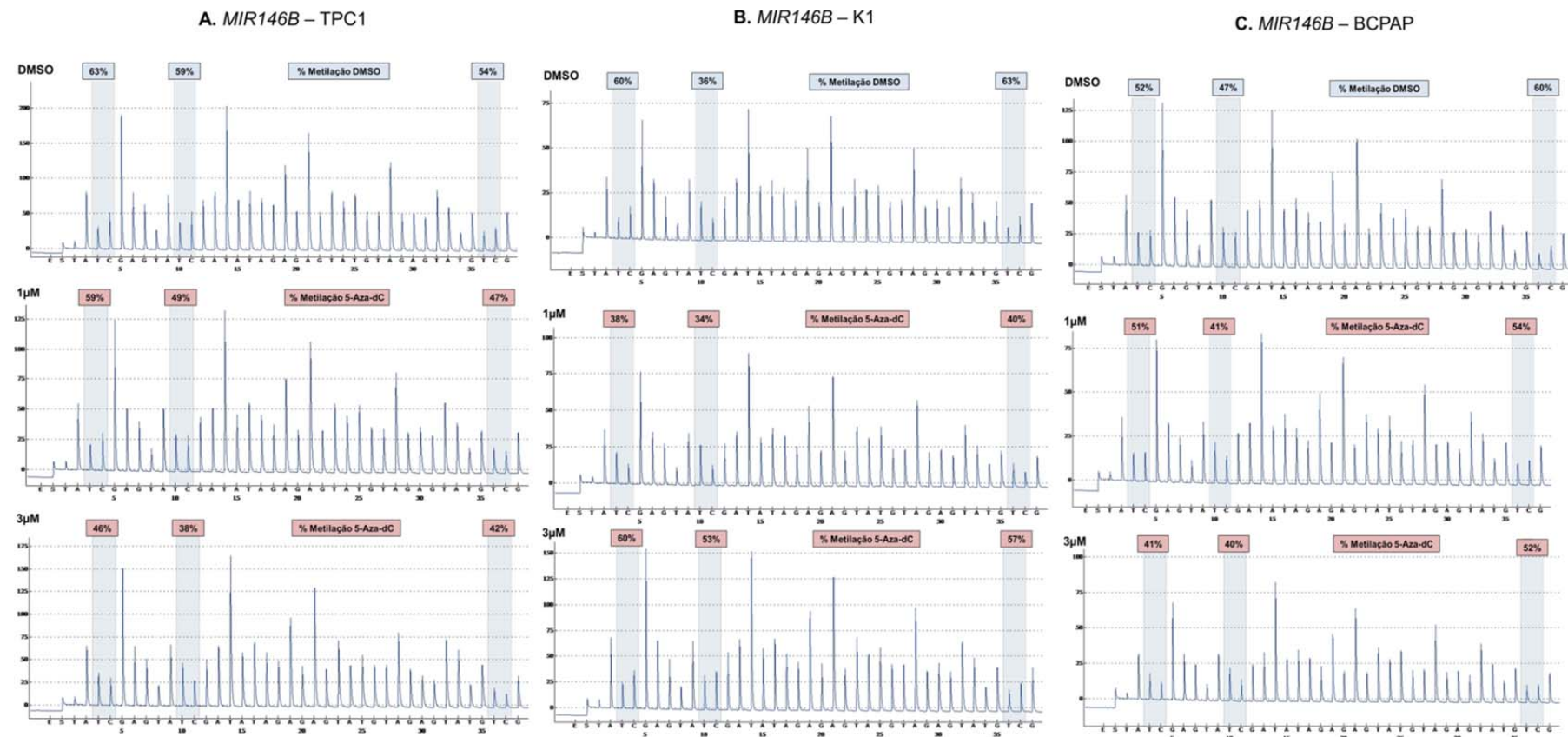


Figura 18 - Pirogramas representativos do gene *MIR146B* nas linhagens celulares tratadas com 5-Aza-dC. **A.** Nível de metilação inicial (DMSO) comparado às concentrações de 1 e 3µM de 5-Aza-Dc na linhagem TPC1. É possível observar uma desmetilação (média de 52%) na concentração de 1µM e de 3µM (média de 46%). **B.** Diminuição da porcentagem de metilação na linhagem K1 após o tratamento com a droga a um 1µM. Em 3µM não foi observado a redução de metilação esperada. **C.** Na linhagem BCPAP, o nível de metilação reduziu 48% e 44% nas concentrações 1µM e 3µM, respectivamente. Foram analisados três dinucleotídeos CpGs (lista transversal cinza).

Para confirmar os achados, foi avaliada a expressão do hsa-miR-146b-5p após o tratamento com 5-Aza-dC por RT-qPCR (experimento em duplicata). Foi observada expressão aumentada do hsa-miR-146b-5p na linhagem TPC1 nas duas concentrações testadas de 5-Aza-dC (1 μ M e 3 μ M) (Figura 19B).

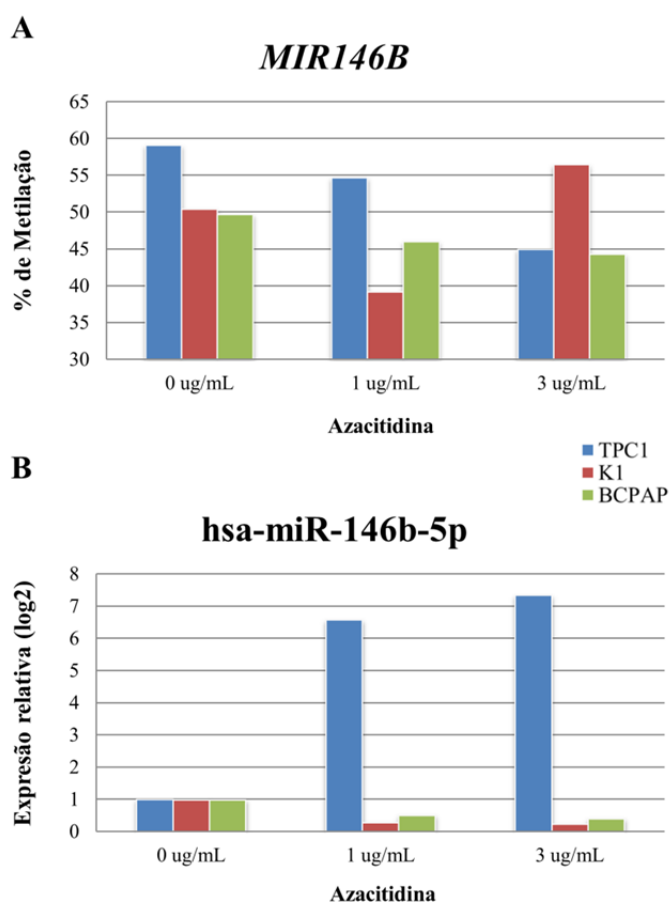


Figura 19 - Porcentagem de metilação e expressão relativa do gene *MIR146B* nas linhagens celulares TPC1, BCPAP e K1 tratadas com 5-Aza-dC. **A.** Desmetilação sutil após tratamento com 5-Aza-dC para o gene onde se mapeia o *MIR146B* observado nas linhagens TPC1 e BCPAP. **B.** Aumento de expressão observado na linhagem TPC1 nas concentrações de 1 μ M e 3 μ M.

6 DISCUSSÃO

O CPT é um tumor que apresenta evidente aumento de incidência (SIEGEL 2017). Sabe-se que origem e a progressão do câncer decorrem do acúmulo gradual de alterações genéticas e epigenéticas (BAYLIN e JONES 2011). Embora existam muitos estudos moleculares em CPT, apenas uma pequena parcela deste conhecimento é aplicada na prática clínica.

A metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais estudado e vem ganhando notoriedade ao longo dos últimos anos devido ao seu papel na regulação de genes relacionados com o desenvolvimento de neoplasias (JONES e BAYLING 2007; SANDOVAL e ESTELLER 2012). Em adição, os RNAs não codificadores, em especial os microRNAs, desempenham um papel crucial na regulação da expressão gênica e estão associados à tumorigênese (LU et al. 2017; QIAN et al. 2017). Apesar do conhecimento sobre a regulação da expressão de genes codificadores de proteínas por metilação do DNA, pouco se sabe sobre a regulação da expressão de miRNAs por este mecanismo epigenético (CHEN et al. 2017; LIU et al. 2017).

Diversos estudos reportaram perfis de metilação alterados em CPT (KIKUCHI et al. 2013; MANCIKOVA et al. 2013; RODRÍGUEZ-RODERO et al. 2013; ELLIS et al. 2014; *The Cancer Genome Atlas Research Network* 2014; BELTRAMI et al. 2017; DOS REIS et al. 2017), principalmente hipometilação global nos tumores em relação ao tecido normal (ELLIS et al.

2014, BELTRAMI et al. 2017). Características específicas dos tumores de tireoide, como mutação em *BRAF*, *RAS* e a presença do rearranjo *RET/PTC* também foram reportadas como associadas com distintos padrões de metilação global (KIKUCHI et al. 2013; ELLIS et al. 2014; BELTRAMI et al. 2017).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que o perfil de metilação é específico de acordo com sua classificação como tumores benignos, CPT, carcinomas foliculares ou anaplásicos (DOS REIS et al. 2017). Nesse estudo, foi verificado que a análise do padrão de metilação de regiões genômicas específicas pode ser uma promissora ferramenta prognóstica em carcinomas bem diferenciados de tireoide (DOS REIS et al. 2017). Nosso grupo também caracterizou o perfil de metilação do DNA em CPT comparados ao tecido normal do mesmo paciente, onde foi observada uma hipometilação global nos tumores (BELTRAMI et al. 2017). Apesar de muitos genes serem evidenciados como potencialmente regulados por metilação de DNA, pelo mecanismo clássico de metilação em regiões promotoras, foi possível identificar que uma significativa parcela das sondas alteradas estava mapeada em regiões gênicas não promotoras e intergênicas. Pelo fato da metilação do DNA ser um importante mecanismo envolvido na regulação da expressão de miRNAs, avaliamos, no presente estudo, as regiões codificadoras de miRNAs com o objetivo de elucidar o papel desse mecanismo na regulação da expressão de miRNAs em CPT.

Os dados globais de metilação obtidos de uma análise pareada de 50 CPT e tecido normal adjacente ao tumor (BELTRAMI et al. 2017; DOS REIS

et al. 2017) foram reavaliados com o objetivo de identificar genes codificadores de microRNA regulados por metilação. Em princípio, foram identificadas 50 sondas diferencialmente metiladas (representando 34 miRNAs), das quais 42 foram confirmadas pelo TCGA (representando 27 miRNAs). Nessa etapa, oito sondas não estavam disponíveis no TCGA e, portanto, foram removidas. Logo a reprodutibilidade nesse passo de validação das sondas de metilação pode ser considerada como 100%.

Subsequentemente, foram explorados os dados de expressão de miRNAs provenientes do TCGA, permitindo a identificação de 67 miRNAs diferencialmente expressos em CPT em relação ao TN. Diversos estudos buscaram encontrar alterações no perfil de expressão de miRNAs por metodologias de larga escala (DETTMER et al. 2013a; JACQUES et al. 2013; WANG et al. 2017). HU et al. (2016) realizaram uma revisão sistemática e meta-análise comparando a expressão de miRNAs em carcinomas de tireoide com o tecido normal pareado, com o objetivo de encontrar possíveis biomarcadores. Os autores encontraram 236 miRNAs diferencialmente expressos em 19 publicações envolvendo estudos de larga escala. Os miRNAs miR-221-5p, miR-222-5p, miR-34a-5p, miR-146b-5p, miR-21-5p, miR-31-5p, miR-181-5p e miR-138-5p estavam entre os melhores ranqueados, e foram confirmados por uma análise de RT-qPCR. Desses, apenas o miR-181-5p não estava em nossa lista de 67 miRNAs alterados.

Os resultados de metilação e expressão global de miRNAs foram posteriormente integrados utilizando os dados do TCGA. A abordagem de

integração de dados permite um maior conhecimento de processos moleculares e celulares, sendo de extrema importância para o conhecimento de alterações envolvidas na carcinogênese (HAMID et al. 2009). Na análise integrada foi possível identificar três microRNAs: hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-146b-3p e hsa-miR-21-5p, os quais apresentaram relações inversas entre a expressão diferencial dos miRNAs e do padrão de metilação altamente significativas

Cinco sondas contendo CpGs com metilação alterada foram associadas com a expressão do hsa-miR-146b-3p e hsa-miR-146b-5p, no entanto três foram selecionadas para confirmação (correspondentes às sondas que apresentaram maior correlação negativa). Já a expressão de hsa-miR-21-5p foi associada com quatro sondas identificadas com alteração da metilação, das quais duas, que apresentaram os maiores valores de correlação negativa, foram validadas. Até o momento, ainda não é conhecido como a expressão alterada desses microRNAs afeta o desenvolvimento tumoral ou como ocorre o mecanismo de regulação da expressão desses miRNAs no câncer de tireoide (SUZUKI et al. 2012; FAAM et al. 2015).

Muitos estudos caracterizaram a metilação de DNA como reguladores da expressão de miRNAs (TANAKA et al. 2011; LV et al. 2015; NADAL et al. 2013; XIA et al. 2015; CHIOU et al. 2013; STEPONAITIENE et al. 2016). Outros relatos mostraram que a alteração de miRNAs pode levar a metilação aberrante de genes alvos em diversos tipos tumorais (FABBRI et al. 2007; NG et al. 2009; HUANG et al. 2010; BRACONI et al. 2010; WANG et al.

2011; ZHANG et al. 2011; MAJID et al. 2013). Esses dados apresentam um novo nível de complexidade na rede de regulação gênica e indicam que a metilação em genes codificadores de miRNAs pode ser um importante fator na gênese e progressão do câncer.

A lista crescente de miRNAs descritos como regulados por metilação em câncer revela que um grande número deles atua como supressores de tumor ou oncogenes (SUZUKI et al. 2016). Além disso, trabalhos descrevendo o papel desses miRNAs na carcinogênese da tireoide também têm aumentado consideravelmente (PENG et al. 2014; FAAM et al. 2015). Em 2011, KUNEJ et al. relataram que mais de 100 genes codificadores de miRNAs são regulados por mecanismos epigenéticos. A metilação em promotores de miRNA foi descrita pela primeira vez em 2006, quando SAITO et al. relataram que a expressão do miR-127 era induzida em resposta à desmetilação por 5-aza-2'-desoxicitidina (5-Aza-dC). Em linhagens de câncer de mama, quase um terço dos promotores de miRNA são hipermetilados comparados com as células normais de mama (VRBA et al. 2013). Vários outros estudos demonstraram alterações no padrão de metilação de miRNAs em diferentes tipos tumorais, incluindo câncer de colón (TANAKA et al. 2011; LV et al. 2015), adenocarcinoma de pulmão (NADAL et al. 2013; XIA et al. 2015), glioblastoma (CHIOU et al. 2013) e carcinoma gástrico (STEPONAITIENE et al. 2016).

No presente estudo, foi avaliado o padrão de metilação dos genes *MIR21* e *MIR146B* e seu envolvimento na regulação de sua expressão. Os resultados mostraram expressão aumentada e hipometilação de ambos

miRNAs em CPT em relação aos tecidos não-malignos (TN e LBT). Apesar de alguns autores reportarem o aumento de expressão desses miRNAs em CPT (HU et al. 2016; WÓJCICKA et al. 2016; WANG et al. 2017), o padrão de metilação desses genes codificadores de miRNAs em câncer foi, até o momento, pouco explorado. Para o nosso conhecimento, apenas o estudo realizado pelo TCGA descreveu miRNAs regulados por mecanismos epigenéticos em CPT. Nesse estudo, os autores também identificaram o miR-21 e o miR-146b como diferencialmente expressos e potencialmente regulados por metilação (*The Cancer Genome Atlas Research Network* 2014). No entanto, não foram realizados estudos confirmatórios e funcionais que permitissem esclarecer o papel desse processo nos CPT.

O aumento de metilação na região 5' do gene *MIR146B* foi relatado em astrocitomas difusos, anaplásicos e em glioblastomas secundários (WOLTER et al. 2015). Os autores relataram que este miRNA era regulado por metilação ao detectarem o aumento da sua expressão em linhagens celulares de glioma após o tratamento com 5-AZA-dC. Os autores também validaram como alvo do miR-146b, o receptor de fator de crescimento epidermal (*EGFR*), sugerindo que a diminuição da expressão desse miRNA por hipermetilação, leva a maior expressão de *EGFR*, promovendo proliferação e facilitando a invasão e migração das células tumorais. Além disso, foi observada associação entre a expressão aumentada do miR-146b e apoptose, sugerindo que a expressão diminuída desse miRNA tem efeitos anti-apoptóticos em gliomas (WOLTER et al. 2015).

XIANG et al. (2014) também avaliaram o papel da metilação do gene *MIR146B* ao reconhecê-lo como alvo das proteínas da família STAT (*Signal transducers and activators of transcription*), fatores de transcrição com importante papel no desenvolvimento tumoral. Os autores investigaram a regulação do miR-146b em tecido normal (modelos animais) e em linhagens de câncer de mama. Em tecido normal e em linhagens não tumorais, a modulação de STAT3 resultava em alterações na expressão de miR-146b, a qual não foi observada em linhagens celulares de câncer de mama. Os autores relataram que a metilação na região promotora do gene *MIR146B* diminuía em até 70% a ação de expressão de *STAT3*, sendo necessárias ambas hipometilação de *MIR146B* e atividade da proteína STAT3 para indução de miR-146B. Para validar esses achados, os autores utilizaram dados do TCGA com mais de 500 amostras disponíveis de tumores de mama com dados de metilação em mais de 485000 CpGs. A metilação na região promotora de *MIR146B* estava significativamente elevada nos tumores em comparação com o tecido normal pareado e inversamente correlacionada com a sua expressão. Por fim, os autores mostraram a associação entre o aumento da expressão de miR-146b com maior sobrevida global em pacientes com câncer de mama triplo negativos ou negativos para o receptor de estrógeno, mas não em outros tipos tumorais, pois os mesmos não sofrem influência da ativação de STAT3 (XIANG et al. 2014). Esses achados demonstraram a importância do papel regulatório desse miRNA nos diferentes tipos tumorais, pois, dependendo do contexto das vias regulatórias alteradas em cada tumor, estes miRNAs podem atuar

como supressores tumorais ou oncomiRs (MINNA et al. 2014; YONEYAMA et al. 2015; HAGHPANAH et al. 2015; DUAN et al. 2016; LIU et al. 2017; IMAMURA et al. 2017).

YANG et al. (2013) identificaram 14 miRNAs com aumento de expressão e 10 com baixa expressão em CPT mais agressivos (com extensão extratireoidiana e/ou metástases à distância). O miR-146b-5p foi identificado com aumento de expressão e inversamente correlacionado com seu gene alvo *ZNFR3*, sugerindo o seu potencial para identificar propriedades agressivas em CPT. Dois outros estudos (CHOU et al. 2010; YIP et al. 2011) demonstraram que o miR-146b é altamente expresso em CPT, principalmente quando associado às características de alto risco, incluindo a invasão extra-tireoidiana e a mutação *BRAFV600E*. Em uma análise de miRNAs diferencialmente expressos entre CPT agressivos e indolentes, YIP et al. (2011) relataram a associação entre o miR-146b com a presença de mutação em *BRAF*, sugerindo sua importância como um marcador de pior prognóstico. Um resultado semelhante foi observado por CHOU et al. (2010), associando o nível de expressão do miR-146b com CPT de alto risco e positivos para mutação em *BRAF*.

Em um estudo subsequente, os autores CHOU et al. (2013) também buscaram correlacionar os níveis de expressão tumoral de miR-146b e o prognóstico de 71 pacientes com CPT. Os pacientes com níveis mais altos de expressão do miR-146b apresentaram menor sobrevida livre de doença. Além disso, experimentos utilizando a linhagem BCPAP demonstraram que a expressão aumentada de miR-146b resultava em uma maior taxa de

proliferação, migração, invasão celular e resistência à apoptose induzida por quimioterapia.

De modo semelhante ao *MIR146B*, nossos achados para o gene *MIR21* demonstraram o aumento de expressão e hipometilação em CPT em relação ao TN e LBT. O hsa-miR-21, um dos primeiros a ser descrito como *oncomir*, é um dos mais estudados em diversos tipos de câncer (YANG et al. 2015; LI et al. 2016; JIANG et al. 2016; FANG et al. 2017). A alta expressão do miR-21 já foi associada com recorrência tumoral em câncer de cólon (KJAER-FRIFELDT et al. 2012), bexiga (ZARAVINOS et al. 2012), mama (OTA et al. 2011 e WANG et al. 2015), próstata (LI et al. 2012), menor sobrevida em câncer de pulmão (CINEGAGLIA et al. 2016) e metástases linfonodais em carcinoma esofágico (HUMMEL et al. 2011 e LI et al. 2013). Embora muitos estudos tenham descrito a expressão aumentada do miR-21, estudos recentes revelaram baixa expressão do miR-21 relacionada a metástase de câncer de próstata (REN et al. 2014) e carcinomas de tireoide (SONDERMANN et al. 2015 e YORUKER et al. 2016). A expressão de miR-21 também é relatada como significativamente aumentada em diferentes subtipos de tumores primários de tireoide (FREZZETTI et al. 2011; HUANG et al. 2013; ZHANG et al. 2014; GUO et al. 2015; PENNELLI et al. 2015), corroborando com os nossos resultados. GUO et al. (2015) relataram que o miR-21 apresentou expressão aumentada em carcinomas anaplásicos (83%), CPT (79%), CPTVF (CPT com variante folicular; 34%) e em carcinomas pouco diferenciados de tireoide (19%), enquanto que o miR-146b-5p foi altamente expresso em CPT (89%) e CPTVF (41%).

O miR-21 também tem sido descrito como regulador da expressão de *STAT3*. Ao buscar miRNAs epigeneticamente desregulados em câncer, HULF et al. (2011) desenvolveram um *pipeline* que identificou repressão da expressão de miR-21 por hipermetilação na região promotora de seu gene em linhagens de câncer de próstata. O tratamento com 5-Aza-cD levou ao aumento de expressão de miR-21 em linhagens celulares de câncer de próstata, assim como em linhagens de câncer de ovário (IORIO et al. 2007; HULF et al. 2011). Entretanto, nenhum dos dois estudos avaliou o padrão de metilação do *MIR21* em amostras tumorais de pacientes.

A expressão diferencial dos miRNAs é um mecanismo que têm sido utilizado na construção de classificadores diagnósticos (LASSALLE et al. 2011; KITANO et al. 2011; PILLI et al. 2017). Alguns estudos demonstraram o papel dos miRNAs no desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas, prognósticas e terapêuticas em CT (CARVALHEIRA et al. 2015; ZHANG et al. 2017b; CAVEDON et al. 2017). Nossos achados de expressão gênica dos miRNAs exploraram a utilidade desses miRNAs na construção de um algoritmo diagnóstico baseado na expressão combinada do hsa-miR-21-5p e hsa-miR-146b-5p. Baseados na expressão desses miRNAs foi possível a distinção dos CPT dos tecidos não malignos (96% de sensibilidade e 99% de especificidade), demonstrando seu potencial como biomarcadores. Em adição, a combinação entre os dados de metilação e expressão do *MIR21* também permitiu a separação de CPT dos tecidos não malignos (91% de sensibilidade e 92% de especificidade). Uma abordagem semelhante demonstrou desempenho ainda melhor para *MIR146* (96% de sensibilidade

e 100% especificidade). Entretanto, pela similaridade de classificação e maior complexidade técnica quando comparado a análise de metilação, a análise de expressão de miRNAs é mais facilmente aplicável na rotina clínica. De fato, algumas ferramentas diagnósticas baseadas na expressão de miRNA estão sendo incorporadas na prática clínica.

Recentemente, dois estudos (BENJAMIN et al. 2016; LITHWICK-YANAI et al. 2016), descreveram a validação clínica de um ensaio baseado na expressão de miRNAs, o teste RosettaGX Reveal (Rosetta Genomics, Philadelphia, PA). Nesses estudos, um conjunto de 24 miRNAs foram avaliados (entre eles, o hsa-miR-146b-5p) por RT-qPCR em nódulos tireoidianos citologicamente indeterminados. Primeiramente, foi realizada uma validação analítica para garantir a robustez do teste, a qual comprovou que o ensaio pode ser usado diretamente nos esfregaços de biópsias de aspiração com agulha fina (FNA) (N=576 nódulos), mesmo com limitações do material (apenas 1% de células da tireoide presentes ou extração inferior a 5ng de RNA) (BENJAMIN et al. 2016). Em um ensaio posterior, foi desenvolvido um classificador que permitiu diagnosticar nódulos tireoidianos como benignos ou suspeitos (N=189 casos), o valor preditivo negativo relatado foi de 99%, com sensibilidade de 98% e especificidade de 78% (LITHWICK-YANAI et al. 2016).

AGRETTI et al. (2012) buscaram um classificador diagnóstico em nódulos benignos, CPT e nódulos indeterminados provenientes das PAAF's (138 pacientes), baseado na expressão de sete miRNAs, entre eles, o miR-146b validado em nosso estudo. O perfil de expressão desses miRNAs

permitiu distinguir lesões benignas de CPT. Entretanto, quando o ensaio foi aplicado para avaliar nódulos com citologia indeterminada, foi verificada uma baixa sensibilidade e especificidade, limitando o interesse prático do método.

O miR-146b também já foi testado como potencial marcador diagnóstico não invasivo em soro de pacientes com CPT. ZHANG et al. (2017a) relataram 73% de sensibilidade e 94% de especificidade dos miR-146b, miR-222 e miR-221 em diagnosticar CPT pré-cirurgicamente. Em conjunto, esses resultados demonstram a importância do miR-146b como um marcador diagnóstico em CPT.

Em adição à caracterização da metilação e expressão dos miRNAs selecionados, a identificação dos genes alvos desses miRNAs é de fundamental importância para o entendimento de como a alteração do padrão de metilação e expressão dos miRNAs podem estar associados aos desenvolvimento desse tipo tumoral.

Nesse contexto, foram identificados 348 transcritos alvos (expressão diminuída em CPT) com correlação altamente inversa com os dados de metilação (dados do TCGA). Todos os sete genes alvos (*MPPED2*, *STXBP5L*, *MRO*, *FHL1*, *FLRT1*, *DOK6* e *MOB3B*) selecionados apresentaram uma expressão diminuída em CPT quando comparados ao TN e LBT. As funções biológicas dos transcritos alvos validados estão detalhadas no Anexo 4.

BARROS-FILHO et al. (2015) compararam o perfil de expressão gênica global de CPT comparado a TN identificando 671 genes diferencialmente expressos. Foi realizada uma validação cruzada baseada

em 138 pares de CPT e TN pelos bancos de dados do GEO e TCGA, estabelecendo uma lista de 589 genes com alto grau de confiança em serem alterados em CPT. Cinco (*MPPED2*, *MRO*, *STXBP5L*, *FHL1* e *FLRT1*) dos sete transcritos selecionados para a análise de expressão aqui descrita apresentaram-se nessa lista de genes.

Em um estudo semelhante, LI et al. (2016) detectaram 154 genes diferencialmente expressos entre CPT e tecidos não neoplásicos, dos quais 128 apresentaram expressão diminuída, entre eles o *MPPED2*, sendo categorizado como um marcador de diagnóstico promissor para CPT. Outros estudos também relataram a expressão diminuída de *MPPED2* em comparação com TN (PITA et al. 2009) e LBT (FINN et al. 2007). GOMEZ-RUEDA et al. (2016) buscaram diferenciar lesões malignas de benignas de tireoide com citologias indeterminadas, avaliando a expressão de 15 genes. Entre esses genes estava o *MPPED2*, que demonstrou maior expressão nos nódulos benignos, corroborando com os nossos achados.

O gene *MRO* pertence a uma nova família de genes denominada MROH (*maestro heat-like repeat*), os quais contêm *motifs* repetidos HEAT, cuja função dos ainda é desconhecida (revisado por KENIGSBERG et al. 2017). Essas repetições HEAT foram primeiro identificadas em um grupo de proteínas incluindo *huntingtin*, fator de alongação 3 (EF3), a subunidade regulatória A da proteína fosfatase 2A (PP2A) e TOR1 (ANDRADE e BORK 1995) com possível função na mediação de interações proteína-proteína (SMITH et al. 2008). Esse gene já foi descrito como menos expresso em CPT em relação ao TN em um estudo prévio de perfil transcricional do grupo

(BARROS-FILHO et al. 2015), estando entre os principais genes em uma análise de ranqueamento.

O gene *FHL1* é um supressor tumoral conhecido com baixa ou nenhuma expressão em múltiplos tumores. Em câncer colorretal e câncer de fígado o gene *FHL1* foi descrito com baixa expressão, sendo este regulado pelo miR-410 que apresenta expressão aumentada e recruta a DNMT3A levando a hipermetilação da região promotora deste gene (WANG et al. 2014). Para identificar marcadores moleculares úteis ao diagnóstico de carcinoma folicular (CFT) dos adenomas foliculares de tireoide (AFT), FRYKNÄS et al. (2006) avaliaram o perfil de expressão de 10 CFT e 10 AFT por *microarray*. O nível de expressão do gene candidato, *FHL1*, foi avaliado em uma série independente de 61 tumores. Esse gene apresentou perda de expressão significativa nos CFT quando comparados aos adenomas, sugerindo potencial poder para classificar molecularmente tumores foliculares e melhorar a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos em CFT. Esses estudos dão suporte aos nossos achados, indicando uma provável regulação indireta da metilação e uma complexidade da regulação gênica.

Um ensaio de transfecção do hsa-miR-146b-5p na linhagem celular BCPAP (*mimics* de miRNA), cujos dados estão disponíveis no *Gene Expression Omnibus* (GEO) (GSE76050), nos permitiu selecionar alguns alvos moleculares. Resumidamente, 35 dos 189 transcritos preditos como alvos desse miRNA apresentaram redução de expressão (FC>2). Nessa análise, *FLRT1* apresentou a maior redução de expressão (FC=-2298,9) e

os genes *DOK6* e *MOB3B* (FC= -16,4 e FC= -2,8, respectivamente) também estavam nessa lista.

O gene *FLRT1* codifica a proteína transmembrana fibronectina rica em leucina. Membros dessa família de proteínas podem atuar em funções como adesão celular e receptores de sinalização assim como em interações com outras proteínas na regulação gênica (HAINES et al. 2016). WHELDON et al. (2010) mostraram que resíduos tirosina da proteína FLRT1 são alvos para a fosforilação mediada por FGFR1, e que essa modificação da proteína modula a habilidade de FLRT1 ativar a via de sinalização MAPK. Os autores também mostraram que a proteína FLRT1 mutada (deleção de três resíduos tirosina) transfectada em células embrionárias de rim tem a propriedade de induzir a ativação crônica da via MAPK. Entretanto outros estudos são necessários para elucidar o mecanismo de regulação dessa via de sinalização em células foliculares da tireoide.

Para o nosso conhecimento, não há relatos em literatura sobre associações biológicas com a expressão de *DOK6* em CPT. No entanto, um estudo recente (LEONG et al. 2017) relatou que as vias de sinalização oncogênicas tipicamente ativadas em carcinomas gástricos agressivos (RAS, MAP quinase, EGFR, ERK, ERBB4, FGFR1) apresentaram-se menos ativadas em tumores com baixa expressão de *DOK6*. A sobrevida mediana dos pacientes que apresentaram diminuição da expressão do gene *DOK6* foi maior quando comparada aos casos que apresentaram expressão aumentada (log-rank P =0,0027). Os autores sugeriram o uso do nível de expressão tumoral de *DOK6* para a predição de sobrevida dos pacientes

independente do estadiamento da doença (TNM). Os dados do estudo sugeriram que a expressão de *DOK6* é um biomarcador integrado de múltiplos sinais oncogênicos no câncer gástrico. Os resultados desse estudo foram confirmados pelo banco de dados do TCGA (2014) em adenocarcinoma de estômago, mostrando uma associação significativa entre a expressão de *DOK6* com fenótipos histológicos e moleculares. Em câncer de mama foi verificado que pacientes com maior sobrevida livre de doença apresentaram níveis mais elevados de expressão de *DOK6* em comparação com aqueles que vieram a óbito pela doença, sugerindo seu papel como supressor tumoral nestes tumores (GRANEM et al. 2014).

O gene *MOB3B* apresentou diminuição da expressão em CPT quando comparado com lesões benignas e tecido normal. A expressão de *MOB3B* foi significativamente menor em carcinomas de próstata (137 casos) quando comparada a hiperplasia benigna de próstata pareados por idade (137 casos) (KIM et al. 2015). Nesse estudo, baixos níveis de expressão de *MOB3B* estavam associados com características clínico-patológicas agressivas em pacientes com CaP, tais como, escore de Gleason ≥ 8 , maiores níveis de antígeno específico da próstata (PSA) e doenças metastáticas. Os resultados do estudo sugeriram que esse gene pode atuar como supressor de tumor em CaP.

Como um todo, os estudos sugerem que alguns genes (incluindo *MPPED2* e *FHL1*) exercem atividade supressora na tumorigênese tireoidiana e a expressão dos mesmos pode ser útil para melhor compreensão molecular de CPT. Além disso, outros genes (*DOK6*, *MOB3B*) foram

descritos em literatura como supressores tumorais em outros tipos de câncer (cancer de próstata, gástricos e de mama) podendo atuar da mesma forma no tecido folicular da tireoide.

Além destes genes acima citados, outros foram explorados em nosso estudo. O gene *STXBP5L*, o qual também apresentou diminuição de expressão em CPT, não é bem caracterizado nestes tumores. Contudo, LAN et al. (2015) analisaram a expressão de RNA longos não codificadores (lncRNAs) e mRNAs e encontraram *STXBP5L* com menor expressão em CPT comparado a TN, reforçando os nossos achados. Curiosamente, esse gene já foi reportado como hipometilado após *knockdown* de *BRAFV600E* nas linhagens de câncer de tireoide BCPAP e OCUT1 (HOU et al. 2016). De fato, encontramos esse gene como menos expressos em CPT, especialmente em tumores com mutação em *BRAF*, porém esse gene não foi revelado como potencialmente regulado por metilação em um estudo prévio do grupo (BELTRAMI et al. 2017).

A comparação das características moleculares com dados anatomopatológicas de pior prognóstico (estadiamento clínico IV, extensão extra-tireoidiana, variantes de células altas, acometimento linfonodal e mutação em *BRAF*) da casuística disponível no TCGA, revelou associações com a metilação e expressão do *MIR21* e *MIR146B*, assim como de genes alvos, (incluindo *STXBP5L*, *FHL1*, *FLRT1*, *MRO* e *MPPED2*). Muitos estudos em CPT evidenciaram a associação entre a expressão aumentada de miRNAs (tais como, miR-146b, miR-21, miR-221, miR-222, miR-203, miR-181b, miR-32, miR-199b) com parâmetros clínicos (invasão, migração e

proliferação celular, multicentricidade dos tumores, alto TNM, tamanho do tumor, invasão extra-tireoidiana, mutação em *BRAF*) (VISONI et al. 2007; LABBAYE et al. 2008; SHEU et al. 2010; GERALDO et al. 2012; LI et al. 2015). Por outro lado, alguns miRNAs (como o miR-1, miR-191, miR-486, miR-486, miR-451, miR-26a, miR-101) também foram descritos em CPT com diminuição de expressão e associação a metástases linfonodais (PALLANTE et al. 2010; LV et al. 2013; WANG et al. 2014). Em nosso grupo amostral investigado por RT-qPCR não foi possível identificar diferenças significativas. Entretanto, foi observada uma clara distinção no perfil de metilação e expressão dos miRNAs com o status de mutação em *BRAF*, assim como para dois genes alvos *FHL1* e *MRO*.

A mutação em *BRAF* foi verificada em 59% (60/102) dos casos sendo significativamente associada com maior expressão de hsa-miR-21-5p e hsa-miR-146b-5p. Em adição, esta mutação foi também associada com perda de metilação de DNA nos genes destes miRNAs, assim como os baixos níveis de expressão de *FHL1* e *MRO*. Alguns estudos demonstraram que a mutação *BRAFFV600E* está associada com características clínico-patológicas agressivas (HOWELL et al. 2013; FERNANDEZ et al. 2013; YANG et al. 2014); no entanto, o mesmo não foi observado em nossa casuística assim como em outros estudos (LI et al. 2013; DUTENHEFNER et al. 2013; BARBARO et al. 2014; DANILOVIC et al. 2014; BARROS-FILHO et al. 2015).

A associação entre a metilação global do DNA com a mutação em *BRAFFV600E* em CPT pode revelar um mecanismo de tumorigênese ainda

não bem compreendido. Para explorar essa relação, HOU et al. (2011) analisaram o metiloma em duas linhagens celulares de CPT (BCPAP e OCUT1) que passaram pelo processo de *knockdown* com shRNA (*Short Hairpin* RNA). Os autores descreveram 10 genes hipometilados e 59 hipermetilados em ambas as linhagens após o bloqueio de *BRAF*. Outros estudos (MANCIKOVA et al. 2013 e BELTRAMI et al. 2017) relataram uma hipometilação global nos tumores positivos para mutação em *BRAF*. Estes dados revelam que as células sofrem alterações no padrão de metilação causado pela pressão seletiva associada com a presença da mutação.

A associação entre o status da mutação *BRAFV600E* com a expressão de miRNAs em CPT foi previamente avaliada por HUANG et al. 2013. A taxa de mutação em *BRAFV600E* em CPT foi de 47,8%. Os autores identificaram dois miRNAs com expressão aumentada, entre eles, o miR-21, o qual foi associado a tumores positivos para mutação em *BRAF*, semelhante aos dados obtidos no nosso estudo.

Apesar da atenção em relação à descoberta de microRNAs regulados por metilação em diversos tipos tumorais, a maioria dos estudos foca na descoberta de microRNAs supressores tumorais silenciados por esse mecanismo epigenético (LUJAMBIO et al. 2008; TOLL et al. 2016; ZHANG et al. 2017c). Os experimentos realizados para comprovar a regulação direta por metilação desses genes, quando encontrados hipermetilados, envolve o tratamento de linhagens celulares com agentes desmetilantes, como a 5-aza-2'-deoxicitidina ou 5-azacitidina. Ambas são análogas de nucleosídeos e inibidoras da DNMT (SATO et al. 2017). No presente estudo, a análise

integrada revelou que a hipometilação dos genes *MIR21* e *MIR146B* são importantes eventos envolvidos na patologia do CPT. Apesar de apresentar hipometilação, o padrão basal de metilação dos CpGs encontrados para o gene *MIR146B* era alto, o que permitiu a realização dos experimentos com 5-aza-2'-deoxicitidina.

O tratamento das três linhagens celulares de CPT (TPC1, K1 e BCPAP) com o 5-Aza-dC (1 μ M e 3 μ M) foi realizado para examinar o papel direto da metilação na regulação do gene *MIR146B*. Os resultados sugeriram que o hsa-miR-146b-5p é um oncogene, com aumento de expressão devido à perda de metilação na sua região promotora.

Em literatura, os ensaios funcionais em CPT envolvendo os microRNAs aqui descritos são desenhados apenas para avaliar o seu papel no desenvolvimento e progressão tumoral. Para o nosso conhecimento, não há estudos em literatura que avaliaram o mecanismo responsável pela alteração da expressão dos miR-21 e miR-146b em CPT.

GERALDO et al. (2012) investigaram a modulação da via TGF- β pelo hsa-miR-146b-5p na tumorigênese da tireoide utilizando ensaios funcionais com linhagens celulares de CPT (BCPAP, TPC1) e a linhagem de células foliculares não tumoral PCCL3. Os autores relataram que a expressão aumentada do hsa-miR-146b-5p estava significativamente associada com o aumento da proliferação celular na ausência do hormônio estimulante da tireoide e conferia resistência à parada do ciclo celular mediada por TGF- β . Além disso, foi observado que a ativação de oncogenes *RET/PTC3* e *BRAF* em células PCCL3 aumentou a expressão do miRNA. Estes resultados

confirmaram o papel oncogênico do hsa-miR-146b-5p em células foliculares da tireoide.

Um estudo recente (LIMA et al. 2016) investigou o papel do hsa-miR-146b-5p sobre o comportamento migratório e invasivo afim de determinar a sua relação com características mais agressivas dos CT. Os ensaios foram realizados em três linhagens celulares de tireoide, uma linhagem folicular não tumoral (PCCL3) e duas linhagens de CPT (TPC1 e BCPAP) após expressão aumentada e inibição do hsa-miR-146b-5p pela transfecção de *mimics-miR* e *antagomiR*, respectivamente. Os resultados revelaram que o aumento de expressão do hsa-miR-146b-5p em PCCL3 aumentou a migração e a invasão dessas células, enquanto que o efeito oposto foi observado em TPC1 e BCPAP após a inibição desse miRNA. A inibição do hsa-miR-146b-5p em PCCL3 também inibiu a migração e invasão, enquanto que a expressão exógena aumentada desse miRNA nas células TPC1 e BCPAP aumentou ainda mais a migração e invasão. Esses resultados evidenciam o papel funcional do hsa-miR-146b-5p na oncogênese da glândula tireoide e o associa a agressividade e maior invasão em CPT.

O papel do miR-21 em CPT e seu mecanismo de regulação gênica em estudos funcionais com linhagens celulares foi avaliado por ZHANG et al. 2014. Os autores transfectaram uma linhagem celular de CPT (TPC1) com um plasmídeo específico (pEZX-eGFP-miRNA-21). O ensaio de Western Blot foi realizado para investigar a correlação do miR-21 com a expressão da proteína relacionada com morte celular programa (PDCD4) em TPC1. Os achados do estudo revelaram que a expressão aumentada do miR-21

aumentou significativamente a proliferação e invasão celular, além de inibir a apoptose das células TPC1. Foi observado uma correlação negativa entre *PDCD4* e a expressão do miR-21.

Em conclusão, os resultados revelados neste estudo confirmam achados importantes que corroboram com a literatura e também exploram mecanismos de regulação dos miRNAs por alterações epigenéticas em CPT. Em especial, foi demonstrado que a hipometilação do DNA e a expressão aumentada dos genes codificadores *MIR21* e *MIR146B*, levam a uma regulação indireta de seus transcritos alvos, os quais foram associados à mutação em *BRAF*.

7 CONCLUSÃO

- ✓ Foram identificados dois genes codificadores de microRNAs, *MIR21* (hsa-miR-21-5p) e *MIR146B* (hsa-miR-146b-5p), os quais apresentaram um padrão diferencial de metilação e expressão em carcinomas papilíferos de tireoide em relação ao tecido não neoplásico e às lesões benignas. Esses resultados foram obtidos por análises globais criteriosas de metilação e expressão de miRNAs, combinando dados internos e externos (TCGA). Os achados foram também confirmados em um conjunto independente de amostras utilizando técnicas de pirosequenciamento após conversão por bissulfito e RT-qPCR.
- ✓ Foi detectada hipometilação significativa dos CPT em relação ao TN e LBT e um aumento significativo da expressão de hsa-miR-21-5p e hsa-miR-146b-5p nas amostras tumorais em relação ao TN e LBT. Estes resultados indicam que alterações epigenéticas são reguladores da expressão destes microRNAs em CPT. Estes dados contribuem para o avanço do conhecimento da carcinogênese deste tipo tumoral.
- ✓ A expressão combinada de hsa-miR-21-5p e hsa-miR-146b-5p, permitiu diferenciar os CPT dos tecidos não malignos. O classificador diagnóstico usando esses miRNAs apresentou alta sensibilidade

(96%) e especificidade (99%) para distinguir os CPT de outras lesões da tireoide, sugerindo sua aplicabilidade na prática clínica.

- ✓ Sete genes alvos (*MPPED2*, *STXBP5L*, *MRO*, *FHL1*, *FLRT1*, *DOK6* e *MOB3B*) potencialmente regulados pelos miRNAs de acordo com banco de dados testados apresentaram baixa expressão em CPT quando comparados às lesões não malignas, exemplificando uma provável regulação indireta da metilação em uma complexa rede de controle transcricional.
- ✓ A mutação *BRAFV600E* foi significativamente associada com baixos níveis de metilação e aumento de expressão de *MIR21* e *MIR146B*, assim com menor expressão de alguns genes alvos (*FHL1* e *MRO*). Estes achados sugerem que este mecanismo de regulação está intimamente relacionado com a mutação em *BRAF* descrita nestes tumores.
- ✓ Ensaios funcionais utilizando a linhagem TPC1 deram evidências adicionais que o *MIR146B* é regulado por metilação, corroborando com os resultados encontrados em tecidos tumorais.
- ✓ Os achados deste estudo apontaram o *MIR21* e *MIR146B* como potenciais biomarcadores diagnósticos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. **Am J Surg Pathol** 2006; 30:216-22.

Agretti P, Ferrarini E, Rago T, et al. MicroRNA expression profile helps to distinguish benign nodules from papillary thyroid carcinomas starting from cells of fine-needle aspiration. **Eur J Endocrinol** 2012; 167:393-400.

Andrade MA, Bork P. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. **Nat Genet** 1995; 11:115-6.

Barbaro D, Incensati RM, Materazzi G, et al. The BRAF V600E mutation in papillary thyroid cancer with positive or suspected pre-surgical cytological finding is not associated with advanced stages or worse prognosis. **Endocrine** 2014; 45:462-8.

Barros-Filho MC, Marchi FA, Pinto CA, Rogatto SR, Kowalski LP. High diagnostic accuracy based on CLDN10, HMGA2, and LAMB3 transcripts in papillary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab** 2015; 100:E890-9.

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

Bazyka DA, Prysyazhnyuk AY, Fuzik MM, Fedorenko ZP. Thyroid Cancer and the Chernobyl Accident in Ukraine: Experience with the Implementation of a Follow-Up Programme. **Radiat Prot Dosimetry** 2016; 171:32-40.

Beltrami CM, Dos Reis MB, Barros-Filho MC, et al. Integrated data analysis reveals potential drivers and pathways disrupted by DNA methylation in papillary thyroid carcinomas. **Clin Epigenetics** 2017; 9:45.

Benjamin H, Schnitzer-Perlman T, Shtabsky A, et al. Analytical validity of a microRNA-based assay for diagnosing indeterminate thyroid FNA smears from routinely prepared cytology slides. **Cancer Cytopathol** 2016; 124:711-21.

Bose S, Walts AE. Thyroid fine needle aspirate: a post-Bethesda update. **Adv Anat Pathol** 2012; 19:160-9.

Braconi C, Huang N, Patel T. MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. **Hepatology** 2010; 51:881-90.

Brattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. **Cell** 2006; 125:1111-24.

Cabanillas ME, McFadden DG, Durante C. Thyroid cancer. **Lancet** 2016; 388:2783-95.

Carvalho G, Nozima BH, Cerutti JM. microRNA-106b-mediated down-regulation of C1orf24 expression induces apoptosis and suppresses invasion of thyroid cancer. **Oncotarget** 2015; 6:28357-70.

Cavedon E, Barollo S, Bertazza L, et al. Prognostic Impact of miR-224 and RAS mutations in medullary thyroid carcinoma. **Int J Endocrinol** 2017; 2017:4915736.

Chen J, Xu Y, Tao L, et al. MiRNA-26a Contributes to the Acquisition of Malignant Behaviors of Docetaxel-Resistant Lung Adenocarcinoma Cells through Targeting EZH2. **Cell Physiol Biochem** 2017; 41:583-97.

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

Chiou GY, Chien CS, Wang ML, et al. Epigenetic regulation of the miR142-3p/interleukin-6 circuit in glioblastoma. **Mol Cell** 2013; 52:693-706.

Choi SH, Worswick S, Byun HM, et al. Changes in DNA methylation of tandem DNA repeats are different from interspersed repeats in cancer. **Int J Cancer** 2009; 125:723-9.

Chou CK, Chen RF, Chou FF, et al. miR-146b is highly expressed in adult papillary thyroid carcinomas with high risk features including extrathyroidal invasion and the BRAF (V600E) mutation. **Thyroid** 2010; 20:489-94.

Chou CK, Liu RT, Kang HY. MicroRNA-146b: A novel biomarker and therapeutic target for human papillary thyroid cancer. **Int J Mol Sci** 2017; 18:E636.

Chou CK, Yang KD, Chou FF, et al. Prognostic implications of miR-146b expression and its functional role in papillary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab** 2013; 98:E196-205.

Cibas ES, Ali SZ. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. **Thyroid** 2009; 19:1159-65.

Cinegaglia NC, Andrade SC, Tokar T, et al. Integrative transcriptome analysis identifies deregulated microRNA-transcription factor networks in lung adenocarcinoma. **Oncotarget** 2016; 7:28920-34.

Cocozza S, Akhtar MM, Miele G, Monticelli A. CpG islands undermethylation in human genomic regions under selective pressure. **PLoS One** 2011; 6:e23156.

Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, et al. American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer, Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. **Thyroid** 2009; 19:1167-214.

Costa Prando E, Cavalli LR, Rainho CA. Evidence of epigenetic regulation of the tumor suppressor gene cluster flanking *RASSF1* in breast cancer cell lines. **Epigenetics** 2011; 6:1413-24.

Dai L, Wang Y, Chen L, Zheng J, Li J, Wu X. MiR-221, a potential prognostic biomarker for recurrence in papillary thyroid cancer. **World J Surg Oncol** 2017; 15:11.

Danilovic DL, Lima EU, Domingues RB, Brandao LG, Hoff AO, Marui S. Pre-operative role of BRAF in the guidance of the surgical approach and prognosis of differentiated thyroid carcinoma. **Eur J Endocrinol** 2014; 170:619-25.

Davies L, Welch HG. Current thyroid cancer trends in the United States. **JAMA Otolaryngol Head and Neck Surg** 2014; 140:317-22.

Dettmer M, Perren A, Moch H, Komminoth P, Nikiforov YE, Nikiforova MN. Comprehensive MicroRNA expression profiling identifies novel markers in follicular variant of papillary thyroid carcinoma. **Thyroid** 2013a; 23:1383-9.

Dettmer M, Voetseder A, Durso MB, et al. MicroRNA expression array identifies novel diagnostic markers for conventional and oncocytic follicular thyroid carcinomas. **J Clin Endocrinol Metab** 2013b; 98:E1-7.

Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. **Science** 2002; 295:1079-82.

Dos Reis MB. **Perfil de metilação do DNA em lesões**. Botucatu; 2015. [Tese de Doutorado-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho].

Dos Reis MB, Barros-Filho MC, Marchi FA, et al. Prognostic classifier based on genome-wide DNA methylation profiling in well-differentiated thyroid tumors. **J Clin Endocrinol Metabolism** 2017; August.

Duan J, Zhang H, Qu Y, et al. Onco-miR-130 promotes cell proliferation and migration by targeting TGF β R2 in gastric cancer. **Oncotarget** 2016; 7:44522-33.

Dutenhefner SE, Marui S, Santos AB, et al. BRAF: a tool in the decision to perform elective neck dissection? **Thyroid** 2013; 23:1541-6.

Elisei R, Pinchera A. Advances in the follow-up of differentiated or medullary thyroid cancer. **Nat Rev Endocrinol** 2012; 8:466-75.

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.

Faam B, Ghaffari MA, Ghadiri A, Azizi F. Epigenetic modifications in human thyroid cancer. **Biomed Rep** 2015; 3:3-8.

Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007; 104:15805-10.

Fagin JA, Wells SA Jr. Biologic and clinical perspectives on thyroid cancer. **N Engl J Med** 2016; 375:1054-67.

Fan CY, Lin CS, Chao HL, et al. Risk of hypothyroidism among patients with nasopharyngeal carcinoma treated with radiation therapy: a population-based cohort study. **Radiother Oncol** 2017; 123:394-400.

Fang H, Xie J, Zhang M, Zhao Z, Wan Y, Yao Y. miRNA-21 promotes proliferation and invasion of triple-negative breast cancer cells through targeting PTEN. **Am J Trans Res** 2017; 9:953-61.

Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. **Nature** 2007; 447:433-40.

Feinberg AP. The epigenetic basis of common human disease. **Trans Am Clin Climatol Assoc** 2013; 124:84-93.

Fernandez IJ, Piccin O, Sciascia S, et al. Clinical significance of BRAF mutation in thyroid papillary cancer. **Otolaryngol Head Neck Surg** 2013; 148:919-25.

Ferraz C, Eszlinger M, Paschke R. Current state and future perspective of molecular diagnosis of fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. **J Clin Endocrinol Metab** 2011; 96:2016-26.

Finn SP, Smyth P, Cahill S, et al. Expression microarray analysis of papillary thyroid carcinoma and benign thyroid tissue: emphasis on the follicular variant and potential markers of malignancy. **Virchows Archiv** 2007; 450:249-60.

Frates MC, Benson CB, Charboneau JW, et al. Society of Radiologists in Ultrasound. Management of thyroid nodules detected at US: Society of Radiologists in Ultrasound consensus conference statement. **Radiology** 2005; 237:794-800.

Frezzetti D, De Menna M, Zoppoli P, et al. Upregulation of miR-21 by Ras in vivo and its role in tumor growth. **Oncogene** 2011; 30:275-86.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Res** 2009; 19:92-105.

Fryknäs M, Wickenberg-Bolin U, Göransson H, et al. Molecular markers for discrimination of benign and malignant follicular thyroid tumors. **Tumor Biol** 2006; 27:211-20.

Fucic A, Aghajanyan A, Druzhinin V, Minina V, Neronova E. Follow-up studies on genome damage in children after Chernobyl nuclear power plant accident. **Arch Toxicol** 2016; 90:2147-59.

Geraldo MV, Yamashita AS, Kimura ET. MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF- β by repressing SMAD4 in thyroid cancer. **Oncogene** 2012; 31:1910-22.

Ghanem T, Bracken J, Kasem A, Jiang WG, Mokbel K. mRNA expression of DOK1-6 in human breast cancer. **World J Clin Oncol** 2014; 5:156-63.

Gomez-Rueda H, Palacios-Corona R, Gutiérrez-Hermosillo H, Trevino V. A robust biomarker of differential correlations improves the diagnosis of cytologically indeterminate thyroid cancers. **Int J Mol Med** 2016; 37:1355-62.

Gonçalves-Filho J, Kowalski LP. Postoperative complications of thyroidectomy for differentiated thyroid carcinoma. **Am J Otolaryngol** 2004; 25:225-30.

Gonçalves-Filho J, Kowalski LP. Surgical complications after thyroid surgery performed in a cancer hospital. **Otolaryngol Head Neck Surg** 2005; 132:490-4.

Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. **Nature** 2010; 466:835-40.

Guo Z, Hardin H, Montemayor-Garcia C, et al. In Situ Hybridization Analysis of miR-146b-5p and miR-21 in thyroid nodules: diagnostic implications. **Endocr Pathol** 2015; 26:157-63.

Haghpanah V, Fallah P, Tavakoli R, Naderi M, Samimi H, Soleimani M & Larijani B. Antisense-miR-21 enhances differentiation/apoptosis and reduces cancer stemness state on anaplastic thyroid cancer. **Tumour Biol** 2016; 37:1299-308.

Haines BP, Wheldon LM, Summerbell D, Heath JK, Rigby PW. Regulated expression of FLRT genes implies a functional role in the regulation of FGF signalling during mouse development. **Dev Biol** 2006; 297:14-25.

Hamid JS1, Hu P, Roslin NM, Ling V, Greenwood CM, Beyene J. Data integration in genetics and genomics: methods and challenges. **Hum Genomics Proteomics** 2009; 2009: 869093.

Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. **Thyroid** 2016; 26:1-133.

Horn S, Figl A, Rachakonda PS, et al. *TERT* promoter mutations in familial and sporadic melanoma. **Science** 2013; 339:959-61.

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.

Howell GM, Nikiforova MN, Carty SE, et al. BRAF V600E mutation independently predicts central compartment lymph node metastasis in patients with papillary thyroid cancer. **Ann Surg Oncol** 2013; 20:47-52.

Hu S, Ewertz M, Tufano RP, et al. Detection of serum deoxyribonucleic acid methylation markers: a novel diagnostic tool for thyroid cancer. **J Clin Endocrinol Metab** 2006; 91:98-104.

Hu Y, Wang H, Chen E, Xu Z, Chen B, Lu G. Candidate microRNAs as biomarkers of thyroid carcinoma: a systematic review, meta-analysis, and experimental validation. **Cancer Med** 2016; 5:2602-2614.

Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent *TERT* promoter mutations in human melanoma. **Science** 2013; 339:957-9.

Huang J, Wang Y, Guo Y, Sun S. Down-regulated microRNA-152 induces aberrant DNA methylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting DNA methyltransferase 1. **Hepatology** 2010; 52:60-70.

Huang Y, Liao D, Pan L, Ye R, Li X, Wang S, Ye C, Chen L. Expressions of miRNAs in papillary thyroid carcinoma and their associations with the BRAFV600E mutation. **Eur J Endocrinol** 2013; 168:675e681.

Hulf T, Sibbritt T, Wiklund ED, et al. Discovery pipeline for epigenetically deregulated miRNAs in cancer: integration of primary miRNA transcription. **BMC Genomics** 2011; 12:54.

Hummel R, Hussey DJ, Michael MZ, et al. MiRNAs and their association with locoregional staging and survival following surgery for esophageal carcinoma. **Ann Surg Oncol** 2011; 18:253-60.

Hutvágner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. **Science** 2001; 293:834-8.

Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. **Br J Cancer** 2006; 94:776-80.

Imamura T, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Depleted tumor suppressor miR-107 in plasma relates to tumor progression and is a novel therapeutic target in pancreatic cancer. **Sci Rep** 2017; 7:5708.

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

Iorio MV, Visone R, Di Leva G, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. **Cancer Res** 2007; 67:8699-707.

Ito Y, Nikiforov YE, Schlumberger M, Vigneri R. Increasing incidence of thyroid cancer: controversies explored. **Nat Rev Endocrinol** 2013; 9:178-84.

Jacques C, Guillotin D, Fontaine JF, et al. DNA microarray and miRNA analyses reinforce the classification of follicular thyroid tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 2013; 98:E981-9.

Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. **Mol Oncol** 2012; 6:590-610.

Jiang J, Yang P, Guo Z, et al. Overexpression of microRNA-21 strengthens stem cell-like characteristics in a hepatocellular carcinoma cell line. **World J Surg Oncol** 2016; 14:278.

Jin J, Phitayakorn R, Wilhelm SM, Mchenry CR. Advances in management of thyroid cancer. **Curr Probl Surg** 2013; 50:241-289.

Jin L, Chen E, Dong S, et al. *BRAF* and *TERT* promoter mutations in the aggressiveness of papillary thyroid carcinoma: a study of 653 patients. **Oncotarget** 2016; 7:18346-55.

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.

Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. **Clin Genet** 2012; 81:303-11.

Kanyilmaz G, Aktan M, Koc M, Demir H, Demir LS. Radiation-induced hypothyroidism in patients with breast cancer: a retrospective analysis of 243 cases. **Med Dosim** 2017; 42:190-6.

Kaplan EL, Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. **J Amer Statist Assoc** 1958; 53:457-81.

Kenigsberg S, Lima PD, Maghen L, et al. The elusive MAESTRO gene: Its human reproductive tissue-specific expression pattern. **PLoS One** 2017; 12:e0174873.

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.

Kilfoy BA, Grogan RH, Ward MH, Kaplan E, Devesa SS. Follicular thyroid cancer incidence patterns in the United States, 1980-2009. **Thyroid** 2013; 23:1015-21.

Kim SJ, Lee KE, Myong JP, et al. BRAF V600E mutation is associated with tumor aggressiveness in papillary thyroid cancer. **World J Surg** 2012; 36:310-7.

Kitano M, Rahbari R, Patterson EE, et al. Evaluation of candidate diagnostic microRNAs in thyroid fine-needle aspiration biopsy samples. **Thyroid** 2012; 22:285-91.

Kjaer-Frifeldt S, Hansen TF, Nielsen BS, et al. The prognostic importance of miR-21 in stage II colon cancer: a population-based study. **Br J Cancer** 2012; 107:1169-74.

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

Kunej T, Godnic I, Ferdin J, Horvat S, Dovc P, Calin GA Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature. **Mutat Res** 2011; 717:77-84.

Labbaye C, Spinello I, Quaranta MT, et al. A three-step pathway comprising PLZF/miR-146a/CXCR4 controls megakaryopoiesis. **Nat Cell Biol** 2008; 10:788-801.

Lan X, Zhang H, Wang Z, et al. Genome-wide analysis of long noncoding RNA expression profile in papillary thyroid carcinoma. **Gene** 2015; 569:109-17.

Lassalle S, Hofman V, Ilie M, et al. Can the microRNA signature distinguish between thyroid tumors of uncertain malignant potential and other well-differentiated tumors of the thyroid gland? **Endocr Relat Cancer** 2011; 18:579-94.

Lee HW, Park TI, Jang SY, et al. Clinicopathological characteristics of TERT promoter mutation and telomere length in hepatocellular carcinoma. **Medicine (Baltimore)** 2017; 96:e5766.

Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature** 2003; 425:415-9.

Leek JT, Johnson WE, Parker, HS. et al. The SVA package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. **Bioinformatics** 2012; 28:882-3.

Leong SH, Lwin KM, Lee SS, et al. Chromosomal breaks at FRA18C: association with reduced DOK6 expression, altered oncogenic signaling and increased gastric cancer survival. **Nat Precision Oncol** 2017.

Leung AK, Chow SM, Law SC. Clinical features and outcome of the tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. **Laryngoscope** 2008; 118:32-8.

Li C, Aragon Han P, Lee KC, et al. Does BRAF V600E mutation predict aggressive features in papillary thyroid cancer? Results from four endocrine surgery centers. **J Clin Endocrinol Metab** 2013; 98:3702-12.

Li C, Song L, Zhang Z, Bai X-X, Cui M-F, Ma L-J. MicroRNA-21 promotes TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer through up-regulating PTEN expression. **Oncotarget** 2016; 7:66989-67003.

Li P, Mao WM, Zheng ZG, et al. Down-regulation of PTEN expression modulated by dysregulated miR-21 contributes to the progression of esophageal cancer. **Dig Dis Sci** 2013; 58:3483-93.

Li T, Li RS, Li YH, et al. miR-21 as an independent biochemical recurrence predictor and potential therapeutic target for prostate cancer. **J Urol** 2012; 187:1466-72.

Li WB, Zhou J, Xu L, Su XL, Liu Q, Pang H. Identification of genes associated with papillary thyroid carcinoma (ptc) for diagnosis by integrated analysis. **Horm Metab Res** 2016; 48:226-31.

Lima CR, Geraldo MV, Fuziwara CS, Kimura ET, Santos MF. MiRNA-146b-5p upregulates migration and invasion of different papillary thyroid carcinoma cells. **BMC Cancer** 2016; 16:108.

Lima CR, Gomes CC, Santos MF. Role of microRNAs in endocrine cancer metastasis. **Mol Cell Endocrinol** 2017; Mar 18. [Epub ahead of print]

Lithwick-Yanai G, Dromi N, Shtabsky A, et al. Multicentre validation of a microRNA-based assay for diagnosing indeterminate thyroid nodules utilising fine needle aspirate smears. **J Clin Pathol** 2017; 70:500-7.

Liu C, Zhang S, Wang Q, Zhang X. Tumor suppressor miR-1 inhibits tumor growth and metastasis by simultaneously targeting multiple genes. **Oncotarget** 2017; 8:42043-60.

Liu R, Xing M. TERT promoter mutations in thyroid cancer. **Endocr Relat Cancer** 2016; 23:R143-55.

Liu X, Bishop J, Shan Y, et al. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. **Endocr Relat Cancer** 2013; 20:603-10.

Liu Y, Su L, Xiao H. Review of factors related to the thyroid cancer epidemic. **Int J Endocrinol** 2017; 2017:5308635.

Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis microRNA. **Science** 2002; 297:2053-6.

Lopez-Serra P, Esteller M. DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. **Oncogene** 2012; 31:1609-22.

Lu Y, Tang L, Zhang Q, Zhang Z, Wei W. MicroRNA-613 inhibits the progression of gastric cancer by targeting CDK9. **Artif Cells Nanomed Biotechnol** 2017; 1-5.

Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008; 105:13556-61.

Lupi C, Giannini R, Ugolini C, et al. Association of *BRAF* V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab** 2007; 92:4085-90.

Lv L, Zhou J, LIN C, et al. DNA methylation is involved in the aberrant expression of miR-133b in colorectal cancer cells. **Oncol Lett** 2015; 10:907-912.

Lv M, Zhang X, Li M, et al. miR-26a and its target CKS2 modulate cell growth and tumorigenesis of papillary thyroid carcinoma. **PLoS One** 2013; 8:e67591.

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

Majid S, Dar AA, Saini S, et al. miRNA-34b inhibits prostate cancer through demethylation, active chromatin modifications, and AKT pathways. **Clin Cancer Res** 2013; 19:73-84.

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.

Melo SA, Esteller M. Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. **FEBS Lett** 2011; 585:2087-99.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2016 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

Minna E, Romeo P, De Cecco L, et al. miR-199a-3p displays tumor suppressor functions in papillary thyroid carcinoma. **Oncotarget** 2014; 5:2513-28.

miRBase. **miRBase: the microRNA database**. Available from: <URL:<http://www.mirbase.org>>. [2017 12 jul].

miRWalk 2.0: **a comprehensive atlas of predicted and validated miRNA-target interactions**. Available from: <URL:<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>>. [2017 12 jul].

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods** 1983; 65:55-63.

Mulero-Navarro S, Esteller M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. **Crit Rev Oncol Hematol** 2008; 68:1-11.

[NCI]. National Cancer Institute. **SEER cancer statistics review, 1975–2010**. última atualização em 2015. Disponível em: <URL:http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/> [2017 12 jul].

Nadal E, Chen G, Gallegos M, et al. Epigenetic inactivation of microRNA-34b/c predicts poor disease-free survival in early-stage lung adenocarcinoma. **Clin Cancer Res** 2013; 19:6842-52.

Ng EKO, Tsang WP, Ng SSM, et al. MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer. **Br J Cancer** 2009; 101:699-706.

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

Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, et al. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. **J Clin Endocrinol Metab** 2009; 94:2092-98.

Nikiforov YE. Molecular analysis of thyroid tumors. **Mod Pathol** 2011; 24:S34-43.

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.

Oishi N, Kondo T, Ebina A, et al. Molecular alterations of coexisting thyroid papillary carcinoma and anaplastic carcinoma: identification of TERT mutation as an independent risk factor for transformation. **Mod Pathol** 2017. [Epub ahead of print]

Ostrowski ML, Merino MJ. Tall cell variant of papillary thyroid carcinoma: a reassessment and immunohistochemical study with comparison to the usual type of papillary carcinoma of the thyroid. **Am J Surg Pathol** 1996; 20:964-74.

Ota D, Mimori K, Yokobori T, et al. Identification of recurrence-related microRNAs in the bone marrow of breast cancer patients. **Int J Oncol** 2011; 38:955-62.

Pallante P, Visone R, Croce CM, Fusco A. Deregulation of microRNA expression in follicular-cell-derived human thyroid carcinomas. **Endocr Relat Cancer** 2010; 17:F91-104.

Pelttari H, Schalin-Jääntti C, Arola J, Löyttyniemi E, Knuutila S, Välimäki MJ. *BRAF* V600E mutation does not predict recurrence after long-term follow-up

in TNM stage I or II papillary thyroid carcinoma patients. **APMIS** 2012; 120:380-6.

Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. **Signal Trans Targeted Ther** 2016; 15005.

Peng Y, Li C, Luo DC, Ding JW, Zhang W, Pan G. Expression profile and clinical significance of microRNAs in papillary thyroid carcinoma. **Molecules** 2014; 19:11586-99.

Penna GC, Vaisman F, Vaisman M, Sobrinho-Simões M, Soares P. Molecular markers involved in tumorigenesis of thyroid carcinoma: focus on aggressive histotypes. **Cytogenet Genome Res** 2016; 150:194-207.

Pennelli G, Galuppini F, Barollo S, et al. The PDCD4/miR-21 pathway in medullary thyroid carcinoma. **Hum Pathol** 2015; 46:50e57.

Peto R, Peto J. Asymptotically efficient rank invariant test procedures (with Discussion). **J Royal Stat Soc Series A** 1972; 135:185-206.

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

Pilli T, Cantara S, Marzocchi C, et al. Diagnostic Value of Circulating microRNA-95 and -190 in the differential diagnosis of thyroid nodules: a validation study in 1000 consecutive patients. **Thyroid** 2017; 27:1053-7.

Pita JM, Banito A, Cavaco BM, Leite V. Gene expression profiling associated with the progression to poorly differentiated thyroid carcinomas. **Br J Cancer** 2009; 101:1782-91.

Qian H, Yang C, Yang Y. MicroRNA-26a inhibits the growth and invasiveness of malignant melanoma and directly targets on MITF gene. **Cell Death Discov** 2017; 3:17028.

Rahman M, Okada AR, Guan K, Tauchi-Nishi P. Metastatic neoplasms to the thyroid diagnosed by fine-needle aspiration/core needle biopsy: clinicopathologic and cytomorphologic correlation. **Cytojournal** 2017; 14:16.

Ren Q, Liang J, Wei J et al. Epithelial and stromal expression of miRNAs during prostate cancer progression. **Am J Transl Res** 2014; 6:329-39.

Ricarte-Filho JC, Fuziwara CS, Yamashita AS, Rezende E, Da Silva MJ, Kimura ET. Effects of let-7 microRNA on cell growth and differentiation of papillary thyroid. **Cancer Transl Oncol** 2009; 2:236-41.

Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P. Molecular biology of thyroid cancer initiation. **Clin Transl Oncol** 2007; 9:686-93.

Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Res** 2015; 43:e47.

Robertson KD. DNA methylation and human disease. **Nat Rev Genet** 2005; 6: 597-610.

Rodríguez-Rodero S, Delgado-Álvarez E, Fernández AF, Fernández-Morera JL, Menéndez-Torre E, Fraga MF. Epigenetic alterations in endocrine-related cancer. **Endocr Relat Cancer** 2014; 21:R319-30.

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.

Roman BR, Morris LG, Davies L. The thyroid cancer epidemic, 2017 perspective. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes** 2017 Jul 7. [Epub ahead of print]

Rossing M. Classification of follicular cell-derived thyroid cancer by global RNA profiling. **J Mol Endocrinol** 2013; 50:R39-51.

Saiselet M, Floor S, Tarabichi M, et al. Thyroid cancer cell lines: an overview. **Frontiers Endocrinol** 2012; 3:133.

Saito Y, Liang G, Egger G, et al. Specific activation of with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. **Cancer Cell** 2006; 9:435-43.

Sandoval J, Esteller M. Cancer epigenomics: beyond genomics. **Curr Opin Genet Dev** 2012; 22:50-5.

Sato T, Issa JJ, Kropf P. DNA hypomethylating drugs in cancer therapy. **Cold Spring Harb Perspect Med** 2017; 7.pii: a026948.

Sawan C, Vaissière T, Murr R, Herceg Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. **Mutat Res** 2008; 642:1-13.

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

Schalkwyk LC, Pidsley R, Wong CC, Lunnon K, Mill J, Schalkwyk LC. **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.

Schneider DF, Chen H. New developments in the diagnosis and treatment of thyroid cancer. **CA Cancer J Clin** 2013; 63:374-94.

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.

Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? **Cancer Metastasis Rev** 2009; 28:369-78.

Sherman SI, Brierley JD, Sperling M, et al. Prospective multicenter study of thyroid carcinoma treatment: initial analysis of staging and outcome. National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Registry Group. **Cancer** 1998; 83:1012-21.

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

Sheu SY, Grabellus F, Schwertheim S, Worm K, Broecker-Preuss M, Schmid KW. Differential miRNA expression profiles in variants of papillary thyroid carcinoma and encapsulated follicular thyroid tumours. **Br J Cancer** 2010; 102:376-82.

Sheu SY, Grabellus F, Schwertheim S, Worm K, Broecker-Preuss M, Schmid KW. Differential miRNA expression profiles in variants of papillary thyroid carcinoma and encapsulated follicular thyroid tumours. **Br J Cancer** 2010; 102:376-82.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2017; 67:7-30.

Smith L, Willan J, Warr N, et al. Maestro (Mro) gene is dispensable for normal sexual development and fertility in mice. **PLoS One** 2008; 3:e4091.

Sondermann A, Andreghetto FM, Moulatlet AC, et al. MiR-9 and miR-21 as prognostic biomarkers for recurrence in papillary thyroid cancer. **Clin Exp Metastasis** 2015; 32:521-30.

Steponaitiene R, Kupcinskas J, Langner C, et al. Link Epigenetic silencing of miR-137 is a frequent event in gastric carcinogenesis. **Mol Carcinog** 2016; 55:376-86.

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

Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. **Mol Oncol** 2012; 6:567-78.

Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Niinuma T, Kai M. Relationship between noncoding RNA dysregulation and epigenetic mechanisms in cancer. **Adv Exp Med Biol** 2016; 927:109-35.

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

Tanaka T, Arai M, Wu S, et al. Epigenetic silencing of microRNA-373 plays an important role in regulating cell proliferation in colon cancer. **Oncol Rep** 2011; 26:1329-35.

Tanaka T, Arai M, Wu S, Kanda T, Miyauchi H, Imazeki F, et al. Epigenetic silencing of microRNA-373 plays an important role in regulating cell proliferation in colon cancer. **Oncol Rep** 2011; 26:1329-35.

Tang G. siRNA and microRNA: an insight into RISCs. **Trends Biochem Sci** 2005; 30: 106-14.

Toll A, Salgado R, Espinet B, et al. MiR-204 silencing in intraepithelial to invasive cutaneous squamous cell carcinoma progression. **Mol Cancer** 2016; 15:53.

Trovisco V, Soares P, Preto A, Type and prevalence of *BRAF* mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness. **Virchows Arch** 2005; 446:589-95.

Viglietto G, De Marco C. Molecular biology of thyroid cancer. In: Diamanti-Kandarakis E, editos. **Contemporary aspects of endocrinology**. Croatia: InTech; 2011. p.189-234.

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

Visone R, Russo L, Pallante P, et al. MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. **Endocr Relat Cancer** 2007; 14:791-8.

Vrba L, Muñoz-Rodríguez JL, Stampfer MR, Futscher BW. miRNA gene promoters are frequent targets of aberrant DNA methylation in human breast cancer. **PLoS One** 2013; 8:e54398.

Wang C, Lu S, Jiang J, Jia X, Dong X, Bu P. Hsa-microRNA-101 suppresses migration and invasion by targeting Rac1 in thyroid cancer cells. **Oncol Lett** 2014; 8:1815-21.

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

Wang G, Wang L, Sun S, et al. Quantitative measurement of serum microRNA-21 expression in relation to breast cancer metastasis in Chinese female. **Ann Lab Med** 2015; 35:226-32.

Wang H, Wu J, Meng X, et al. MicroRNA-342 inhibits colorectal cancer cell proliferation and invasion by directly targeting DNA methyltransferase 1. **Carcinogenesis** 2011; 32:1033-42.

Wang R, Zhang Y, Tan J, et al. Analysis of radioiodine therapy and prognostic factors of differentiated thyroid cancer patients with pulmonary metastasis: an 8-year retrospective study. **Medicine (Baltimore)** 2017; 96:e6809.

Wang T, Xu H, Qi M, Tian X. miRNA dysregulation and the risk of metastasis and invasion in papillary thyroid cancer: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget** 2017.

Wang Y, Fu J, Jiang M, et al. MiR-410 is overexpressed in liver and colorectal tumors and enhances tumor cell growth by silencing FHL1 via a direct/indirect mechanism. **PLoS One** 2014; 9:e108708.

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

Wheldon LM, Haines BP, Rajappa R, Mason I, Rigby PW, Heath JK. Critical role of FLRT1 phosphorylation in the interdependent regulation of FLRT1 function and FGF receptor signaling. **PLoS One** 2010; 5:e10264.

White MG, Nagar S, Aschebrook-Kilfoy B, et al. Epigenetic alterations and canonical pathway disruption in papillary thyroid cancer: a genome-wide methylation analysis. **Ann Surg Oncol** 2016; 23:2302-9.

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

Wiseman SM, 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; 98:4072-79.

Wójcicka A, Kolanowska M, Jażdżewski K. Mechanisms in endocrinology: MicroRNA in diagnostics and therapy of thyroid cancer. **Eur J Endocrinol** 2016; 174:R89-98.

Wolter M, Werner T, Malzkorn B, Reifenberger G. Role of microRNAs located on chromosome Arm 10q in malignant gliomas. **Brain Pathol** 2016; 26:344-58.

Xia W, Chen Q, Wang J, et al. DNA methylation mediated silencing of microRNA-145 is a potential prognostic marker in patients with lung adenocarcinoma. **Sci Rep** 2015; 5:16901.

Xiang M, Birkbak NJ, Vafaizadeh V, et al. STAT3 induction of miR-146b forms a feedback loop to inhibit the NF-κB to IL-6 signaling axis and STAT3-driven cancer phenotypes. **Sci Signal** 2014; 7:ra11.

Xing M, Liu R, Liu X, et al. *BRAF* V600E and *TERT* promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence. **J Clin Oncol** 2014; 32:2718-26.

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

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

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

Yamashita S, Tsujino Y, Moriguchi K, Tatematsu M, Ushijima T. Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. **Cancer Sci** 2006; 97:64-71.

Yang CH, Pfeffer SR, Sims M, et al. The oncogenic microRNA-21 inhibits the tumor suppressive activity of FBXO11 to promote tumorigenesis. **J Biol Chem** 2015; 290:6037-46.

Yang Y, Chen C, Chen Z, et al. Prediction of central compartment lymph node metastasis in papillary thyroid microcarcinoma. **Clin Endocrinol** 2014 81:282-8.

Yang Z, Yuan Z, Fan Y, Deng X, Zheng Q. Integrated analyses of microRNA and mRNA expression profiles in aggressive papillary thyroid carcinoma. **Mol Med Rep** 2013; 8:1353-8.

Yip L, Kelly L, Shuai Y, Armstrong MJ, Nikiforov YE, Carty SE, Nikiforova MN. MicroRNA signature distinguishes the degree of aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. **Ann Surg Oncol** 2011; 18:2035-41.

Yoneyama K, Ishibashi O, Kawase R, Kurose K, Takeshita T. miR-200a, miR-200b and miR-429 are onco-miRs that target the PTEN gene in endometrioid endometrial carcinoma. **Anticancer Res** 2015; 35:1401-10.

Yoruker EE, Terzioğlu D, Teksoz S, Uslu FE, Gezer U, Dalay N. MicroRNA expression profiles in papillary thyroid carcinoma, benign thyroid nodules and healthy controls. **J Cancer** 2016; 7:803-9.

Yuan BZ, Jefferson AM, Popescu NC, Reynolds SH. Aberrant gene expression in human non small cell lung carcinoma cells exposed to demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. **Neoplasia** 2004; 6:412-9.

Zaravinos A, Radojicic J, Lambrou GI, et al. Expression of MiRNAs involved in angiogenesis, tumor cell proliferation, tumor suppressor inhibition, epithelial-mesenchymal transition and activation of metastasis in bladder cancer. **J Urol** 2012; 188:615-23.

Zhang J, Yang Y, Liu Y, et al. MicroRNA-21 regulates biological behaviors in papillary thyroid carcinoma by targeting programmed cell death 4. **J Surg** 2014; 189, 68e74.

Zhang JK, Li YS, Zhang CD, Dai DQ. Up-regulation of CRKL by microRNA-335 methylation is associated with poor prognosis in gastric cancer. **Cancer Cell Int** 2017b; 16;17:28.

Zhang L, Yan DL, Yang F, et al. DNA methylation mediated silencing of microRNA-874 is a promising diagnosis and prognostic marker in breast cancer. **Oncotarget** 2017c; 8:45496-505.

Zhang Y, Xu D, Pan J, et al. Dynamic monitoring of circulating microRNAs as a predictive biomarker for the diagnosis and recurrence of papillary thyroid carcinoma. **Oncol Lett** 2017; 13:4252-66.

Zhang Y, Yan LX, Wu QN, et al. miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast cancer. **Cancer Res** 2011; 71:3552-62.

Zhao Y, Liu X, Zhong L, et al. The combined use of microRNAs and mRNAs as biomarkers for the diagnosis of papillary thyroid carcinoma. **Int J Mol Med** 2015; 36:1097-103.

Anexo 1 - Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



A.C. Camargo
Cancer Center

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

APROVAÇÃO

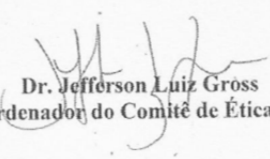
O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em 06/05/2016, aprovou “*ad referendum*” a realização do projeto nº 2138/15 intitulado: “**Genes codificadores de microRNAs regulados por metilação em carcinoma papilífero de tireóide**”.

Pesquisador responsável: Dra. Silvia Regina Rogatto
Aluna: Isabella Maria Dias Payão Ortiz. (Mestrado)

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 06 de maio de 2016.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 2 - mRNAs diferencialmente expressos (TCGA) e interações entre miRNAs e mRNAs associados com dados clínicos-patológicos (dados externos - TCGA).

Esse arquivo foi compartilhado via dropbox e pode ser acessado pelo link <https://www.dropbox.com/s/4i77va2thbagu80/Anexo%20%20viadropbox.Ink?dl=0>

Anexo 3 - Transcritos alvos de miRNAs selecionados para a validação por RT-qPCR usando o banco de dados do TCGA.

Gene	Banco de dados	hsa-miR-146b-5p		hsa-miR-21-5p		Clínico- Patológico
		r	P	r	P	
MPPED2	<i>miRWalk, RNAhybrid</i>	-0,70	3,65E-75	-0,64	1,03E-58	N1; Tall; ETE; <i>BRAF</i>
STXBP5L	<i>miRWalk, RNAhybrid, Targetscan</i>	-0,62	3,26E-55	-0,62	2,28E-54	EC4; N1; Tall; ETE; <i>BRAF</i>
MRO	<i>miRWalk, RNAhybrid, Targetscan</i>	-0,65	8,95E-63	-	-	N1; ETE; <i>BRAF</i>
FHL1	<i>miRanda, RNAhybrid, Targetscan</i>	-0,59	1,63E-48	-	-	EC4; N1; Tall; ETE; <i>BRAF</i>
FLRT1	<i>miRWalk, RNAhybrid</i>	-0,74	9,48E-90	-	-	EC4; N1; Tall; ETE; <i>BRAF</i>
DOK6	<i>miRWalk, miRanda, RNAhybrid, Targetscan</i>	-0,70	3,65E-75	-0,38	3,09E-19	<i>BRAF</i>
MOB3B	<i>miRWalk, RNAhybrid, Targetscan</i>	-0,49	7,05E-32	-	-	-

Legenda: r: coeficiente de correlação de Pearson; P: valor de P do teste de correlação de Pearson; N1: acometimento linfonodal; EC4: estadiamento clínico IV; ETE: extensão extratireoidiana; Tall: variante de células altas.

Anexo 4 - Funções biológicas dos transcritos alvos validados por RT-qPCR.

Genes	Função Biológica
<i>MPPED2</i>	Inibição do ciclo celular e indução da apoptose.
<i>FHL1</i>	Regula negativamente o ciclo celular (G2/M). Atua na supressão tumoral.
<i>STXBP5L</i>	Codifica a proteína de ligação syntaxina 5. Pode inibir a exocitose em células neurosecretórias e pode regular negativamente a secreção de insulina.
<i>MRO</i>	Atua na determinação do sexo de mamíferos.
<i>FLRT1</i>	Codifica proteínas transmembrânicas ricas em fibronectina e leucina. Potencial papel na adesão e sinalização celular.
<i>DOK6</i>	Membro da família de adaptadores intracelulares DOK que desempenham um papel na cascata de sinalização do oncogene RET.
<i>MOB3B</i>	A proteína codificada por esse gene é essencial para a duplicação do corpo do fuso, além do controle e regulação celular na mitose.

Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene

Apêndice 1 - Identificação de 67 microRNAs diferencialmente expressos ao comparar CPT com TN pelo banco de dados do TCGA.

miRNA	miRBase ID	P-valor	FDR	FC
hsa-miR-873-5p	MIMAT0004953	< 1e-07	< 1e-07	-5,01
hsa-miR-4732-3p	MIMAT0019856	< 1e-07	< 1e-07	-4,50
hsa-miR-144-3p	MIMAT0000436	< 1e-07	< 1e-07	-4,18
hsa-miR-144-5p	MIMAT0004600	< 1e-07	< 1e-07	-4,00
hsa-miR-486-5p	MIMAT0002177	< 1e-07	< 1e-07	-3,77
hsa-miR-451a	MIMAT0001631	< 1e-07	< 1e-07	-3,67
hsa-miR-1247-5p	MIMAT0005899	< 1e-07	< 1e-07	-3,62
hsa-miR-1179	MIMAT0005824	< 1e-07	< 1e-07	-3,40
hsa-miR-7-2-3p	MIMAT0004554	< 1e-07	< 1e-07	-3,34
hsa-miR-486-3p	MIMAT0004762	< 1e-07	< 1e-07	-3,25
hsa-miR-550a-3p	MIMAT0003257	< 1e-07	< 1e-07	-3,24
hsa-miR-214-3p	MIMAT0000271	< 1e-07	< 1e-07	-3,20
hsa-miR-199b-5p	MIMAT0000263	< 1e-07	< 1e-07	-3,17
hsa-miR-138-1-3p	MIMAT0004607	< 1e-07	< 1e-07	-3,10
hsa-miR-345-3p	MIMAT0022698	< 1e-07	< 1e-07	-3,02
hsa-miR-363-3p	MIMAT0000707	< 1e-07	< 1e-07	-3,02
hsa-miR-675-3p	MIMAT0006790	< 1e-07	< 1e-07	-2,86
hsa-miR-20b-5p	MIMAT0001413	< 1e-07	< 1e-07	-2,81
hsa-miR-204-5p	MIMAT0000265	< 1e-07	< 1e-07	-2,74
hsa-miR-9-5p	MIMAT0000441	< 1e-07	< 1e-07	-2,68
hsa-miR-204-3p	MIMAT0022693	< 1e-07	< 1e-07	-2,67
hsa-miR-138-5p	MIMAT0000430	< 1e-07	< 1e-07	-2,67
hsa-miR-7-5p	MIMAT0000252	< 1e-07	< 1e-07	-2,64
hsa-miR-27a-5p	MIMAT0004501	< 1e-07	< 1e-07	-2,60
hsa-miR-1275	MIMAT0005929	< 1e-07	< 1e-07	-2,55
hsa-miR-942-5p	MIMAT0004985	< 1e-07	< 1e-07	-2,46
hsa-miR-1247-3p	MIMAT0022721	< 1e-07	< 1e-07	-2,45
hsa-miR-18a-5p	MIMAT0000072	< 1e-07	< 1e-07	-2,41
hsa-miR-23b-5p	MIMAT0004587	< 1e-07	< 1e-07	-2,32
hsa-miR-195-5p	MIMAT0000461	< 1e-07	< 1e-07	-2,30
hsa-miR-3130-5p	MIMAT0014995	< 1e-07	< 1e-07	-2,29
hsa-miR-3074-5p	MIMAT0019208	< 1e-07	< 1e-07	-2,22
hsa-miR-193b-3p	MIMAT0002819	< 1e-07	< 1e-07	-2,22
hsa-miR-154-5p	MIMAT0000452	< 1e-07	< 1e-07	-2,21
hsa-miR-411-5p	MIMAT0003329	< 1e-07	< 1e-07	-2,20
hsa-miR-153-3p	MIMAT0000439	< 1e-07	< 1e-07	-2,18
hsa-miR-6820-3p	MIMAT0027541	< 1e-07	< 1e-07	-2,18
hsa-miR-150-3p	MIMAT0004610	< 1e-07	< 1e-07	-2,18
hsa-miR-153-5p	MIMAT0026480	< 1e-07	< 1e-07	-2,16
hsa-miR-16-2-3p	MIMAT0004518	< 1e-07	< 1e-07	-2,13
hsa-miR-708-5p	MIMAT0004926	< 1e-07	< 1e-07	-2,13
hsa-miR-150-5p	MIMAT0000451	< 1e-07	< 1e-07	-2,09
hsa-miR-652-3p	MIMAT0003322	< 1e-07	< 1e-07	-2,09
hsa-miR-193a-3p	MIMAT0000459	< 1e-07	< 1e-07	-2,09
hsa-miR-106a-5p	MIMAT0000103	< 1e-07	< 1e-07	-2,07
hsa-miR-6720-3p	MIMAT0025851	< 1e-07	< 1e-07	-2,06
hsa-miR-199b-3p	MIMAT0004563	< 1e-07	< 1e-07	-2,03
hsa-miR-181a-2-3p	MIMAT0004558	< 1e-07	< 1e-07	2,03
hsa-miR-181b-5p	MIMAT0000257	< 1e-07	< 1e-07	2,03
hsa-miR-6842-3p	MIMAT0027587	< 1e-07	< 1e-07	2,15
hsa-miR-222-5p	MIMAT0004569	< 1e-07	< 1e-07	2,50

Cont/Apêndice 1

miRNA	miRBase ID	P-valor	FDR	FC
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	< 1e-07	< 1e-07	2,54
hsa-miR-508-3p	MIMAT0002880	< 1e-07	< 1e-07	2,73
hsa-miR-34a-5p	MIMAT0000255	< 1e-07	< 1e-07	3,08
hsa-miR-514a-3p	MIMAT0002883	< 1e-07	< 1e-07	3,08
hsa-miR-509-3p	MIMAT0002881	< 1e-07	< 1e-07	3,31
hsa-miR-31-5p	MIMAT0000089	< 1e-07	< 1e-07	4,33
hsa-miR-375	MIMAT0000728	< 1e-07	< 1e-07	4,82
hsa-miR-31-3p	MIMAT0004504	< 1e-07	< 1e-07	4,94
hsa-miR-221-5p	MIMAT0004568	< 1e-07	< 1e-07	5,08
hsa-miR-4709-3p	MIMAT0019812	< 1e-07	< 1e-07	5,85
hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	< 1e-07	< 1e-07	5,97
hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	< 1e-07	< 1e-07	6,53
hsa-miR-187-3p	MIMAT0000262	< 1e-07	< 1e-07	7,24
hsa-miR-551b-3p	MIMAT0003233	< 1e-07	< 1e-07	18,66
hsa-miR-146b-5p	MIMAT0002809	< 1e-07	< 1e-07	23,01
hsa-miR-146b-3p	MIMAT0004766	< 1e-07	< 1e-07	33,32

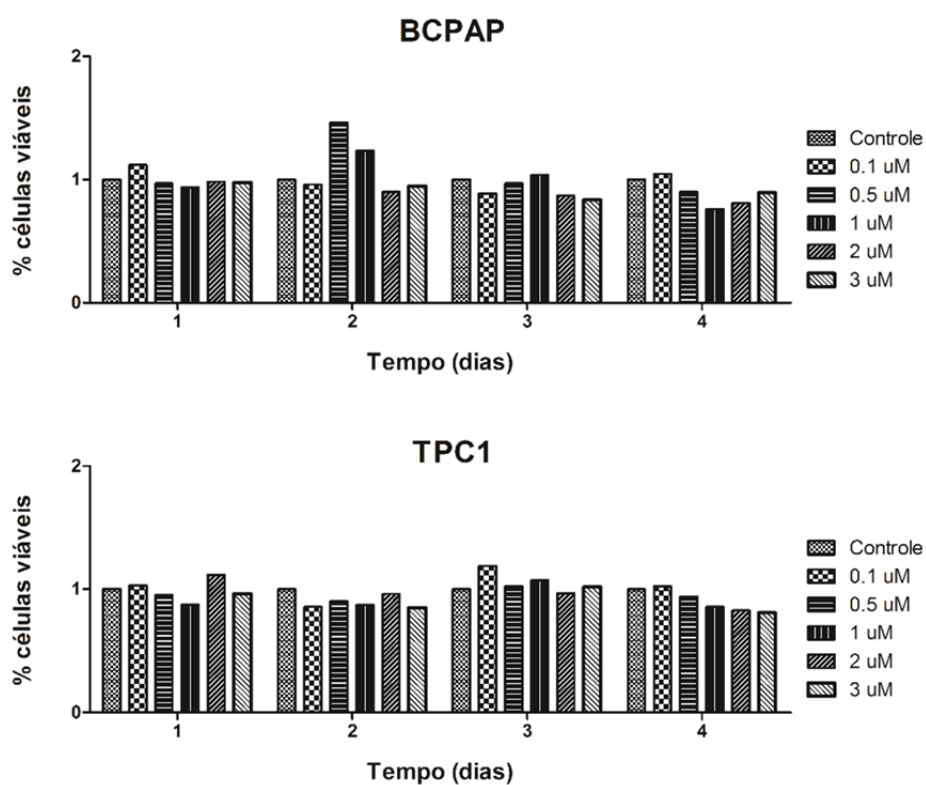
Legenda: P: valor de P; FDR: *false discovery ratio*.

Apêndice 2 - Top 10 vias canônicas significativas ($P < 0,05$) enriquecidas pelos transcritos alvos de hsa-miR-146b (5p e 3p) e hsa-miR-21-5p (112, 82 e 60 vias $p < 0,05$, respectivamente) identificadas pelo KOBAS (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/home.do>).

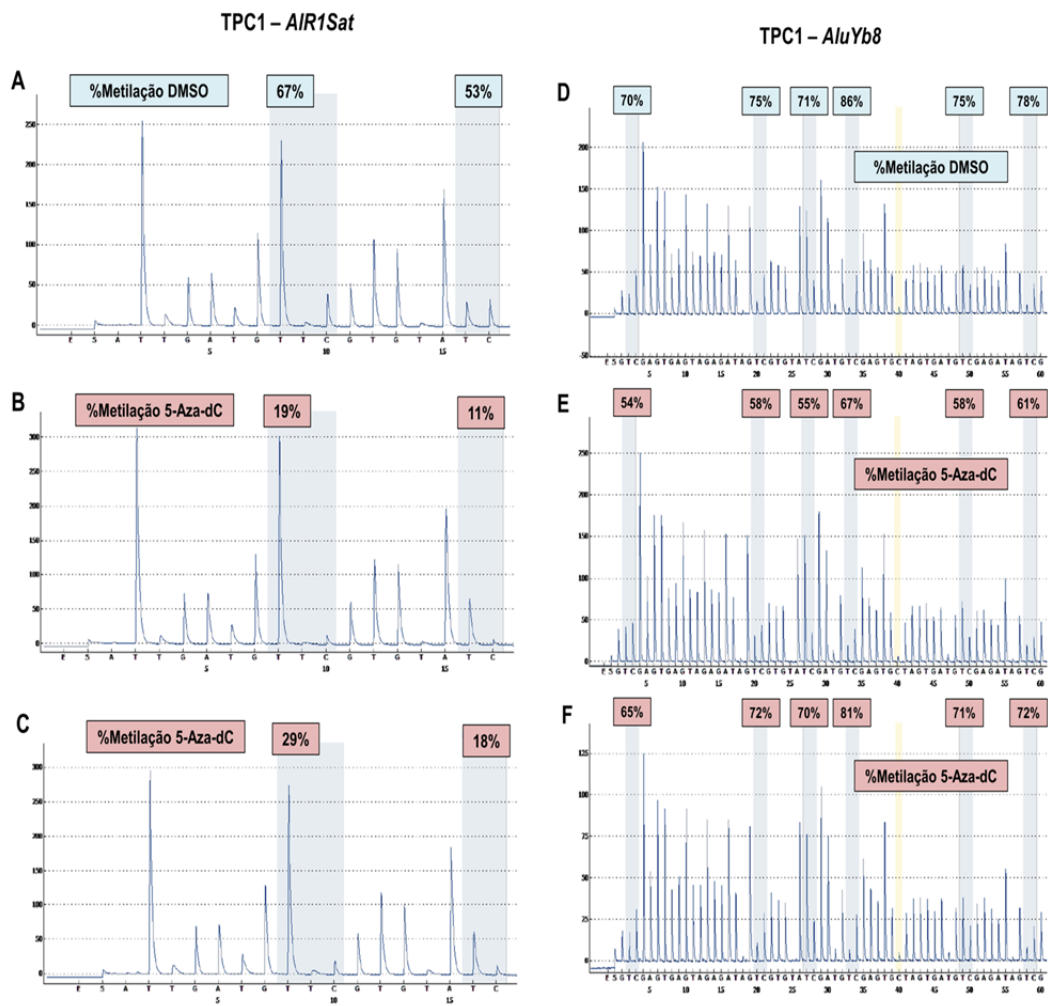
hsa-miR-146b-3p		hsa-miR-146b-5p		hsa-miR-21-5p	
Vias Biológicas	P	Vias Biológicas	P	Vias Biológicas	P
Transporte transmembranar de pequenas moléculas	0,0002	Resistência à insulina	0,0001	Interações LIG-ADAM	0,0008
Transdução de sinal	0,0004	Via de sinalização de hormônios tireoidianos	0,0002	Sistema neuronal	0,0021
Sinapse GABAérgica	0,0007	Sistema imune inato	0,0004	Via de sinalização AGE-RAGE em complicações diabéticas	0,0026
Dependência em morfina	0,0008	Transporte transmembranar de pequenas moléculas	0,0004	Resistência a insulina	0,0032
Transportadores orgânicos de ânions	0,0008	Orientação do axon	0,0005	Apoptose - espécies múltiplas	0,0038
Liberação de neurotransmissor na fenda sináptica	0,0010	Permutador de ânion multifuncional	0,0006	Contração do músculo liso vascular	0,0042
Canais de potássio fechados por tensão	0,0010	Biologia do desenvolvimento	0,0008	Via de sinalização de esfingolípido	0,0043
Canais de potássio	0,0010	Sistema imune	0,0008	Sinalização por Rho GTPases	0,0050
Transporte de cátions/ânions inorgânicos e aminoácidos/oligopeptídeos	0,0011	Transporte de cátions/ânions inorgânicos e aminoácidos/oligopeptídeos	0,0009	Via de sinalização FoxO	0,0056
Sinalização endocanabinoide retrógrada	0,0011	Liberação de neurotransmissor na fenda sináptica	0,0009	Apoptose	0,0063

Legenda: P: teste hipergeométrico. *LIG-ADAM*: Glioma rico em leucina inativado-desintegrina e metaloproteinase. *GABAérgica*: Ácido gama-aminobutírico. *AGE-RAGE*: Produtos finais de glicosilação avançada-Receptor transmembrana. *FoxO*: Fatores de transcrição (da família *foxhead box*).

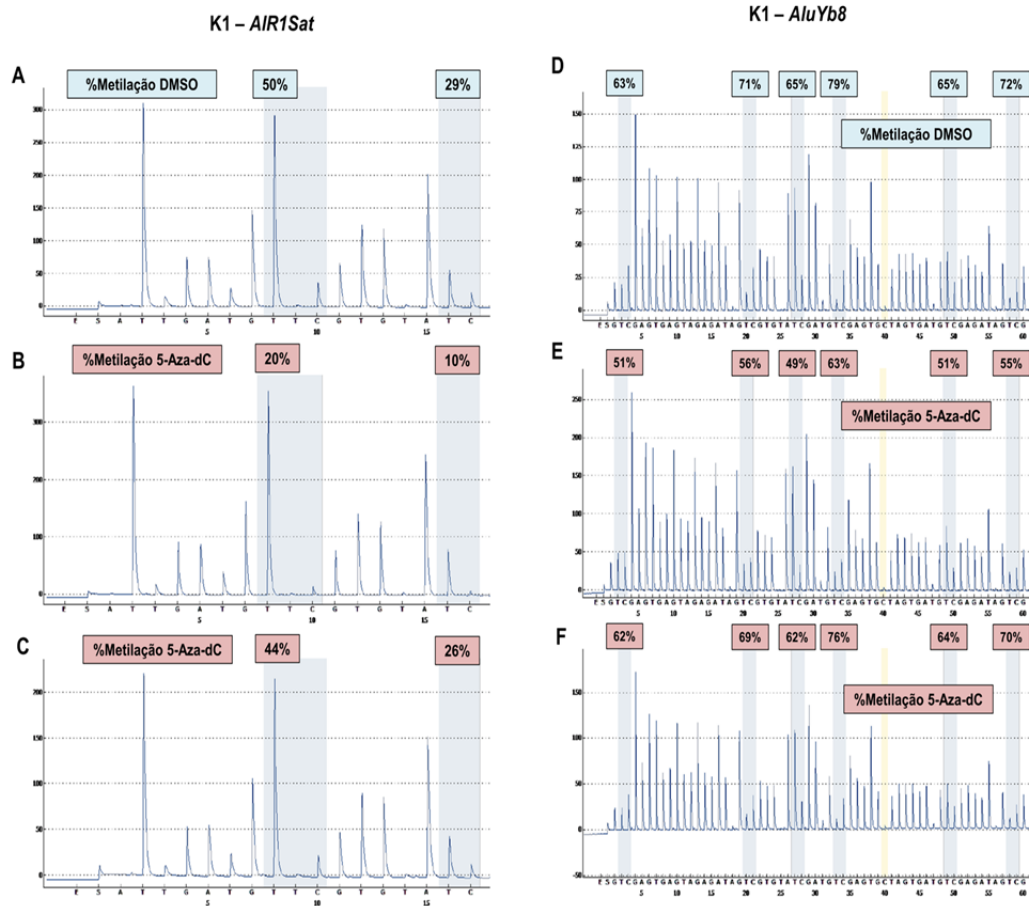
Apêndice 3 - Porcentagem de células das linhagens BCPAP e TPC1 originadas de carcinomas papilíferos de tireoide viáveis no teste de viabilidade celular (MTT). O grupo controle representa 100% de células viáveis. A viabilidade celular foi avaliada após o tratamento com diferentes concentrações de 5-Aza-dC (0,1 μ M – 3 μ M). Não foi observada diferença estatística significativa entre as diferentes concentrações.



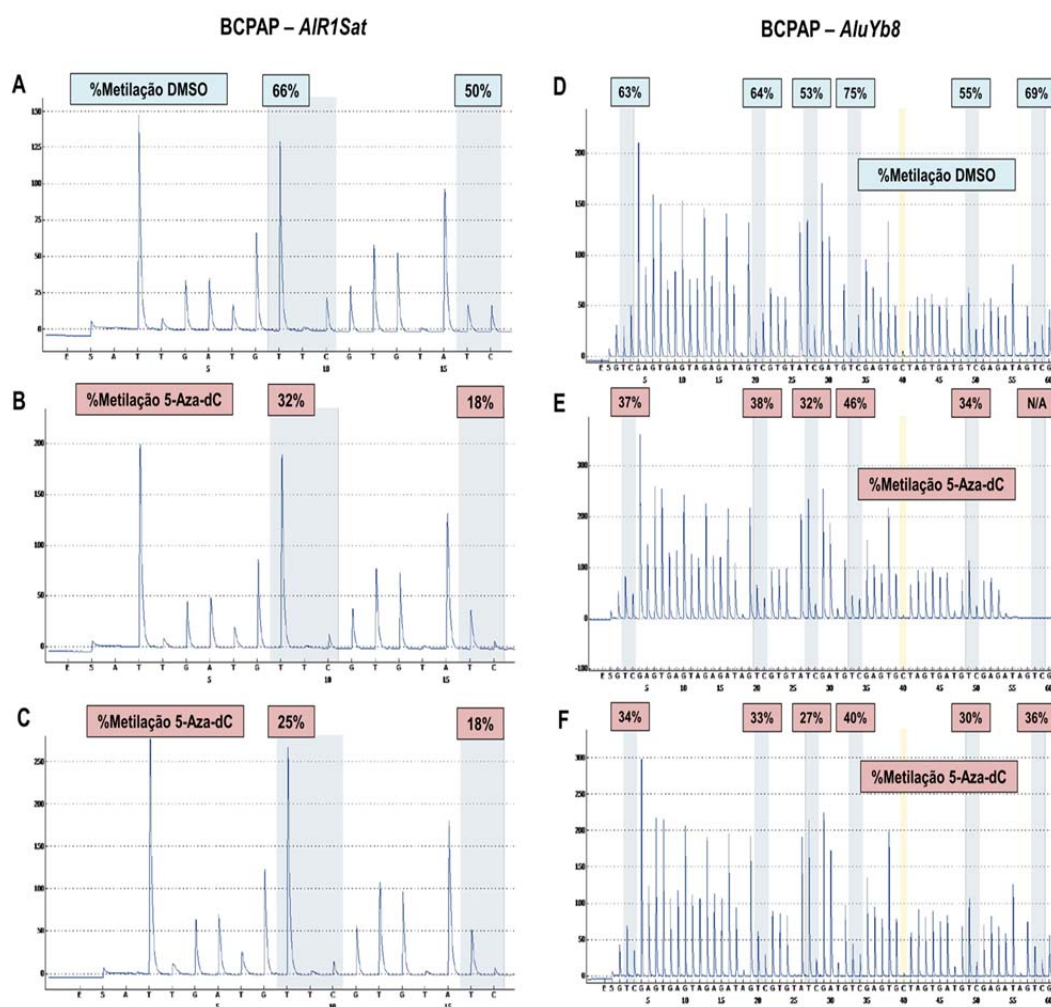
Apêndice 4 - Figura suplementar 4.1. Pirograma representativo dos ensaios de desmetilação das regiões *AIR1Sat* (a esquerda) e *AluYb8* (a direita) na linhagem TPC1. **A.D.** Linhagem TPC1 tratada com DMSO. **B.E.** Linhagem TPC1 tratada com 1 μ M 5-Aza-dC. **C.F.** Linhagem TPC1 tratada com 3 μ M 5-Aza-dC. Os números realçados nos retângulos em vermelho (tratamento com DMSO) e azul (5-Aza-dC) indicam a porcentagem de metilação. Foram analisados dois dinucleotídeos CpG para *AIR1Sat* e cinco dinucleotídeos CpG (lista transversal cinza) com um controle de conversão de bissulfito (lista transversal amarela) para *AluYb8*.



Apêndice 4 - Figura suplementar 4.2. Pirograma representativo dos ensaios de desmetilação das regiões *AIR1Sat* (a esquerda) e *AluYb8* (a direita) na linhagem K1 originada de carcinoma papilífero de tireoide. **A.D.** Linhagem K1 tratada com DMSO. **B.E.** Linhagem K1 tratada com 1 μ M 5-Aza-dC. **C.F.** Linhagem K1 tratada com 3 μ M 5-Aza-dC. Os números realçados nos retângulos em vermelho (tratamento com DMSO) e azul (5-Aza-dC) indicam a porcentagem de metilação. Foram analisados dois dinucleotídeos CpG para *AIR1Sat* e cinco dinucleotídeos CpG (lista transversal cinza) com um controle de conversão de bissulfito (lista transversal amarela) para *AluYb8*.



Apêndice 4 - Figura suplementar 4.3. Pirograma representativo dos ensaios de desmetilação das regiões *AIR1Sat* (a esquerda) e *AluYb8* (a direita) na linhagem BCPAP. **A.D.** Linhagem BCPAP tratada com DMSO. **B.E.** Linhagem BCPAP tratada com 1 μ M 5-Aza-dC. **C.F.** Linhagem BCPAP tratada com 3 μ M 5-Aza-dC. Os números realçados nos retângulos em vermelho (tratamento com DMSO) e azul (5-Aza-dC) indicam a porcentagem de metilação. Foram analisados dois dinucleotídeos CpG para *AIR1Sat* e cinco dinucleotídeos CpG (lista transversal cinza) com um controle de conversão de bissulfito (lista transversal amarela) para *AluYb8*.



Apêndice 5 - Análise de expressão global de miRNAs

Este experimento foi realizado para confirmar a expressão global de miRNAs após a desmetilação pelo tratamento com 5-Aza-dC. Para tanto, foi utilizada a plataforma *Whole Human microRNA Microarray System AgilentG3_microRNA 8x60K* (Agilent Technologies). Essa plataforma é composta por 1872 sequências de miRNAs baseadas no banco de dados do *miRBase (Release 19.0)* e dois miRNAs *Spike-In* (p/n 5190-1934) usados como controles positivos (<http://www.genomics.agilent.com>).

Detalhamento Metodológico

Os procedimentos de marcação das amostras, hibridação e detecção seguiram o protocolo *one-color microarray-based miRNAs expression analysis (Agilent Technologies)*. Os procedimentos de desfosforilação, desnaturação, ligação, hibridação e detecção seguiram o protocolo recomendado pelo fornecedor, utilizando o kit *miRNA complete labeling and Hyb (Agilent Technologies)*, os tampões de lavagem *Gene Expression Wash Buffer (Agilent Technologies)* e os controles internos *Agilent's miRNAs Spike-In (Agilent Technologies)*.

A primeira etapa consistiu no processo de defosforilação, na qual foram utilizados 100ng de RNA por amostra, na concentração de 50ng/μL, diluídas em 2μL de água DEPC. Foram adicionados ao RNA, 2μL do *Master Mix Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)*, contendo 0,4μL de Tampão 10X, 1,1μL de *Labeling Spike-In* e 0,5μL de *Calf Intestinal Phosphatase*. Em seguida, as

amostras foram incubadas a 37°C por 30 min. Após este período, foi realizado o processo de desnaturação, pela adição de 2,8µL de DMSO 100% e aquecimento a 100°C por 7 min. Imediatamente após essa fase, as amostras foram colocadas em gelo para a manutenção do estado desnaturado. A fase de ligação iniciou-se com a adição de 4,5µL do *Master Mix* T4 RNA Ligase. Essa mistura de reação é composta de 1µL de Tampão 10X, 3µL de Cianina 3-pCp e 0,5µL de T4 RNA Ligase (Incorporação da cianina 3-pCp na fração 3' UTR do miRNA usando a enzima T4 RNA ligase, com uma eficiência de 90% a cada miRNA presente na amostra). As amostras foram então incubadas a 16°C por 2 horas sem exposição à luz. Após a secagem a vácuo a 55°C durante aproximadamente 3 horas, as amostras foram preparadas para a hibridação. Foram acrescentadas às amostras, 17µL de água livre de nucleases e adicionado 1,0µL da solução *Hyb Spike-In* (terceira diluição), 4,5µL de 10X GE *Blocking Agent* e 22,5µL de 2X *Hi-RPM Hybridization Buffer* num total de 45µL e incubadas a 100°C por 5 minutos e imediatamente transferidas para o gelo por mais 5 minutos. Após breve centrifugação, 45µL de cada amostra foi aplicado a cada *gride* da lâmina. As lâminas contendo oito *grides* foram transferidas para o forno de hibridação por 20 horas a 55°C a 20 rpm. Após a hibridação, as lâminas foram lavadas e escaneadas. A lavagem consistiu de banhos consecutivos em soluções de *Wash Buffer* 1 por 5 min e *Wash Buffer* 2 por 5 min a 37°C. A captura das imagens foi realizada no *Microarray Scanner System* (Agilent Technologies), utilizando-se o *Scan Control Software* 9.X. A extração e a normalização dos dados foram realizadas usando o *Software Feature Extraction* v.10.7.3

(*Agilent Technologies*). Os dados extraídos foram analisados pelo *software* BRB *array tools* e os gráficos foram gerados pelo *software* *GeneSpring GX* (*Agilent Technologies*).

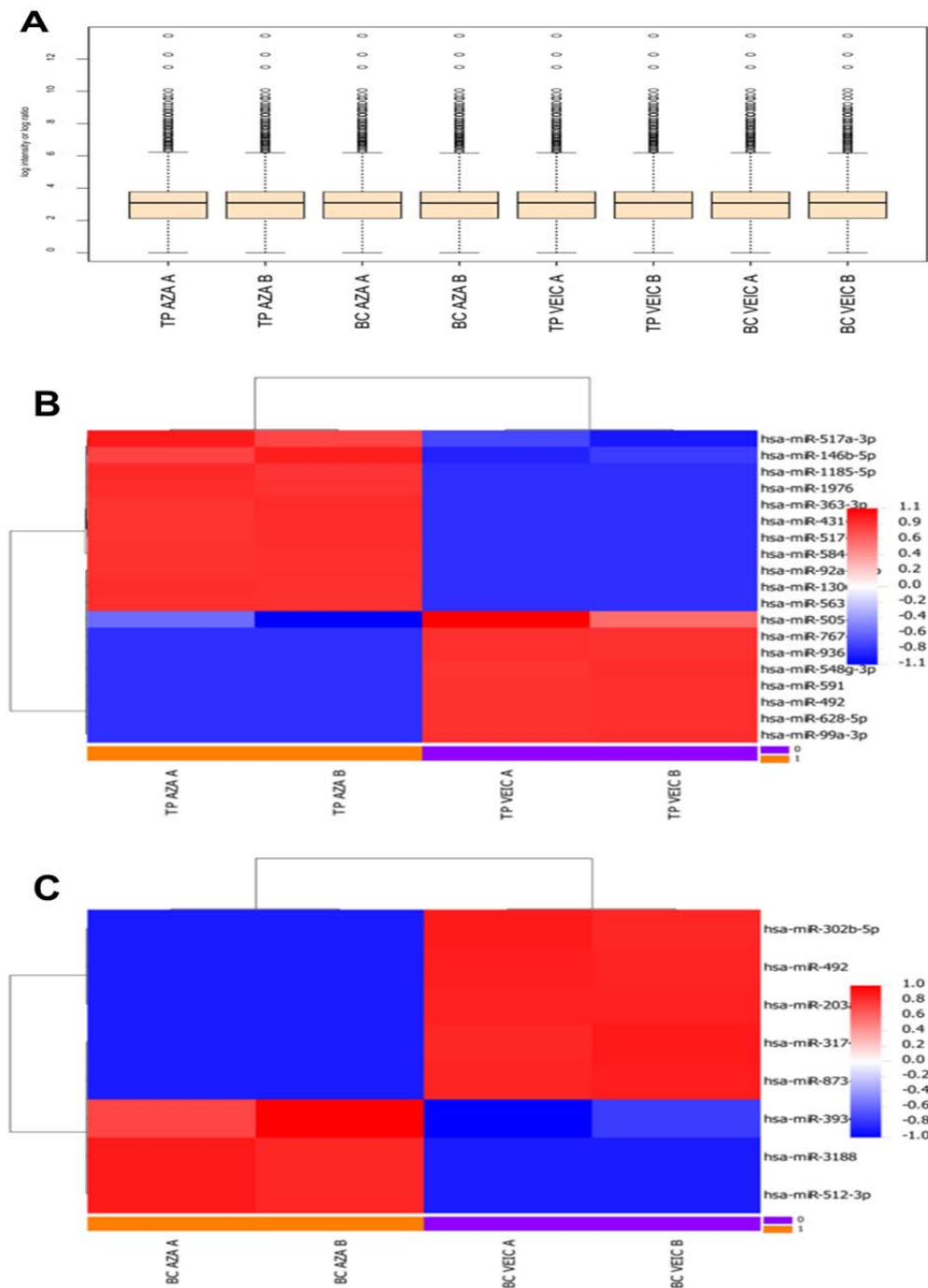
Os sinais de intensidade foram normalizados com o método de *Quantile* (Figura suplementar 5-1A). Posteriormente, os grupos de tratamento com 5-Aza-dC foram comparados (teste t pareado $P < 0.01$ e $FC > 2$) com o veículo (DMSO), utilizando duas réplicas (duas placas com tratamento independentes) para cada uma das linhagens celulares (TPC1 e BCPAP).

Resultados Obtidos

A análise de agrupamento hierárquico supervisionado (distância Euclidiana e ligação completa) revelou dois *clusters* definidos pelo tratamento e réplicas biológicas (Figura suplementar 5-1 B-C).

A comparação entre as amostras antes e após o tratamento revelou 19 microRNAs diferencialmente expressos na linhagem TPC1 (8 com aumento de expressão após o tratamento) e oito microRNAs na linhagem BCPAP (5 com aumento de expressão após o tratamento) (Tabela suplementar 5-1). O hsa-miR-146b-5p foi identificado como alterado. O hsa-miR-21-5p não foi identificado com expressão alterada após o tratamento com 5-Aza-dC, o que pode ser explicado pelo fato de este ser um gene hipometilado e o tratamento com um agente desmetilante poderia não causar um grande impacto no seu status de metilação.

Cont/ Apêndice 5 - Figura suplementar 5.1. Dados de expressão global de microRNAs. **A.** Sinais de intensidade após normalização por *quantile*. **B e C.** Cluster representando o agrupamento supervisionado das linhagens TPC1 (**B**) e BCPAP (**C**) em duplicatas, tratadas com 5-Aza-2'-deoxicitidina e seus respectivos controles com DMSO. **Legenda:** TP (Linhagem TPC1). BC (Linhagem BCPAP). AZA (Tratamento com 5-Aza-2'-deoxicitidina). VEIC (Controle com DMSO).



Cont/ Apêndice 5 - Tabela suplementa 5.1. miRNAs diferencialmente expressos após o tratamento com 5-Aza-2'-deoxicitidina nas linhagens celulares BCPAP e TPC1 derivadas de carcinomas papilíferos de tireoide comparadas com células não tratadas.

Linhagem	microRNA	P valor	FDR	FC
TPC1	<i>hsa-miR-1185-5p</i>	0,009	0,239	10,6
	<i>hsa-miR-23b-3p</i>	0,009	0,239	9,1
	<i>hsa-miR-519b-3p</i>	0,009	0,239	8,8
	<i>hsa-miR-146b-5p</i>	0,008	0,232	8,6
	<i>hsa-miR-363-3p</i>	0,007	0,207	8,5
	<i>hsa-miR-1976</i>	0,006	0,2	8,3
	<i>hsa-miR-431-3p</i>	0,005	0,174	8,3
	<i>hsa-miR-517-5p</i>	0,005	0,171	2,3
	<i>hsa-miR-503-5p</i>	0,003	0,126	-3,1
	<i>hsa-miR-563</i>	0,002	0,126	-3,4
	<i>hsa-miR-492</i>	0,002	0,125	-6,3
	<i>hsa-miR-505-5p</i>	0,002	0,125	-6,7
	<i>hsa-miR-99a-3p</i>	0,002	0,125	-7,7
	<i>hsa-miR-628-5p</i>	0,002	0,125	-8,3
	<i>hsa-miR-584-5p</i>	0,001	0,125	-9,1
	<i>hsa-miR-936</i>	0,001	0,125	-10
	<i>hsa-miR-92a-1-5p</i>	0,001	0,125	-10,4
	<i>hsa-miR-29a-3p</i>	<1e-07	<1e-07	-11,8
	<i>hsa-miR-767-5p</i>	0,001	0,125	-11
BCPAP	<i>hsa-miR-873-5p</i>	0,005	0,462	11,4
	<i>hsa-miR-3174</i>	0,008	0,462	11,2
	<i>hsa-miR-302b-5p</i>	0,01	0,462	10,5
	<i>hsa-miR-203a-3p</i>	0,001	0,366	9,4
	<i>hsa-miR-492</i>	0,007	0,462	7,7
	<i>hsa-miR-3188</i>	0,009	0,462	-8,3
	<i>hsa-miR-3934-5p</i>	0,008	0,462	-10
	<i>hsa-miR-512-3p</i>	0,008	0,462	-11,2

Legenda: FDR: *false discovery ratio*; FC: *fold change*. Em negrito, encontra-se o hsa-miR-146b-5p inicialmente selecionado para análises mais detalhadas.