

Juliana Carvalho Santos

ESTUDO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DE *MGMT* E  
*MLH1*, INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES E AS  
MUTAÇÕES BRAFV600E, RET/PTC E IDH1 EM  
PACIENTES COM CARCINOMA DE TIREOIDE

Bragança Paulista, SP

2012

Juliana Carvalho Santos

ESTUDO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DE *MGMT* E  
*MLH1*, INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES E AS  
MUTAÇÕES BRAFV600E, RET/PTC E IDH1 EM  
PACIENTES COM CARCINOMA DE TIREOIDE

ORIENTADOR

PROF. DR. MARCELO LIMA RIBEIRO

Dissertação apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação *Stricto Sensu*  
em Ciências da Saúde da  
Universidade São Francisco para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências da Saúde.

Bragança Paulista, SP

2012

ii

WK 270 Santos, Juliana Carvalho.  
S235e Estudo do padrão de metilação de MGMT e MLH1,  
instabilidade de microssatélites e as mutações BRAFV600E,  
RET/PTC e IDH1 em pacientes com carcinoma de tireoide /  
Juliana Carvalho Santos. -- Bragança Paulista, 2012.  
80 p.


Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação  
*Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São  
Francisco.

Orientação de: Marcelo Lima Ribeiro.

1. Carcinoma de tireoide. 2. Sistema de reparo do DNA.  
3. Metilação. 4. Instabilidade de microssatélites. I. Ribeiro,  
Marcelo Lima. II. Título.

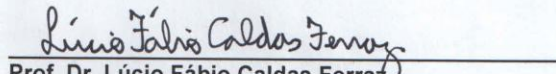
Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de  
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

SANTOS, Juliana Carvalho. "Estudo do padrão de metilação de MGMT e MLH1, instabilidade de microssatélites e as mutações BRAFV600E, RET/PTC e IDH1 em pacientes com carcinoma de tireóide". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em dezessete de Fevereiro de 2012 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



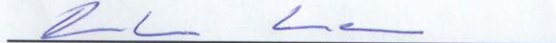
---

Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro- Orientador e Presidente  
Universidade São Francisco



---

Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz  
Universidade São Francisco



---

Profa. Renata de Lima  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por me abençoar, iluminar e guiar em cada etapa desta jornada.

A minha mãe Fátima e meu padrasto Luiz, pelo incentivo, exemplo e educação que permitiu que eu pudesse chegar até aqui. Vocês me deram toda a base e me fizeram tornar a pessoa que sou hoje, me ensinando a fazer as melhores escolhas.

Ao professor Dr. Marcelo L. Ribeiro pela excelente orientação, pelos imensuráveis ensinamentos, tanto acadêmicos quanto de vida. Você me mostra a cada dia como é encantador o desvendar da ciência e como isso transforma nossas vidas. Tenho muito orgulho de te ter como orientador, como companheiro de cada etapa desta caminhada. Você é meu exemplo. Espero poder te proporcionar todo orgulho que sinto de você. Obrigada por fazer parte da minha vida e por me fazer encontrar a plenitude da felicidade e do amor.

Sem vocês eu não conseguiria.

A professora Dra. Janete Cerutti por todo apoio e fornecimento das amostras biológicas utilizadas neste estudo.

Ao André U. Bastos, pelo desenvolvimento das análises dos perfis mutacionais, expressão gênica e pertinentes sugestões dadas a este trabalho.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos os professores que contribuíram na minha formação.

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar.

Obrigada. Sem vocês este trabalho não seria possível.

*“As sequências de DNA são os evangelhos que documentam a vida, e aprendemos a decifrá-las”*

*Richard Dawkins*

## RESUMO

O carcinoma de tireoide é o mais comum do sistema endócrino e sua incidência tem aumentado muito rapidamente nos últimos anos. Existem os tipos papilífero, medular, anaplásico, folicular e adenoma de tireoide, sendo que o carcinoma de tireoide papilífero (PTC) é o mais recorrente. A via da MAP quinase é uma clássica via de sinalização intracelular que desempenha um papel fundamental na proliferação celular, diferenciação, apoptose e sobrevivência e, quando erroneamente ativada, tumorigênese. Mutações nos genes BRAF V600E e RET/PTC são as maiores causas do aumento da ativação desta via. A mutação BRAF V600E é a alteração genética mais conhecida no carcinoma de tireoide e acontece, em sua maioria, no PTC. Similarmente, existem evidências demonstrando que a mutação RET/PTC tem um papel predominante no desenvolvimento de PTC. A hipermetilação de alguns genes de reparo ao DNA, como *MLH1* e *MGMT* levando à instabilidade de microssatélites (MSI) é um forte fator associado ao surgimento dessas mutações. A MSI representa uma forma de instabilidade genômica associada com sistema de reparo do DNA defeituoso em tumores, que vem sendo muito estudada no processo de carcinogênese de tireoide. Além disso, recentemente a mutação IDH1 tem sido encontrada em diversos subtipos histológicos de tumores na tireoide, tendo um importante papel no controle celular de dano oxidativo e apresentando uma forte associação com a hipermetilação de *MGMT* em glioblastomas. Visto isso, este estudo avaliou a associação das mutações BRAF V600E, RET/PTC e IDH1 nos mecanismos de reparo ao DNA, como o padrão de metilação dos genes *MLH1* e *MGMT* e sua correlação com instabilidade de microssatélites em pacientes com carcinoma de tireoide. Os resultados obtidos neste estudo indicam que os genes *MGMT* e *MLH1* estavam alterados em PTC e FTC (carcinoma de tireoide folicular), assim como apresentaram um menor nível de expressão. A mutação BRAF V600E não foi associada com a metilação de *MLH1*, porém menores níveis na expressão deste gene foram encontrados em amostras mutantes BRAF V600E, assim como na presença de MSI, sugerindo uma possível falha no sistema de reparo ao DNA. Similarmente, a metilação do gene *MGMT* foi associado

com a MSI em amostras PTC e FTC. Além disso, o presente trabalho pôde caracterizar marcadores de microssatélites que melhor caracterizassem o perfil de MSI no desenvolvimento do carcinoma de tireoide. Houve também uma repressão significativa na expressão de *MGMT* e *MLH1* em amostras instáveis oriundas de FTC, sugerindo uma associação entre a MSI e a malignização do tumor. Desta forma, sugere-se que há uma falha no sistema de reparo ao DNA envolvida na iniciação da MSI, o que poderia favorecer o acúmulo de mutações e assim, promover a tumorigênese da tireoide.

**Palavras-chave:** Carcinoma de Tireoide, Sistema de Reparo ao DNA, Metilação, Instabilidade de Microssatélites.



## ABSTRACT

Thyroid carcinoma is the most common of the endocrine system and its incidence has increased very rapidly in recent years. There are the types papilliferum, medullary, follicular, and adenoma of thyroid, being that the papilliferum thyroid carcinoma (PTC) is the most recurring. The MAP kinase is a classic intracellular signaling pathway that plays a key role in cell proliferation, differentiation, apoptosis and survival and, when mistakenly activated, tumorigenesis. The BRAF V600E and RET/PTC mutations are the major causes of increased activation of this pathway. The BRAF genetic mutation is the most known amendment on thyroid carcinoma and happens mostly in PTC. Similarly, there is evidence demonstrating that the RET/PTC mutation has a predominant role in the development of PTC. The hypermethylation of some repair genes, as *MLH1* and *MGMT* leading to microsatellite instability (MSI) may favor the emergence these mutations. The MSI represents a form of genomic instability associated with defective DNA repair system in tumors, characterized by expansions or contractions of a sequence in the DNA, which has been much studied in the process of carcinogenesis of thyroid. Moreover, recently the IDH1 mutation has been found in several histological subtypes of thyroid tumors, having an important role in controlling cellular oxidative damage and showing a strong association with the hypermethylation of *MGMT* in glioblastomas. Therefore, this study evaluated the influence of BRAF V600E, RET/PTC and IDH1 mutations on repair mechanisms of DNA, such as the pattern of methylation of genes *MLH1* and *MGMT* and its correlation with MSI in patients with thyroid carcinoma. The results of this study indicate that *MGMT* and *MLH1* genes were altered in PTC and FTC (follicular thyroid carcinoma) as well as a lower level of expression. The BRAF V600E mutation was not associated with *MLH1* methylation, but lower levels in the expression of this gene were found in BRAF mutant samples, as well as the presence of MSI, suggesting a possible fault in the DNA repair system. Similarly, the methylation of the *MGMT* gene was associated with MSI in PTC and FTC samples. In addition, this work could characterize microsatellite markers to better characterize the MSI status in the development of thyroid carcinoma. There was also a significant repression in the

*MGMT* and *MLH1* expression in unstable samples derived from the FTC, suggesting an association between MSI and tumor malignancy. Thus, it is suggested that there is a faulty in the DNA repair system involved in the initiation of MSI, which could favor the accumulation of mutations and thereby promote thyroid tumorigenesis.

**Key words:** Thyroid cancer, Repair system, Methylation, Microsatellite instability.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APE/Ref1 – endonuclease apurínico/apiridímico fator efetor redutor 1

ATC – Câncer anaplásico da tireoide

ATM – Ataxia telangiectasia mutado

ATP – Trifosfato de adenosina

ATR – ATM-Rad3-relacionado

BER – Reparo por excisão de base

BRAF – mutação no tipo B-Raf quinase

CEA – Antígeno carcinoembriológico

CgA – Cromogranina A

Chk2 – Checkpoint quinase 2

CpG – Citosina e Guanina separado por um fosfato

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNA-PK – proteína quinase DNA dependente

DNMT – DNA metiltransferase

DSBR - Reparo de quebra de fita dupla

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ERCC2 – Excision repair *cross-complementing 2*

FTC – Câncer folicular da tireoide

FVPTC – Variante folicular de câncer de tireoide papilífero

GTP – Guanosina trifosfato

HIF1-a – Fator de hipoxia induzível 1, subunidade a

HR – Recombinação homóloga

IDH1 – Isocitrato desidrogenase 1

MAPK – Proteína quinase ativadora Mitogênica

MBP – Proteínas ligadoras de metil-CpG

MDM2 - murine double minute 2

*MGMT* - O6 metilguanina DNA metiltransferase

*MLH1* – Homólogo 1 mutL  
MLH3 - Homólogo 3 mutL  
MMR – Reparo por erro de pareamento  
MSH2 – Homólogo 2 mutS  
MSH3 - Homólogo 3 mutS  
MSH6 - Homólogo 6 mutS  
MSI – Instabilidade de microsatélite  
MTC – Câncer medular da tireoide  
NADP+ - *2-oxoaldehyde dehydrogenase*  
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase  
NER - Reparo por excisão de nucleotídeo  
NHANES – Saúde Nacional e Examinação da Nutrição  
NHEJ – Recombinação não-homóloga  
PCR – Reação em Cadeia Polimerase  
PI3K – Fosfatidilinositol 3 quinase  
PI3K – fosfatidilinositol-3-quinase  
PMS1 - Segregação pós meiótica aumentada 1  
PMS2 - Segregação pós meiótica aumentada 2  
PP2A – Proteína fosfatase 2A  
PTC – Câncer papilífero da tireoide  
PTTG – *Human pituitary tumor transforming*  
RAS – Rat Sarcoma  
RET – Rearranjo durante a transfecção  
SAM – S adenosil metionina  
T3 – Triiodotironina  
T4 – Tiroxina  
TGB – Globulina fixadora de tiroxina  
TREs – Elementos reguladores tireoideos  
TSH – Hormônio hipofisário tireotrófico  
UNIFAG – Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia

XRCC – *X-ray cross-complementing group*

$\alpha$ -KG – alfa cetogluturato

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes do sistema de reparo ao DNA envolvidos em câncer de tireoide

Tabela 2 – Primers utilizados para análise de metilação

Tabela 3 – Primers utilizados para análise de MSI

Tabela 4 – Primers utilizados para análise de expressão gênica

Tabela 5 – Padrão de metilação de *MGMT* e *MLH1*

Tabela 6 – Padrão de expressão de *MGMT* e *MLH1* em amostras metiladas ou não metiladas

Tabela 7 - Frequência de metilação de *MGMT* e *MLH1* por mutação e subtipo histológico.

Tabela 8 - Mutações e padrão de metilação em relação às expressões relativas dos genes *MGMT* e *MLH1*.

Tabela 9 - Frequência de instabilidade por marcador

Tabela 10 - Relação entre mutações e MSI por subtipo histológico

Tabela 11 - Padrão de metilação de *MGMT* e *MLH1* e status de MSI combinados

Tabela 12 – Expressão de *MGMT* e *MLH1* nas amostras MSI e MSS

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via de sinalização MAPK

Figura 2 – Mecanismos de reparo ao DNA e associação com câncer de tireoide

Figura 3 – Metilação aberrante levando ao silenciamento da expressão gênica

Figura 4 – Representação das diferenças na temperatura de melting obtidas por HRM

Figura 5 – Gel de poliacrilamida ilustrando análise de MSI

Figura 6 – Frequência das mutações no grupo PTC

Figura 7 - Curvas de *melting* mostrando diferenças no padrão de metilação de *MGMT* e *MLH1*

Figura 8 - Diferenças nas curvas de *melting* obtidas por HRM para validação do padrão de MSI.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 CARCINOMA DA TIREOIDE	1
1.1.1 – Carcinogênese	1
1.1.2 – Carcinoma Papilífero da Tireoide	3
1.1.3 – Carcinoma Folicular da Tireoide	6
1.1.4 – Carcinoma Medular da Tireoide	7
1.1.5 – Carcinoma anaplásico da tireoide	8
1.2 MUTAÇÃO BRAF V600E	9
1.3 MUTAÇÃO RET/PTC	10
1.4 MUTAÇÃO IDH1	12
1.5 SISTEMA DE REPARO AO DNA	13
1.6 METILAÇÃO DO DNA	21
1.7 INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES	25
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>29</b>
3.1 CASUÍSTICA	29
3.2 ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO	30
3.2.1 Extração de DNA e Tratamento com Bissulfito de Sódio	30
3.2.2 High Resolution Melting (HRM)	31
3.3 INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES	33
3.4 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA	35
3.5 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO POR PCR EM TEMPO REAL	36
3.6 ANÁLISE DOS DADOS	37
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>38</b>
4.1 ANÁLISE DO PERFIL MUTACIONAL DE BRAF V600E, RET/PTC E IDH1	38
4.2 PADRÃO DE METILAÇÃO E EXPRESSÃO DE MGMT E MLH1	39
4.3 ANÁLISE DO PERFIL DE MSI	43
4.4 CORRELAÇÃO ENTRE METILAÇÃO EM MGMT E MLH1 E MSI	46
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>53</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>54</b>
<b>8. ANEXO</b>	<b>67</b>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Carcinoma da tireoide

### 1.1.1 – Carcinogênese

A carcinogênese é um processo que envolve múltiplas etapas distintas, tais como iniciação, promoção e progressão. Os mecanismos moleculares envolvendo cada uma destas fases incluem danos ao DNA, aumento na proliferação celular, morte celular deficiente, e instabilidade genética, respectivamente (Fuks, 2005).

O carcinoma de tireoide é o mais comum do sistema endócrino correspondendo a 1,3% dos casos de câncer no Brasil e 3% dos casos de câncer que atingem o sexo feminino nos EUA (INCA). A incidência deste câncer vem aumentando desde 1980, com uma acentuada aceleração de 2,4% ao ano em 1980-1997 para 6,5% ao ano no período de 1997-2006 (Ward *et al.*, 2010). Além disso, dados do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) apontam que 20 milhões de pessoas nos Estados Unidos tenham hiper ou hipotireoidismo (Patrick, 2009).

Um estudo realizado por Hundahl *et al.* (1998) analisou 53.856 casos de câncer de tireoide em pacientes tratados nos EUA e mostrou 10% de mortalidade entre 1985 e 1995. Similarmente, um estudo com 122.803 casos de câncer de tireoide ocorridos em todo mundo no ano de 2000, apontou 8570 mortes (Ferlay *et al.*, 2000). A impressão geral destes estudos é que esta frequência crescente de carcinomas de tireoide deve-se provavelmente a alguma causa ambiental, ou seja, maior exposição à radiação ou alguma outra exposição tóxica, assim como histórico familiar. Esta conclusão é suportada em vários trabalhos, que mostraram que fatores ambientais, como deficiência em iodo, desempenham um papel crucial na promoção do desenvolvimento do

carcinoma da tireoide (Vaish *et al.*, 2004). Do mesmo modo, acredita-se que a exposição à radiação ionizante seja um importante fator de risco (Nikiforov *et al.*, 1998; Richter *et al.*, 1999).

Existem várias características clínico patológicas que são clássicos fatores de alto risco, incluindo a idade avançada do paciente no momento do diagnóstico, o sexo do paciente, tamanho do tumor, invasão extratiroidal, metástase no linfonodo e estágios avançados da doença (Degroot *et al.*, 1990; Sherman *et al.*, 1998; Mazzaferri e Kloos, 2001; Sherman *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2005; Mazzaferri, 2006).

Além disso, a existência de duas síndromes familiares incomuns (Síndrome de Gardner e Doença de Cowden) que incluem o carcinoma de tireoide entre suas manifestações e os carcinomas de tireoide familiares não medulares, demonstra a importância de fatores genéticos na patogênese deste carcinoma. Desta forma, evidencia-se que a carcinogênese é um processo complexo, constituído por uma série de eventos induzidos por fatores genéticos e ambientais que alteram o controle do crescimento celular, provavelmente envolvendo genes que, quando mutados, conferem uma vantagem no crescimento de células afetadas (Landa e Robledo, 2011).

As formas mais comuns de câncer de tireoide são neoplasias de células foliculares e derivadas de célula de C. Estas incluem câncer de tireoide papilar (cerca de 80% dos carcinomas da tireoide), folicular (menos de 10%), indiferenciados ou anaplásicos (cerca de 5%) e carcinomas de tireoide medular (cerca de 5%) (Romagnoli *et al.*, 2009).

### 1.1.2 – Carcinoma Papilífero da Tireoide

O câncer de tireoide papilífero (PTC) é o mais comum, sendo responsável por 85-90% das neoplasias de tireoide (Tang e Lee, 2010). PTC tende a afetar mais frequentemente as mulheres do que os homens, e em 2006 foi considerado uma das sete principais causas de novos casos de câncer em mulheres, representando 3% de todos os cânceres nas mulheres, cerca de 1% no sexo masculino e cerca de 1,4% de todos os cânceres em crianças (Jemal *et al.*, 2006).

Zhu *et al.* (2009) constataram maiores taxas de incidência de PTC em idades acima de 20 anos nos E.U.A., e sugeriram que esta tendência pode refletir as exposições às mudanças ambientais. A exposição à radiação é o mais conhecido e mais estudado fator de risco para PTC. Outros fatores de risco estudados incluem hábitos alimentares, estilo de vida e a predisposição genética (SONKAR *et al.*, 2010). A maioria dos pacientes com PTC podem ser curados, tendo uma taxa de sobrevivência de 84% (Samaan *et al.*, 1992). No entanto, um regresso significativo, cerca de 20% em 10 anos e 30% em 30 anos de acompanhamento, é visto após o tratamento inicial (Mazzaferri e Jhiang, 1994).

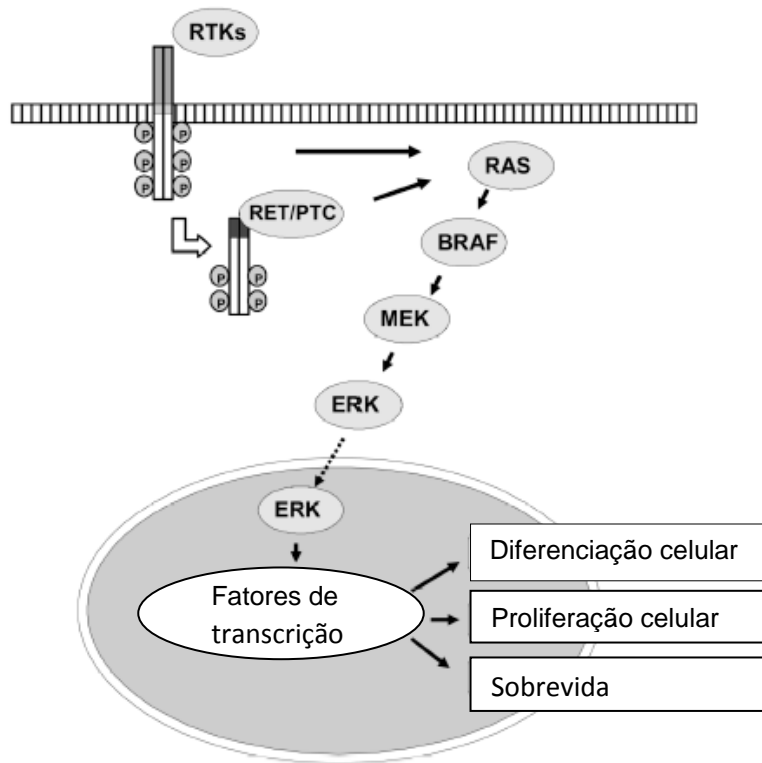
No caso de PTC, os subtipos histológicos são também fatores importantes na avaliação do risco deste câncer. Estes subtipos incluem principalmente células altas de PTC, o PTC convencional e a variante folicular de PTC (FVPTC), que estão associados com a agressividade do tumor na ordem de: células altas de PTC > PTC convencional > FVPTC (Chan, 1990; Xing, 2005; Lang *et al.*, 2006; Keelawat e Pounsuk, 2006; Michels *et al.*, 2007).

Estes tumores frequentemente têm mutações que ativam constitutivamente a via de sinalização MAPK (*mitogen activated protein kinase*). Esta via inclui receptores de superfície celular como o RET (*rearranged during transfection*), Guanosina trifosfato (GTP) ligada à proteína G, como RAS (uma abreviação de RAt Sarcoma) e quinases

intracelulares, tais como RAF. Isso leva ao aumento da translocação nuclear de MAPK fosforilada e a alterações na regulação da transcrição de genes alvo (Xing, 2010).

Embora todas as alterações de característica genética em PTC sejam capazes de ativação da via MAPK, o fenótipo histológico e o perfil de expressão não são idênticos entre as diferentes alterações genéticas, sugerindo que outras vias, como a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), proteína quinase C e via de sinalização Wnt podem estar envolvidas (Christopher, 2010). O aumento da sinalização de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/AKT, uma via importante relacionada com proliferação celular e sobrevivência, é a força motriz para a progressão dos tumores de baixo a alto grau e alterações nesta tem sido muito observada em câncer de tireoide (Hou *et al.*, 2008).

A via de sinalização MAPK tem um papel fundamental em funções celulares como proliferação, diferenciação, apoptose, sobrevivência e, quando aberrantemente ativada, tumorigênese (Kohno e Pouyssegur, 2006). A ativação fisiológica desta via é desencadeada por uma grande variedade de fatores de crescimento, hormônios e citocinas através de seus receptores na membrana celular. Em células normais, a ativação da Raf quinase ocorre através da interação direta com GTP-Ras. Uma vez ativada, RAF, uma proteína serina/treonina quinase, fosforila e ativa MEK, que por sua vez, fosforila e ativa ERK. A ativação de ERK fosforila regularmente proteínas no núcleo e, finalmente, altera a expressão gênica com consequentes mudanças nas atividades biológicas da célula (Figura 1) (Nikiforov, 2008).



**Figura 1** - A via de sinalização MAPK é fisiologicamente ativada pela ligação de fatores de crescimento a receptores tirosina quinase (RTKs), tais como RET e NTRK, resultando na autofosforilação dos resíduos de tirosina no domínio intracelular. O receptor ativado leva à ativação de RAS localizado na face interna da membrana plasmática. RAS ativada se liga a proteínas RAF (principalmente BRAF em células foliculares da tireoide). BRAF ativada fosforila e ativa MEK, que por sua vez, fosforila e ativa ERK. Com a ativação de ERK ocorre a translocação para o núcleo, onde há a regulação da transcrição dos genes envolvidos na proliferação celular, diferenciação e sobrevivência. Alterações desta via no câncer da tireoide pode ocorrer em diferentes níveis, como resultado da mutação de ponto ou rearranjo envolvendo os genes RET, RAS e BRAF (retirado e adaptado de Nikiforov, 2008).

A ativação aberrante de MAPK, levando às atividades genéticas alteradas, tem sido estudada em vários tipos de cânceres humanos (Hoshino *et al.*, 1999). A mutação no tipo B do gene Raf (BRAF) foi descoberta como sendo a maior causa de ativação aberrante da via MAPK em cânceres humanos (Davies *et al.*, 2002; Garnett e Marais,

2004; Dhomen e Marais, 2007). Existem três Raf quinases, A-Raf, B-Raf e C-Raf. Destes três, B-RAF é a mais potente ativadora da via MAPK (Mercer e Pritchard, 2003).

Um achado surpreendente em relação à mutação BRAF em câncer de tireoide é a sua ocorrência exclusiva em PTC e ATC (carcinoma anaplásico da tireoide) derivado de PTC, com uma prevalência média de 44% no primeiro e 24% no segundo, o que não ocorre em FTC ou outros tipos de tumores da tireoide (Xing, 2005). De modo complementar, em cerca de 70% dos pacientes com PTC são encontradas alterações genéticas relacionadas com a via MAPK, tais como rearranjo RET /PTC, RAS e mutações BRAF (Tang e Lee, 2010). Esta alta prevalência e especificidade da mutação BRAF em PTC sugere um único e fundamental papel patogênico desta mutação em PTC, o que levou a um grande entusiasmo nos últimos anos sobre a utilidade clínica dessa mutação como um novo marcador molecular para diagnóstico e como um alvo eficaz para o tratamento de PTC.

### 1.1.3 – *Carcinoma Folicular da Tireoide*

O carcinoma folicular de tireoide (FTC) representa aproximadamente 10% dos tumores malignos desta glândula, dependendo da população estudada (Zedenius *et al.*, 1992). Este tipo de neoplasia ocorre em pacientes de faixa etária mais avançada, tem sua incidência aumentada nas áreas de deficiência de iodo ou bócio endêmico e costuma ser mais agressivo que o carcinoma papilífero (Schlumberger, 1998; Mazzaferri e Kloss, 2001; Golbert *et al.*, 2005). Um estudo com 15.700 pacientes nos EUA mostrou uma taxa de sobrevivência de 10 anos nos pacientes com carcinoma de tireoide folicular (Gilliland *et al.*, 1997).

O FTC é encapsulado e a invasão da cápsula e vasos é o que o distingue do adenoma folicular. Duas formas são reconhecidas de acordo com o padrão de invasão:

minimamente invasivo e vastamente ou amplamente invasivo. O padrão de crescimento também pode variar de uma forma bem diferenciada a uma forma pobremente diferenciada. O carcinoma de células de Hurtle é uma variante mais agressiva do carcinoma folicular. A disseminação faz-se via hematogênica, com metástases frequentemente para pulmões e ossos e é caracterizado por oncócitos ricos em mitocôndrias (Slough e Randolph, 2006).

#### 1.1.4 – *Carcinoma Medular da Tireoide*

O câncer de tireoide medular (MTC) é conhecido pelo excesso de secreção de calcitonina, cromogranina A (CgA), e antígeno carcinoembriológico (CEA). Apesar de o MTC representar apenas aproximadamente 5% de todos os cânceres de tireoide, ele é responsável por 14% das mortes por câncer. Além disso, a sobrevida para MTC é de 83%, pior em relação ao câncer de tireoide papilar ou folicular (Cook *et al.*, 2010). A maioria dos MTCs é esporádica, mas cerca de 25% dos casos resultam da ativação da mutação de rearranjo durante a translocação do proto-oncogene RET em células germinativas (Moley, 1999; Chen *et al.*, 1998).

A gestão de MTC depende muito da ressecção cirúrgica, que consiste em tireoidectomia total e dissecação de linfonodo. No entanto, a doença se desenvolve em aproximadamente 50% dos pacientes com MTC (Kebebew *et al.*, 2000). Da mesma forma, dados bioquímicos de MTC persistente ou recorrente por níveis séricos de calcitonina são frequentemente associados com a recorrência em locais distantes, especialmente pulmão e fígado. Portanto, embora MTC tende a ser um tumor de crescimento lento, frequentemente ocorrem metástases no início da doença, impossibilitando os pacientes de uma ressecção curativa. Assim, é necessário desenvolver estratégias terapêuticas alternativas para controlar o crescimento tumoral,

possivelmente através da manipulação de várias vias de sinalização celular (Chen *et al.*, 2005).

#### 1.1.5 – *Carcinoma anaplásico da tireoide*

O carcinoma anaplásico (ou indiferenciado) da tireoide (ATC) é uma malignidade rara que acomete de 2 a 5% de todos os cânceres de tireoide. Aproximadamente 40% dos pacientes com ATC têm metástases, sendo 80% delas no pulmão. Apesar de diferentes abordagens de tratamento, ATC cresce muito rapidamente, invade tecidos adjacentes, e a maioria dos pacientes morre devido à invasão tumoral descontrolada causando asfixia (Derbel *et al.*, 2011).

Mais de 90% de todos os cânceres da tireoide derivam das células foliculares da tireoide, incluindo papilífero, foliculares, ou células de Hurthle. ATC pode derivar *de novo* ou de PTC pré-existentes ou FTC. Um pequeno número de mutações foi identificado, e parece haver uma progressão de mutações adquiridas durante a desdiferenciação (Nikiforov, 2004).

A patogênese molecular da ATC inclui mutações nos genes BRAF, RAS, catenina (proteína caderina-associados), PIK3CA, TP53, AXIN1, PTEN, e os genes APC, além de anomalias cromossômicas. Numerosas proteínas relacionadas à fatores de transcrição, vias de sinalização, mitoses, proliferação, ciclo celular, apoptose, adesão, migração, epigenética, e degradação de proteínas são afetadas (Smallridge *et al.*, 2009).



## 1.2 Mutação BRAF V600E

Uma das principais alterações genéticas no câncer de tireoide é a mutação V600E no gene BRAF, que ocorre exclusivamente em PTC, FVPTC e ATC derivado de PTC, que resulta na ativação aumentada da via de sinalização MAP kinase. Esta mutação está associada às piores características clinicopatológicas, tais como invasão extra-tireoidiana aumentada, metástase de linfonodo e estágio avançado do tumor (Guan *et al.*, 2008).

A proteína BRAF é altamente expressa em células hematopoiéticas, neurônios e células foliculares de tireoide. Ao contrário das mutações em A-Raf e C-Raf, raramente encontradas, a mutação em B-RAF é a mais comum dentre os genes Raf e é a segunda mutação somática mais comum em todos os cânceres humanos (Tang *et al.*, 2010). Atualmente, há mais de 40 mutações identificadas no gene BRAF, sendo que em 90% dos casos a alteração encontrada é a T1799A, que causa a mudança do aminoácido valina para ácido glutâmico no resíduo 600 da proteína (V600E), resultando na ativação constitutiva e oncogênica de BRAF kinase (Xing, 2007).

A Raf serina / treonina quinase tem um importante papel na transdução de sinal da cascata Erk, que regula diversos processos fisiológicos, incluindo o crescimento celular, diferenciação e apoptose. A ativação da proteína GTPase-Ras recruta Raf para a membrana plasmática, onde se torna ativa. Proteínas Raf ativadas fosforilam e ativam diretamente MEK quinase, que, por sua vez, fosforila e ativa ERK (Morrison e Cutler, 1997; Kolch, 2000; Avruch *et al.*, 2001; Peyssonnaud e Eychene, 2001) (Figura 1).

A mutação de ponto V600E no éxon 15 do gene BRAF tem sido reportada em um grande número de cânceres, como melanoma maligno, câncer colorretal e carcinoma da tireoide (Kimura *et al.*, 2003; Pollock *et al.*, 2003), sendo a alteração genética mais prevalente em PTC, com uma média de 44% (Kimura *et al.*, 2003; Xing, 2007). Apesar de existirem controvérsias, a maioria dos estudos demonstra que esta

mutação está diretamente ligada a uma ou mais características clinicopatológicas de risco e/ou pior prognóstico dos pacientes (Kim *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Kebebew *et al.*, 2007).

O papel tumorigênico de BRAF V600E no desenvolvimento de PTC foi demonstrado em camundongos transgênicos que desenvolveram tumores com características mais agressivas (Knauf *et al.*, 2005). A descoberta de que BRAF V600E é a mais comum mutação em PTC, e estudos moleculares que demonstram seu papel na tumorigênese de PTC, sugerem que esta mutação é o iniciador de PTC. Sabe-se da forte potência quinase de BRAF V600E em induzir instabilidade genética, silenciar genes de metabolização de iodo e escapar dos mecanismos de *feedback* que podem promover a progressão e agressividade de PTCs. Assim, conhecer as vias moleculares envolvidas na carcinogênese da tireoide suportam o desenvolvimento de terapias com alvo em BRAF para pacientes com PTC (Tang e Lee, 2010). Além disso, muitos autores demonstram também a associação desta mutação com o aumento da metilação de alguns genes supressores de tumor, tais como TIMP3, DAPK, SLC5A8 e RAR $\beta$ 2 (Hoque *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006; Porra *et al.*, 2005).

Em seu trabalho, Guan e colaboradores (2008) sugerem que a mutação BRAF V600E poderia induzir a instabilidade genômica e a hipermetilação de alguns genes de reparo do DNA. Levando em consideração que os genes de reparo do DNA protegem a integridade do genoma, a hipermetilação poderia conseqüentemente causar o silenciamento dos genes de reparo ao DNA, predispondo-o à instabilidade genômica.

### **1.3 Mutação RET/PTC**

Adicionalmente à mutação BRAF V600E, existem outras alterações moleculares encontradas em PTC envolvendo os genes RET e NTRK1, que codificam receptores

tirosina quinases, e o gene RAS, efetor intracelular da via MAPK (Frattini *et al.*, 2004). BRAF e RET são os genes mais frequentemente alterados em carcinoma de tireoide.

O protooncogene RET (*rearranged during transfection*) encontra-se no cromossomo 10q11.2 e codifica um receptor de membrana tirosina quinase. Ele possui três domínios funcionais: um domínio de ligação extracelular, um domínio transmembrana hidrofóbico e um domínio intracelular tirosina quinase. Os ligantes do receptor RET fazem parte de fatores de crescimento e quando são ligados provocam dimerização do receptor, autofosforilação de resíduos de tirosina e ativam a cascata de sinalização (Ciampi e Nikiforov, 2007).

A ativação do gene *RET* se dá pela fusão da sua porção 3' terminal com a região 5' terminal de diferentes genes, o que leva à sua ativação constitutiva. Existem pelo menos 15 rearranjos cromossomais em RET/PTC, porém os mais comuns são RET/PTC1 e RET/PTC3 (Cyniak-Magierska *et al.*, 2011). A recorrência de RET/PTC varia de acordo com a variabilidade geográfica e população estudada, mas acredita-se em uma frequência de 0 a 87% (Zhu *et al.*, 2006). Nota-se também uma maior incidência de RET/PTC em pacientes pediátricos e em pacientes com história de exposição à radiação (Greco *et al.*, 2009).

Existem evidências demonstrando que essa mutação tem um papel predominante no desenvolvimento de PTC (Tallini e Asa, 2001; Nikiforov, 2002), assim como relatos de pacientes com RET/PTC1 e uma maior taxa de metástase em linfonodos (Greco *et al.*, 2009). Além disso, há uma forte tendência da presença de RET/PTC mutuamente com BRAF V600E em PTC, sugerindo que essas duas alterações genéticas podem ser suficientes para a ativação da via MAPK (Xing, 2010).

Em seu estudo, Nakachi *et al.* (2008) observaram uma prevalência de RET/PTC em pacientes que tiveram alta exposição à radiação e desenvolveram câncer de tireoide, sugerindo um importante papel deste rearranjo na tumorigênese de tireoide. Ainda neste trabalho, os resultados em câncer de tireoide e câncer colorretal sugerem

que a radiação induzia alguns eventos específicos como a ocorrência de aberrações cromossômicas e instabilidade de microssatélites, assim como a relação de radiação ionizante com a hipermetilação de *MLH1* nos casos de câncer colorretal. Entretanto, os dados deste estudo se mostraram preliminares, sendo necessários mais estudos moleculares na oncologia da tireoide.

#### **1.4 Mutação IDH1**

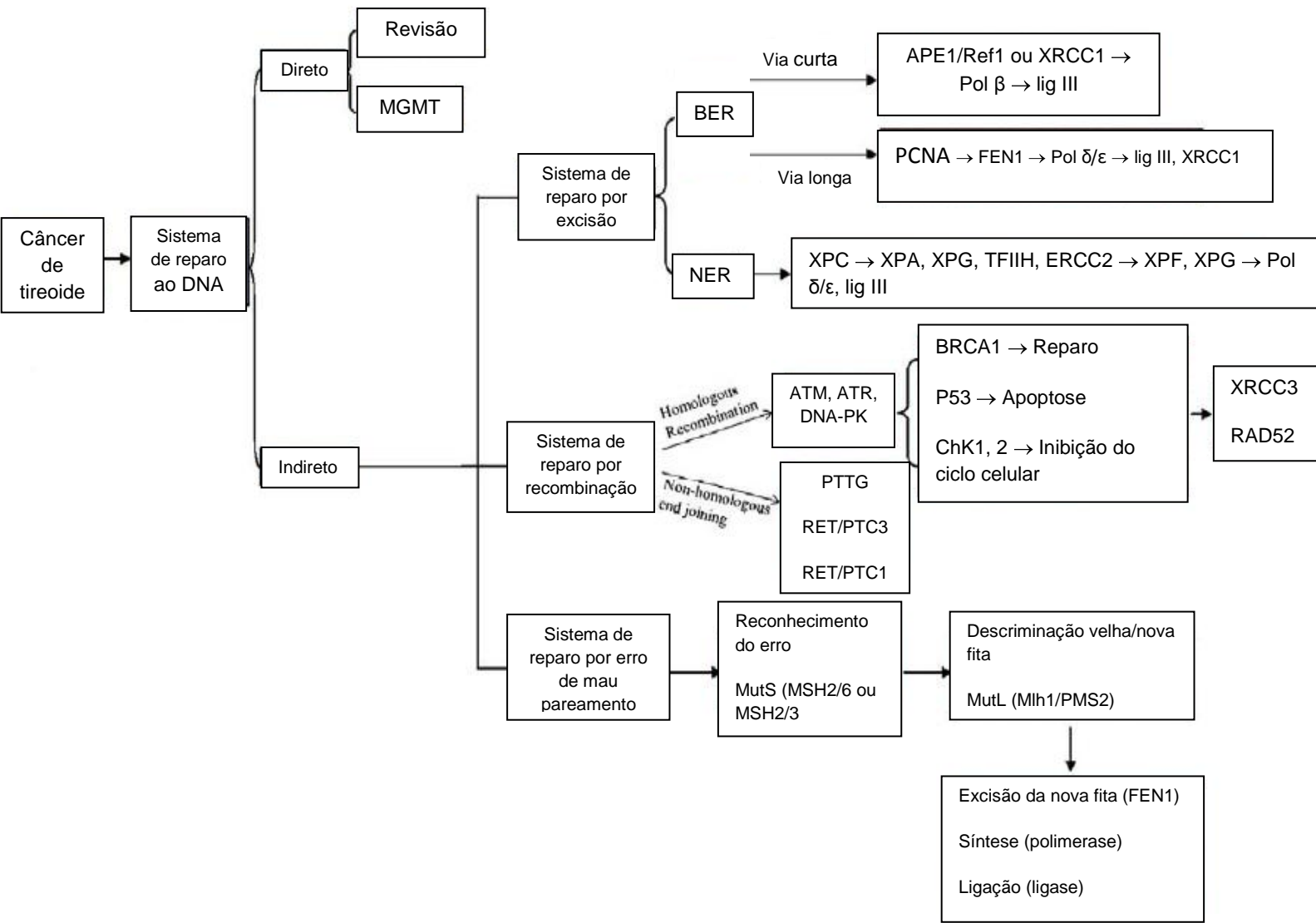
A enzima isocitrato desidrogenase 1 (IDH1) é importante na reação do ciclo de Krebs e cataliza a descarboxilação oxidativa de isocitrato para produzir alfa cetoglutarato ( $\alpha$ -KG). A atividade de IDH é dependente de NADP<sup>+</sup> e a reação bioquímica catalizada por IDH leva a produção de NADPH, que tem um importante papel no controle celular de dano oxidativo (Murugan *et al.*, 2010). Mutações em IDH1 são identificadas principalmente em glioblastomas cerebrais com uma frequência superior a 70% (Balss *et al.*, 2008; Parsons *et al.*, 2008; Bleeker *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2009).

Diferentes mutações em *IDH1* foram identificadas, todas encontradas no códon 132, resultando em várias substituições de aminoácidos como R132H, R132S, R132C e R132G. Mutações no códon 132 afetam o sítio de ligação do isocitrato. Assim, a atividade de descarboxilação da proteína IDH1 mutante se torna significativamente reduzida por causa do efeito dominante da mutação na inibição do complexo heterodimérico IDH1. Desta forma, há uma redução na quantidade de NADPH necessária para proteção celular contra estresse oxidativo, o que pode gerar acúmulo de espécies reativas de oxigênio e consequente dano ao DNA (Lee *et al.*, 2002; Deimling, 2011). Adicionalmente a esta hipótese, mutantes IDH1 podem causar diminuição na produção de  $\alpha$ -KG, que promove degradação de HIF1- $\alpha$ , um fator de transcrição que facilita o crescimento tumoral em baixas concentrações de oxigênio e

cuja estabilidade é regulada por  $\alpha$ -KG. Desta forma, mutações em IDH1 podem promover crescimento tumoral e angiogênese, uma vez que na ausência de  $\alpha$ -KG, HIF1- $\alpha$  não será inibida (Zhao *et al.*, 2009). Recentemente, a mutação *IDH1* foi encontrada em MTC, PTC (Bleeker *et al.*, 2009), ATC (Murugan *et al.*, 2010), FTC e variante folicular de PTC (FVPTC) (Hemerly *et al.*, 2010).

### **1.5 Sistema de Reparo ao DNA**

De acordo com Michieles *et al.* (2009), existem 4 sistemas principais de reparo ao DNA: reparo por excisão de base (BER), reparo por excisão de nucleotídeo (NER), reparo por erro de pareamento (MMR) e reparo de quebra de fita dupla (DSBR) (Figura 2). O BER é necessário para remover bases oxidadas ou quimicamente modificadas. O NER normalmente repara os danos ao DNA gerados pela exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. MMR é o mecanismo de reparo necessário para a correção de erros que acontecem durante a replicação normal de DNA pela DNA polimerase, como também no reparo por mau pareamento de nucleotídeos na fita oposta à lesão de DNA. O DSBR é necessário para todo organismo vivo, pois uma única quebra de fita dupla não reparada pode ser letal para uma célula, portanto este mecanismo de reparo age em diversas etapas do ciclo celular. O reparo de quebra de fita dupla acontece por dois mecanismos: recombinação homóloga (HR) e recombinação não- homóloga (NHEJ) (Figura 2).



**Figura 2** – Mecanismos de reparo ao DNA e associação com câncer de tireoide. Modificado de Gatzidou *et al.* (2010).

O ponto crucial da NHEJ é a ligação das proteínas Ku70/Ku86 às pontas livres de DNA seguido pelo recrutamento da subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA (DNA- PKcs), que em uma cascata de fosforilação regula proteínas que operam o processo de ligação das fitas duplas quebradas (Hefferin e Tomkinson, 2005; Bescow *et al.*, 2009).

As quebras em fitas duplas de DNA (DSBs) são lesões críticas à molécula de DNA que podem resultar, além da morte celular em uma grande variedade de alterações genéticas tais como deleções, perda de heterozigotidade, translocações e perda cromossômica, que são considerados marcadores do desenvolvimento de câncer (Lu H *et al.*, 2007). Acredita-se que tais lesões possam ser resultantes da ação de agentes exógenos (tais como radiação ionizante, drogas quimioterápicas e agentes infecciosos), agentes endógenos (radicais livres de oxigênio) e estresse mecânico agindo nos cromossomos (Nijnik *et al.*, 2007). Estas DSBs são percebidas por sensores quinases como ATR e ATM, que fosforilam e ativam outras quinases, como a “*checkpoint*” quinase 2 (Chk2), que pára o ciclo celular em diversos estágios e pode apresentar um efeito ativador da apoptose (Castedo *et al.*, 2004).

Para manter a fidedignidade do genoma as células eucarióticas possuem mecanismos que são ativados por proteínas cuja função na cascata de sinalização é reconhecer DSBs ou danos ao DNA, param o ciclo celular e ativam as vias de reparo ao DNA. Estas respostas celulares ocorrem em vários estágios do ciclo celular que são coletivamente chamados de pontos de checagem de danos ao DNA (Su, 2006).

O sistema de reparo de DNA MMR (*Mismatch repair system*) é composto por dois complexos protéicos: as proteínas MutS que incluem MSH2, MSH3 e MSH6 e as proteínas MutL que engloba *MLH1*, PMS1, PMS2 e MLH3. Para o funcionamento do sistema MMR é necessário que o complexo protéico MutL se ligue a MutS- $\alpha$  (MSH2 e MSH6) ou MutS- $\beta$  (MSH2 e MSH3). Acredita-se que a deficiência nesse sistema de reparo possa ser responsável pelo acúmulo de mutações (Kolodner e Marsischky, 1999; Lipkin *et al.*, 2000).

*MLH1* (mut L homolog 1) é um homólogo humano do gene mutL DNA MMR de *E. coli* localizado no cromossomo 3p21.3. Alterações epigenéticas em *MLH1* têm sido estudadas no desenvolvimento, evolução e metástases em câncer tireoide (Gatzidou *et al.*, 2010). Além disso, elevados níveis de expressão de *MLH1* têm sido relatados em

tumores malignos da tireoide, em comparação com os observados em lesões benignas (Ruschenburg *et al.*, 2006; Giaginis *et al.*, 2011).

Adicionalmente, a enzima de reparo *MGMT* (O6-Methylguanine DNA methyltransferase) protege o DNA contra mutações causadas por agentes alquilantes, e a perda da expressão desta pode levar ao desenvolvimento de câncer (Ito *et al.*, 1994; Sekiguchi *et al.*, 1996). A metilação da região promotora de *MGMT* tem sido considerada como um prognóstico adjuvante à quimioterapia em diversos cânceres. Existe uma forte associação entre o status de metilação deste gene, e seu consequente silenciamento, com a alta prevalência da mutação *IDH1*. Sabe-se que a inativação de *MGMT* facilita a transição de G para A, afetando alguns genes críticos. Dessa forma, a metilação de *MGMT* poderia explicar a alta taxa da transição G395A no gene *IDH1* (Sanson *et al.*, 2009). Porém, esta correlação tem sido observada principalmente em gliomas, sendo necessários estudos que alvejem seu papel em outros tipos de cânceres, como o da tireoide.

Diversos trabalhos mostram que a expressão de proteínas envolvidas com o reparo ao DNA é uma resposta direta ao aumento nos níveis de danos induzidos ao DNA (Fritz e Kaina, 1992; Grombache *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 2002). Quando a quantidade de danos ao DNA está acima da capacidade de reparo ao DNA, é ativada a sinalização de checagem. Um dos primeiros passos na resposta celular aos danos ao DNA induzidos por agentes genotóxicos é a ativação de proteínas reparadoras do DNA tais como DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), Ku70/80, PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), ATM (ataxiatangiectasia mutated) e ATR (ATM-Rad3-related) (Bao S *et al.*, 2001).

Alguns trabalhos mostram que ATM e DNA-PK podem regular a função de Ku70/80 por meio de fosforilação e/ou translocação nuclear das proteínas Ku. Nos danos ao DNA induzidos pelo estresse, ATM parece ser essencial para ativação de Ku e pela sobrevivência celular (Morio e Lim, 2008). As proteínas Ku 70 (70 kDa) e Ku80 (80 kDa) são subunidades regulatórias de ligação ao DNA da DNA-PK, as quais são



compostas por uma subunidade catalítica de 470 kDa (DNA-PKcs). Ku70 e Ku80 iniciam o processo de reparo das quebras em fita dupla de DNA ao se ligarem a estas quebras e ativarem a DNA-PK. A fosforilação de Ku70/80 pela DNA-PK controla sua localização, sua capacidade de ligação ao DNA, bem como sua função (Morio e Lim, 2008). Além disso, alguns estudos mostram que Ku possa gerar uma proteção contra o estresse oxidativo (Shackelford *et al.*, 1999).

ATM está presente no núcleo primariamente como um dímero em associação com PP2A (*protein phosphatase 2A*) (Gately *et al.*, 1998). Após a formação de quebras em dupla fita de DNA a interação ATM-PP2A é rompida (Guo *et al.*, 2002) e ATM é ativada por meio de fosforilação em serina na posição 1981 (Canman *et al.*, 1998). ATM funciona como um sensor para os danos ocorridos no DNA, e fosforila proteínas fundamentais (Ku70/80) para o reparo ao DNA danificado. Além disso, ATM pára o ciclo celular por meio da fosforilação de CHK2, o que fosforila p53 enquanto os danos são reparados. ATM repara o DNA por meio de recombinação homóloga através da interação de ATR com o complexo M/R/N. Quando a tentativa de reparo falha, a célula entra em apoptose pela via do p53. Adicionalmente, o estresse oxidativo induz a morte celular pela perda da proteína nuclear Ku70/80 (Song *et al.*, 2003). Desse modo, parece claro que ATM é essencial para a ativação nuclear de Ku, manutenção de Ku70/80 e DNA-PK juntos a ATM, o que poderia prevenir o dano ao DNA em várias doenças e quadros inflamatórios (Morio e Lim, 2008).

Diversos genes do sistema de reparo ao DNA têm sido associados com o aumento do risco de desenvolvimento de câncer de tireoide, assim como Gatzidou *et al.* (2010) demonstraram em sua revisão (Tabela 1).

**Tabela 1** - Genes do sistema de reparo ao DNA envolvidos em câncer de tireoide.

<b>Sistemas de reparo ao DNA</b>	<b>Genes</b>
<b>BER</b>	<i>XRCC1</i> <i>APE/Ref1</i>
<b>NER</b>	<i>ERCC2 – TFIIH</i>
<b>MMR</b>	<i>MLH1 – BRAF</i> <i>PMS1</i> <i>MSH2</i>
<b>HR</b>	<i>XRCC3</i> <i>RAD52</i> <i>TP53</i>
<b>NHEJ</b>	<i>PTTG</i> <i>RET</i> <i>RET/PTC1</i> <i>RET/PTC3</i>

O *X-ray cross-complementing group 1 (XRCC1)* é um dos genes que participa da via BER. Ele codifica uma proteína que funciona no eficiente reparo de quebra de fita simples do DNA. Dois polimorfismos neste gene têm sido descrito no desenvolvimento e progressão do carcinoma diferenciado da tireoide (DTC) (Gatzidou *et al.*, 2010).

A *Apurinic/apuridimic endonuclease redox effector factor 1 (APE/Ref1)* é uma proteína multifatorial envolvida na via BER de lesões ao DNA. Essa proteína é expressa tanto no núcleo como no citoplasma de células foliculares normais da tireoide. A

expressão e localização de APE/Ref1 são controladas pelo TSH. Essa proteína representa uma das ligações entre os vários eventos patológicos da célula, contribuindo para a regulação anormal de diferenciação e proliferação celular que caracterizam a transformação neoplásica (Gatzidou *et al.*, 2010).

*Excision repair cross-complementing 2* (ERCC2) ou proteína XPD é uma helicase conservada no processo evolutivo dependente de ATP associada com complexo de fatores de transcrição TFIIH que possui um importante papel no NER. Defeitos neste gene podem resultar na síndrome do xeroderma pigmentoso grupo D, tricotiodistrofia, e síndrome Cockayne (Gatzidou *et al.*, 2010). Silva *et al.* (2005) examinaram a relevância de alguns polimorfismos neste gene com o risco de desenvolvimento de câncer de tireoide e observaram que indivíduos simultaneamente homozigotos apresentaram aumento no risco de câncer de tireoide.

Alterações epigenéticas, principalmente a hipermetilação no gene *MLH1* tem sido relatadas no desenvolvimento, progressão e metástase em câncer de tireoide. Uma possível explicação é que a metilação aberrante do promotor deste gene, e seu consequente silenciamento, possa provocar um defeito no sistema MMR, o que predisporia a célula às instabilidades genéticas que resultariam em mutações funcionalmente importantes em PTC (Gatzidou *et al.*, 2010).

Outros genes do sistema MMR cuja expressão se encontra alterada em tumores de tireoide são *PMS1* e *MSH2* (Gatzidou *et al.*, 2010).

O gene *X-ray repair cross-complementing 3* (*XRCC3*) codifica um membro da família de proteínas RecA/RAD51 que participa do reparo de quebra de fita dupla e na manutenção da estabilidade cromossômica. Células deficientes em *XRCC3* não formam RAD51 depois de danos causados pela radiação e exibem instabilidade genética e aumento à sensibilidade de agentes que danificam o DNA (Gatzidou *et al.*, 2010).

RAD52 codifica uma proteína importante para o reparo de DNA com quebras em dupla fita pela via de recombinação homóloga. Essa proteína participa da interação

DNA-DNA necessária para o anelamento da fita complementar do DNA (Gatzidou *et al.*, 2010). Polimorfismos em RAD52 podem estar associados com câncer de tireoide e aumento do risco de desenvolvimento de PTC (Siraj *et al.*, 2008).

O gene *TP53* tem múltiplas funções regulatórias em ciclo celular, reparo ao DNA e apoptose. Em células normais, TP53 é inativado por um regulador negativo, MDM2. Várias vias decorrentes de danos ao DNA e diversos fatores estressantes podem levar à decomposição do complexo p53-MDM2. Uma vez ativada, TP53 pode induzir parada no ciclo celular para permitir o reparo e sobrevivência da célula ou apoptose (Gatzidou *et al.*, 2010). Segundo Farid (2001), mutações em *TP53* foram encontradas em 14% de tumores malignos da tireoide, sendo mais frequente em pobremente diferenciado e anaplásicos.

O gene *Human pituitary tumor transforming (PTTG)* é um oncogene recentemente descoberto que serve como um marcador molecular de malignidade de vários tecidos, em particular o endócrino. *PTTG* é um inibidor de anáfase que antecipa a separação cromossômica através da inibição da atividade da separase, conseqüentemente, a iniciação da anáfase depende de sua degradação. Os níveis de expressão de *PTTG* têm sido encontrados em malignidades da tireoide (Gatzidou *et al.*, 2010). Estudos de *PTTG* em carcinomas de tireoide sugerem que este gene funciona como um potencial marcador de comportamento agressivo tumoral. Outros estudos de *PTTG* em tireoide demonstram um envolvimento na promoção e inibição da angiogênese, bem como instabilidade genética (Salehi *et al.*, 2008).

Rearranjos intracromossômicos são frequentes em câncer de tireoide. Especialmente o rearranjo citogenético ELE-1/RET que resulta da ativação do proto-oncogene RET (RET/PTC3). RET/PTC3 é produzido pela inversão paracêntrica do braço longo do cromossomo 10. O complexo é formado pela fusão do domínio intracelular tirosina quinase de RET com o gene ELE-1. O gene *RET* é um membro da super família de caderina, codificando um dos receptores tirosina quinase que estão na superfície celular e emitem sinais para crescimento e diferenciação celular. Muitos

estudos associam RET/PTC3 com a alta prevalência de PTCs induzidos pela radiação pós Chernobyl (Bongarzone *et al.*, 1997; Nikiforov *et al.*, 1999; Klugbauer *et al.*, 2001; Povirk, 2006). Um possível mecanismo é a indução de mutações oncogênicas diretamente decorrentes de danos ao DNA mal reparado através do mecanismo NHEJ.

## 1.6 Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma modificação química de sua estrutura induzida por enzimas onde um grupo metila esta covalentemente unido ao carbono 5 da citosina. Este processo é mediado por um grupo de enzimas denominadas DNA metiltransferases. O grupo metila é doado pelo S adenosil metionina (SAM) o qual é convertido em S adenosil homocisteína (SAH) durante o processo. Este é reciclado a SAM por uma via dependente de folato e cobalamina. A metilação nos vertebrados acontece somente nas bases citosinas e naquelas que estão diretamente ligadas a guanina através de união fosfodiesterase formando um par CpG (Wajed *et al.*, 2001).

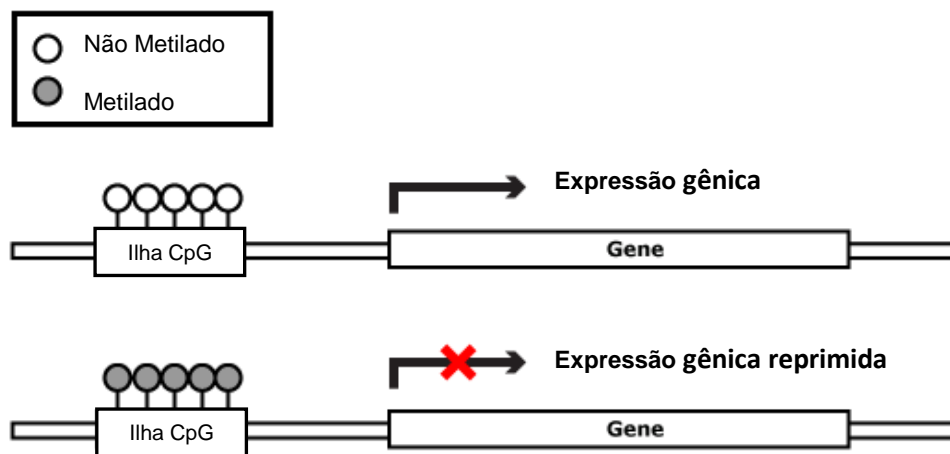
Em células normais, a metilação do DNA tem um importante papel no controle da transcrição gênica atuando nas ilhas CpG da região promotora, regulando a remodelação da cromatina e a manutenção da estabilidade genômica através da repressão de elementos móveis do genoma tais como LINEs e SINEs (Bird, 2001; Fuks *et al.*, 2003). A maquinaria de metilação do DNA de mamíferos é composta por DNA metiltransferases (DNMTs), que estabelecem e mantêm o padrão de metilação, e por proteínas ligadoras de metil-CpG (MBPs), as quais “lêem” as marcas de metilação e ditam os níveis de expressão gênica (Bird, 2002). Até o momento quatro DNMTs humanas foram descritas: DNMT1 (responsável pela manutenção do padrão de metilação do DNA), DNMT3a e 3b (geração de novos padrões de metilação do DNA) e DNMT2 (apresenta limitada atividade de metiltransferase) (Hermann *et al.*, 2004). A metilação da região promotora reprime a transcrição gênica tanto por meio da inibição

da ligação específica de fatores de transcrição, como pela ligação dos MBPs, que silenciam a expressão gênica recrutando o complexo de remodelação de cromatina (Klose e Bird, 2006). Além de sua função na manutenção do padrão de metilação, tem sido proposto que DNMT1 seria responsável pela metilação *de novo* das ilhas CpG durante a cascata que culmina no desenvolvimento do câncer (Vertino *et al.*, 1996; Rhee *et al.*, 2002). Sugere-se, que o aumento na expressão de DNMT1 participe ativamente na hipermetilação do DNA (Kanai e Hiroshi, 2007).

Nas células cancerosas observam-se padrões alterados de metilação, áreas de hipometilação no genoma e sítios hipermetilados, especificamente as ilhas CpG nas regiões promotoras (Feinberg *et al.*, 1983; Baylin *et al.*, 1986). Baseados nestas observações têm surgido várias teorias implicando a metilação do DNA nos mecanismos da carcinogênese (Laird, 1987). Assim, a amplificação de proto-oncogenes ou o silenciamento dos genes supressores tumorais quebram o balanço que normalmente controla a proliferação celular e leva, através de uma sucessão de eventos, à carcinogênese. A diminuição da metilação libera a transcrição, que estava silenciada, e permite a expressão de proto-oncogenes que se ativam e induzem eventos de proliferação celular (Narayanan *et al.*, 2004 ; Robertson *et al.*, 2005). Por outro lado, o aumento da metilação em sítios que previamente estavam não metilados, como as regiões promotoras de genes supressores tumorais, acabam sendo silenciadas devido à inibição da transcrição e impedindo a supressão da proliferação celular (Wadjer *et al.*, 2001).

As ilhas CpG são segmentos de DNA de tamanho aproximado de 0,5Kb, ricas em G:C frequentemente localizadas na região promotora dos genes. As mesmas têm sido tradicionalmente consideradas não metiladas em células normais, com exceção do cromossomo X inativado e aos genes imprintados. Embora as causas ainda não estejam sendo reveladas, é claro que a hipermetilação das ilhas CpG da região promotora de alguns genes acontece em associação com o desenvolvimento do câncer e do envelhecimento. A metilação aberrante desta ilhas CpG levam ao silenciamento

transcricional dos genes envolvidos e apresentam um mecanismo potencial para a inativação de genes relacionados aos tumores (Figura 3).



**Figura 3** – Metilação aberrante levando ao silenciamento da expressão gênica (modificado de [http://missinglink.ucsf.edu/lm/genes\\_and\\_genomes/methylation.html](http://missinglink.ucsf.edu/lm/genes_and_genomes/methylation.html)).

A relação inversa entre a metilação do DNA e a expressão gênica é específica quando a metilação acontece na região promotora do gene (Razin e Riggs, 1980). Inicialmente acreditava-se que o processo se devia a um impedimento físico do grupo metila do DNA impedindo a transcrição. Atualmente, é conhecido que o mecanismo inibitório aconteça pela união de determinadas proteínas (MBPs) às sequências de DNA metiladas. Estas proteínas pertencem a uma família de proteínas que possuem o domínio metil – CpG que reconhece e se une às CpGs metiladas, independentemente da sequência do gene. Esta proteína também possui um sitio de união de inibidores da transcrição, que formam complexos com uma variedade de moléculas correpressoras e proteínas desacetiladoras de histonas. Quando este complexo protéico se une ao DNA metilado, as histonas que formam o nucleossomo ficam desacetiladas. Isto causa mudanças na estrutura da cromatina, deixando-a mais condensada e,

consequentemente o DNA fica menos acessível, impedindo que aconteça uma transcrição ativa (Nan *et al.*, 1997; Bestor *et al.*, 1998).

De fato, a hipermetilação da região promotora de genes que controlam a proliferação celular, apoptose e mecanismos de reparo de DNA têm sido descritos como importantes fatores que contribuem no processo de iniciação e/ou progressão do câncer (Feinberg e Vogelstein, 1983). Especificamente, a hipermetilação da região promotora de *MLH1* está fortemente associada com metástases no linfonodo e, assim como observado no câncer de cólon, na tumorigênese tireoidiana promovida por BRAF. Uma explicação plausível é que a hipermetilação no promotor deste gene, causando seu silenciamento, provoca um defeito no sistema de reparo MMR dentro da célula, o que predisporia à instabilidade genética resultando em mutações funcionalmente importantes em PTC, como BRAF V600E (Guan *et al.*, 2008).

Entretanto, o mecanismo molecular envolvido na agressividade do tumor em PTC em consequência da mutação BRAF ainda não está claro. Alguns estudos demonstram uma associação entre a mutação e metilação aberrante de diversos genes de supressão tumoral em PTC (Hu *et al.*, 2006). A metilação desses genes foi então associada com características patológicas mais agressivas de PTC, devido ao silenciamento destes genes, mediante à mutação BRAF V600E, e consequente progressão de PTC.

Estudos na literatura envolvendo níveis de metilação de *MGMT* apontam uma incidência de 15% em PTC (Ishida *et al.*, 2007). Além disso, Schagdarsurengin *et al.* (2006) relataram que a hipermetilação de *MGMT* ocorre preferencialmente nos carcinomas indiferenciados de tireoide em comparação com os diferenciados.

Diversos estudos mostram que a metilação de alguns genes supressores de tumor poderiam desempenhar um papel tumorigênico em associação com a metilação aberrante de genes de conhecidas vias de sinalização como a via PI3K/Akt em FTC e MAPK em PTC, assim como em alguns genes específicos da tireoide, culminando



numa importante falha no tratamento com radioiodo e, portanto, a evolução clínica do carcinoma de tireoide (Xing, 2007). Desse modo, a metilação aberrante pode representar possíveis alvos terapêuticos, assim como novos e promissores marcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico para o câncer de tireoide.

Por fim, sabe-se que em câncer de cólon a mutação BRAF V600E também está associada com a instabilidade genética e a hipermetilação aberrante de certos genes de reparo de DNA, como *MLH1*, sugerindo portanto, que o silenciamento de genes de reparo de DNA pode predispor as células à instabilidade genética.

### **1.7 Instabilidade de Microssatélites**

A instabilidade genética é um fator fortemente envolvido no processo de carcinogênese e está associada ao sistema de reparo do DNA defeituoso em tumores, sendo caracterizada pelas expansões ou contrações de uma simples sequência repetida no DNA. A instabilidade de microssatélites (MSI) foi descrita pela primeira vez em 1993 em pacientes com câncer colorretal (HNPCC), e desde sua descoberta até o presente a mesma tem sido descrita em diferentes tipos de câncer. Os microssatélites consistem em unidades de cerca de um a quatro nucleotídeos, repetidas em sequência, dentro do genoma humano. O deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase durante a replicação do DNA é tida como a principal causa da variação no número de repetições nesses *locis* (MOSKALUK *et al.*,1998; WRITZ *et al.*,1998).

Estudos sobre a instabilidade genômica em câncer apontam que a MSI ocorre mais frequentemente em determinados *loci* do que em outros e que o espectro da MSI varia com o tipo de câncer. Em câncer colorectal, um conjunto de cinco microssatélites (BAT26, BAT25, D2S123, D5S346 e D17S250) foi definido como painel de referência. Porém, sabe-se que este não é adequado para avaliação de MSI em outros tipos de

câncer (Boland *et al.*, 1998). Neste sentido, Onda *et al.* (2001) comprovaram a partir do marcador BAT-26, que os defeitos bioquímicos responsáveis pela MSI em câncer de tireoide são diferentes daqueles responsáveis em câncer colorretal. Consequentemente há uma necessidade de encontrar microssatélites adequados para a avaliação de MSI em outros tumores, como os de tireoide.

Embora a MSI não tenha sido inicialmente observada em câncer de tireoide (Vermiglio *et al.*, 1995), estudos subsequentes tem documentado MSI não apenas no câncer de tireoide, mas também em bócio benigno e adenomas foliculares da tireoide (Dobosz *et al.*, 2000). Esses estudos suportam a idéia de que a MSI tem um importante papel na carcinogênese de tireoide.

Existem trabalhos relatando alterações epigenéticas no gene *MLH1* no desenvolvimento, progressão e metástase em cânceres de tireoide. A instabilidade de microssatélites de alto nível pode estar associada a defeitos no reparo do gene *MLH1* cuja metilação está associada à metástase do linfonodo no PTC predispondo a célula à mutação BRAF V600E (Guan *et al.*, 2008; Gatzidou *et al.*, 2010).

Lazzereschi *et al.* (1999) observaram uma influência de MSI na biologia de tumores foliculares da tireoide e lesões ligadas ao tumor. Assim como Mitmaker *et al.* (2008) que mostraram um aumento na incidência de MSI em carcinomas papilares e foliculares. Além disso, uma significativa diferença na frequência de MSI entre adenomas foliculares e carcinomas foliculares foi observada. Por outro lado, vários estudos relataram maior frequência de MSI em lesões benigna da tireoide em comparação com lesões malignas (Soares *et al.*, 1997; Lazzereschi *et al.*, 1999; Vaish *et al.*, 2003). Além disso, um estudo mais recente mostrou MSI em 70% de tumores benignos e 65% das lesões malignas da tireoide, e afirmou que a deficiência de iodo pode influenciar a MSI, alterando a via molecular que leva para ao carcinoma folicular e anaplásico (Vaish *et al.*, 2004).

A descoberta de tumores benignos da tireoide e lesões tumorais, apontando MSI em vários *loci* sugerem que a MSI pode ser um evento precoce na tumorigênese da tireoide, assim como sustentado por diversos estudos, que mostram a MSI em algumas displasias pré-cancerosas do estômago (Loeb, 1991; Rhyu *et al.*, 1994), adenomas e/ou displasias do cólon e metaplasia de Barrett do esôfago (Meltzer *et al.*, 1994).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o padrão de metilação dos genes *MGMT* e *MLH1* correlacionando com o perfil de instabilidade de microssatélites e com as mutações *BRAF V600E*, *RET/PTC* e *IDH1* em pacientes com carcinoma de tireoide.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Estudar o padrão de metilação da região promotora e expressão dos genes *MLH1* e *MGMT*.
- Avaliar a instabilidade de microssatélites usando os marcadores: BAT26, BAT25, BAT40, D2S123, D11S912, D17S250 e D5S346.
- Correlacionar o padrão de instabilidade de microssatélites e de metilação de *MLH1* e *MGMT* com a presença de mutações nos genes *BRAF*, *RET/PTC* e *IDH1*.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Casuística**

Foram incluídos no presente estudo 105 pacientes, de ambos os sexos com mais de 18 anos que foram submetidos à tireoidectomia total entre 2000 e 2010 no Hospital São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, e Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de São Paulo, sob responsabilidade da Professora Dra. Janete Cerutti. Destes, 77 amostras foram oriundas de casos PTC, 13 de FTC e 15 casos de tecido de tireoide benigno.

As amostras foram congeladas imediatamente após a coleta das biópsias e armazenadas em freezer -80°C até o uso. A classificação histológica final foi obtida a partir de cortes de parafina corados com hematoxilina e eosina. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Comissões de Pesquisa de ambas as Universidades e foi conduzido de acordo com a Declaração de Princípios Helsinki.

Além disso, para a validação dos marcadores usados para a determinação de instabilidade de microssatélites foram incluídas 50 amostras de DNA extraído de sangue periférico de voluntários sadios do banco de DNA da UNIFAG da Universidade São Francisco.

## **3.2 Análise do padrão de metilação**

### *3.2.1 Extração de DNA e Tratamento com Bissulfito de Sódio*

As biópsias endócrinas foram utilizadas para a extração de DNA genômico, a qual foi realizada de acordo com o protocolo de fenol-clorofórmio. As biópsias foram ressuspensas em 300  $\mu$ L de solução tampão (Tris-HCl 50mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0; tween 0,5 %), adicionando 15 $\mu$ L de solução de proteinase K (10 mg/mL). As amostras foram incubadas à 37°C por pelo menos 2 horas. Em seguida, o DNA foi purificado por meio de centrifugações com Fenol/Clorofórmio, e precipitado com acetato de sódio 3M.

Para o tratamento com bissulfito de sódio foi utilizado o kit comercial EpiTect® Bisulfite (Qiagen, Valencia, Calif., USA) seguindo as recomendações do fabricante. Em resumo, ocorreu a conversão das citosinas não metiladas pelo bissulfito de sódio usando um termociclador nas seguintes condições: 5 minutos a 95°C para a denaturação, 25 minutos a 60°C de incubação, 5 minutos a 95°C para denaturação, 85 minutos a 60°C de incubação, 5 minutos a 95°C para denaturação, 175 minutos a 60°C de incubação e armazenamento a 20°C infinito. O DNA então foi transferido para a membrana da coluna EpiTect e lavado. Posteriormente, houve a desulfonação do DNA seguida de lavagens para remover totalmente o agente desulfonante. Por fim, houve a eluição do DNA convertido pela centrifugação da coluna.

### 3.2.2 High Resolution Melting (HRM)

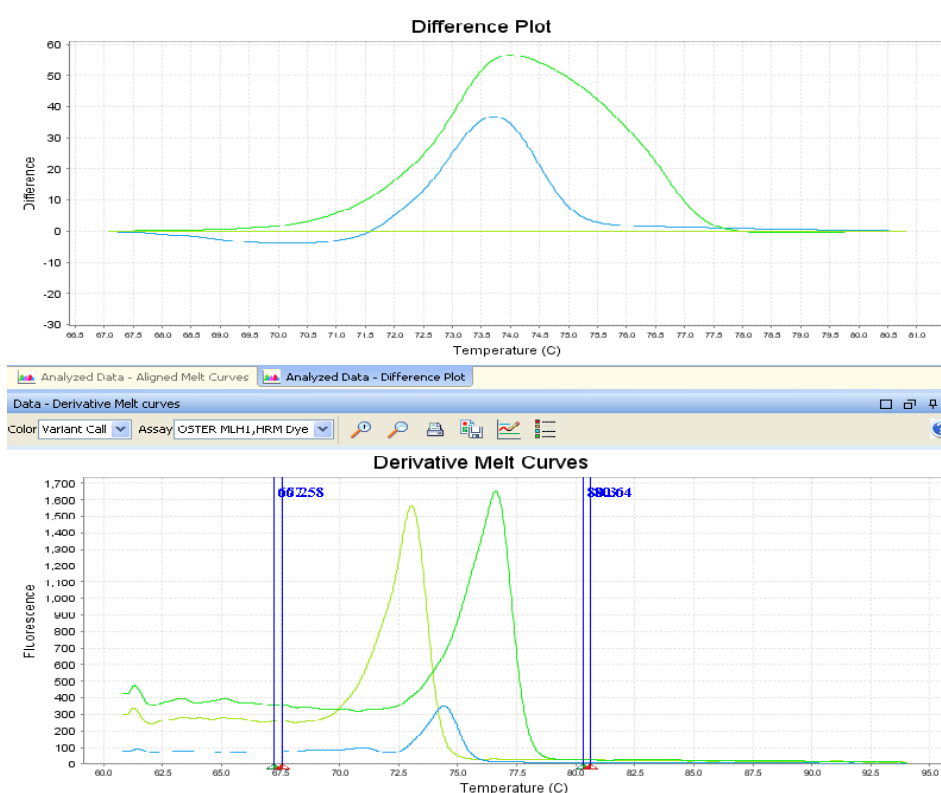
Para a análise de metilação, foi realizada a amplificação da região promotora dos genes *MLH1* e *MGMT* por PCR em tempo real e *high resolution melting* (HRM) realizada no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Esta técnica é baseada no monitoramento preciso da mudança de fluorescência do *melting* do duplex de DNA. Como em PCR em tempo real, o HRM utiliza a capacidade de certos corantes de fluorescência intercalarem com a dupla fita de DNA com alta precisão. A discriminação entre as sequências metiladas e não metiladas foi feita após a modificação do DNA alvo com bissulfito de sódio. O bissulfito de sódio converte as citosinas não metiladas em uracila e deixa intactas as citosinas metiladas. Portanto, o produto da PCR de uma amostra alvo metilada tem uma temperatura de *melting* mais elevada do que de uma amostra não metilada, e assim é possível fazer uma comparação das amostras de interesse com as amostras alvo e determinar as diferenças pela análise de *melting* (Figura 4).

A PCR foi realizada em um volume final de 20µl utilizando 10 µl de *MeltDoctor*<sup>TM</sup> *HRM Master Mix* (Applied Biosystems) contendo cloreto de magnésio, dNTPs, *MeltDoctor*<sup>TM</sup> *HRM dye* e *AmpliTaq Gold*<sup>®</sup> 360 DNA Polimerase a uma concentração de 2X. Posteriormente, foram acrescentados ao mix 5 µM dos *primers* (Tabela 2), específico para cada gene, 20 ng/µL do DNA genômico tratado com bissulfito de sódio e 6,6 µL de água.

Para amplificação foi usado o ciclo descrito a seguir: 10 minutos a 95°C, para ativação da enzima, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para denaturação e 1 minuto a 60°C para o anelamento e extensão. A dissociação consistiu de 10 segundos a 95°C para denaturação, 1 minuto a 60°C para anelamento dos *primers* e 15 segundos a 95°C com 1% de rampa para a captação do HRM e por fim, 15 segundos a

uma temperatura de 60°C para reanelamento dos *primers*. Todas as reações foram feitas em triplicata.

A curva de *melting* foi normalizada pelo cálculo da “*line of best fit*” entre as duas regiões de normalização, antes e depois da queda de fluorescência, representando o *melting* do produto de PCR, usando o 7500 *software* v2.0. Este algoritmo permite a comparação direta entre as amostras que têm diferentes níveis de partida de fluorescência.



**Figura 4** – Representação das diferenças na temperatura de *melting* obtidas por HRM. Amarelo – não metilado; Verde- 100% metilado; Azul – intermediariamente metilado.



**Tabela 2 – Primers utilizados para análise de metilação**

<b>Primers</b>	<b>Sequência (5'- 3')</b>
<b>MLH1</b>	TATATCGTTCGTAGTATTCGTGT TCCGACCCGAATAAACCCAA
<b>MGMT</b>	TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC GCACTCCGAAAACGAAACG

### **3.3 Instabilidade de Microssatélites**

A análise da instabilidade de microssatélite foi realizada por PCR-SSCP (*Polymerase chain reaction - single strand conformation polymorphism*) e validadas por HRM, usando os *primers* específicos para cada um dos marcadores BAT25, BAT26, BAT40, D2S123, D11S912, D5S346 e D17S250 (Tabela 3).

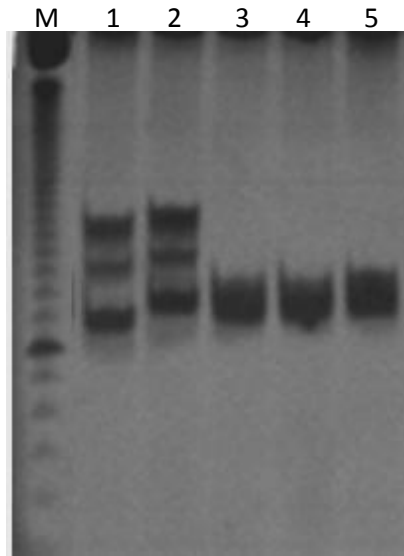
A PCR foi realizada da seguinte maneira: para um volume final de 25 µL, 200 ng de DNA, 2,5 µL 10X Tampão PCR, 1 µmol/L primer, 1,5-2,0 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 200 µmol/L dNTPs e 0,5 U de Taq polimerase, sendo amplificada por 1 ciclo a 95°C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos a 55-58°C por 30 segundos e 72°C por 15 segundos e um ciclo final de 72°C por 1 minuto.

Após a reação de PCR, 12 µL do produto de PCR foram misturados com 12 µL de tampão desnaturante (Formamida 95%, 20 mM EDTA, 0,05% de azul de bromofenol), desnaturado a 97°C durante 10 minutos, mantidos em gelo, e logo aplicado num gel de poliacrilamida 6% (Figura 5). As bandas foram visualizadas com nitrato de prata.

A presença de MSI foi definida pelo aparecimento de uma mobilidade de banda de qualquer um dos alelos ou ante a presença de uma nova banda de tamanho diferente quando comparadas com o controle. Quando nenhum marcador apresentou instabilidade foi considerado estável (MSS).

**Tabela 3** – *Primers* utilizados para análise de MSI

<b>Marcador</b>	<b><i>Primer (5'-3')</i></b>
<b>BAT-25</b>	TCGCCTCCAAGAATGTAAGT TCTGCATTTTAACTATGGCTC
<b>BAT-26</b>	TGACTACTTTTGACTTCAGCC AACCATTCAACATTTTTAAACC
<b>D5S346</b>	ACTCACTCTAGTGATAAATCG AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT
<b>BAT40</b>	GTAGAGCAAGACCACCTT AATAACTTCCTACACCACAAC
<b>D2S123</b>	AATGGACAAAAACAGGATGC CCCTTTCTGACTTGGATACC
<b>D11S912</b>	TACTGCTTTGGGTATGCATATG GCTTTTTGTCTAGCCATGATTG
<b>D17S250</b>	GGAAGAATCAAATAGACAA GCTGGCCATATATATATTTAAACC



**Figura 5** – Gel de poliacrilamida ilustrando análise de MSI. M – Marcador de peso molecular 100pb; 1 e 2 – amostras instáveis; 3, 4 e 5 – amostras estáveis.

### 3.4 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA foi feita usando-se o *RNeasy<sup>®</sup> tissue kit* (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante. Após a extração, ~100 ng de RNA foram usados para a síntese do cDNA usando o *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems) seguindo as recomendações do fabricante.

### 3.5 Quantificação da expressão por PCR em tempo real

A análise de expressão dos genes *MLH1* e *MGMT* e do gene constitutivo  $\beta$ -*actina* foram feitas por meio da PCR em tempo real. Os *primers* utilizadas neste estudo foram desenhados usando o software *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Tabela 4). A reação de PCR em tempo real foi feita usando o *Platinum<sup>®</sup> SYBR GREEN<sup>®</sup> qPCR Supermix UDG* (Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante. A reação continha para cada 50 $\mu$ L: 25 $\mu$ L de *Platinum<sup>®</sup> SYBR GREEN<sup>®</sup> qPCR Supermix UDG* (Invitrogen), 10 $\mu$ M de cada *primer* e 10 $\mu$ L de cDNA (50ng). Para amplificação foi usado o ciclo descrito a seguir: 2 min a 50°C de pré-tratamento de UDG (Uracil-DNA Glicosilase) e desnaturação de 2 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 59°C por 15 s, e uma extensão a 72°C por 30 s, seguida de uma análise de curva de *melting* (40 ciclos com um decréscimo de 1°C a cada 15 s iniciando-se em 95°C). Através desta análise foi possível averiguar a especificidade da reação de amplificação, uma vez que o fluoróforo usado emite luz sempre que um dímero de DNA é formado. A reação de PCR em tempo real foi realizada no equipamento 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e o  $C_t$  determinado com o auxílio do RQ Study Software (Applied Biosystems).

Os experimentos foram feitos em triplicata, e as amostras normalizadas usando o controle constitutivo. A expressão relativa foi calculada de acordo com a fórmula  $2^{-\Delta C_t}$  onde  $\Delta C_t$  representa a média do  $C_t$  do gene experimental observado no tumor menos a média do  $C_t$  do gene de referência (BUCKHAULTS *et al.*, 2001).

**Tabela 4 – Primers utilizados para análise da expressão gênica**

<b>Primers</b>	<b>Sequência (5'- 3')</b>
<b>MLH1</b>	CGGTTAACTACCCAATGCCTCAAC
	TTCTCGACTAACAGCATTTCCAA
<b>MGMT</b>	CACCACACTGGACAGCCCTTT
	CGAACTTGCCCAGGAGCTTTATTT
<b><math>\beta</math> actina</b>	ACACTGGCTCGTGTGACAAGG
	CGGCTAATACACACTCCAAGGC

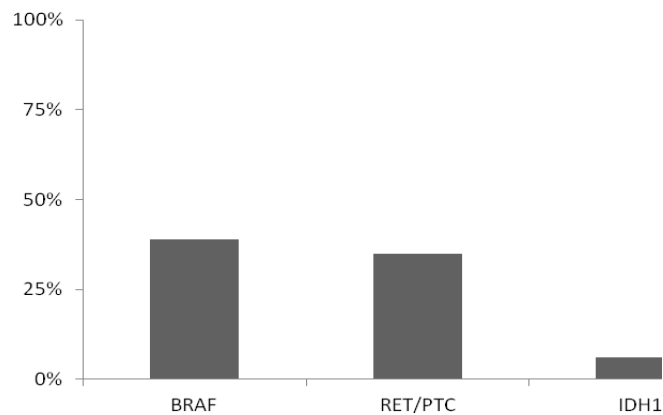
### **3.6 Análise dos Dados**

Os dados categóricos foram apresentados por meio de frequências e porcentagens. A associação entre as variáveis categóricas foram comparadas pelo teste qui-quadrado. A significância estatística dos dados de expressão gênica foi determinada por teste t não pareado. Valores  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Todos os dados obtidos foram analisados usando o programa estatístico SPSS 12.0 (SPSS Inc., USA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise do perfil mutacional de BRAF V600E, RET/PTC e IDH1

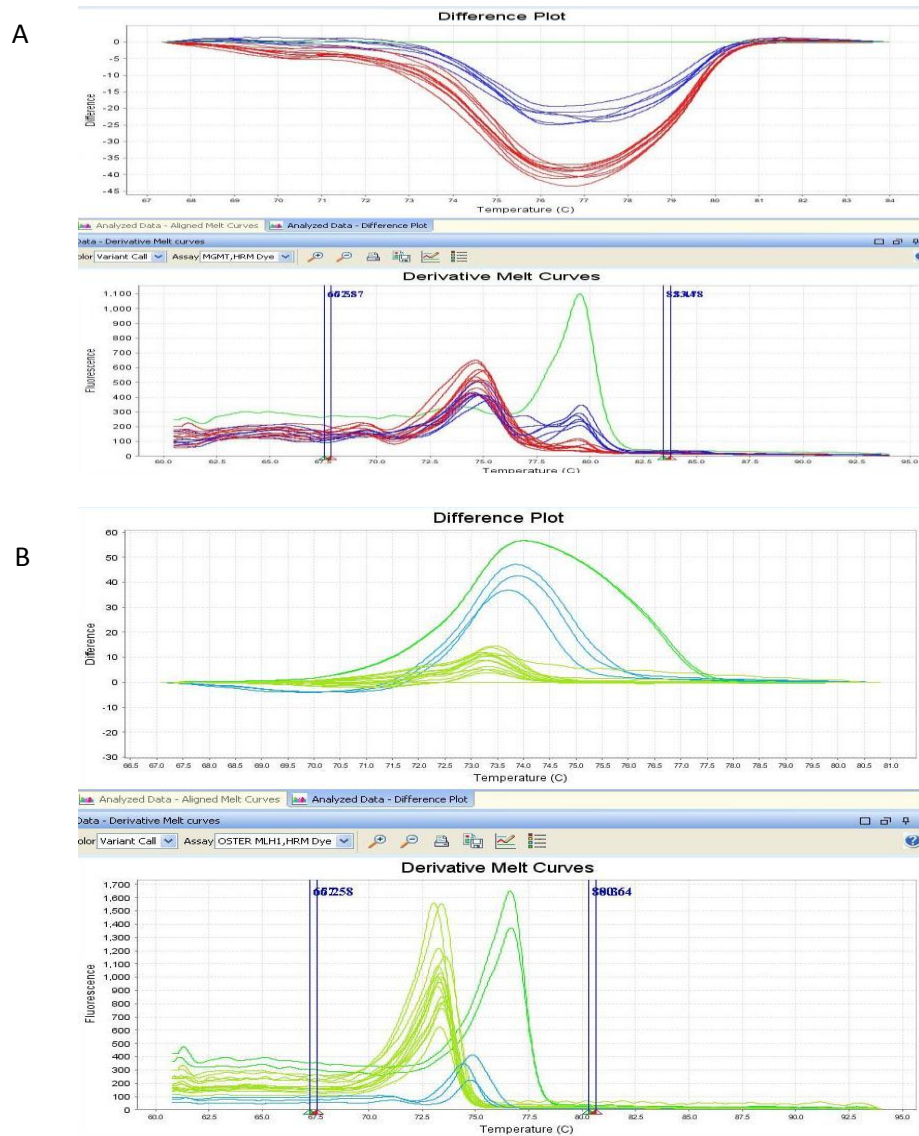
Foram estudados 77 casos de PTC, 13 casos de FTC e 15 amostras oriundas de tecidos benignos de tireoide. A caracterização do perfil mutacional destas amostras foi realizado por sequenciamento direto dos genes (Oler and Cerutti 2009; Hemerly *et al.*, 2010). As mutações exclusivas de PTC, *BRAF V600E* e *RET/PTC*, foram encontradas em 39% e 35% das amostras, respectivamente. Já em relação à mutação *IDH1*, foi observada uma prevalência de 6% em PTC (Figura 6) e 31% em FTC. O grupo de amostras benignas não apresentou nenhuma mutação.



**Figura 6** – Frequência de mutações no grupo PTC

## 4.2 Padrão de metilação e expressão de *MGMT* e *MLH1*

A metilação da região promotora de dois genes de reparo ao DNA, *MGMT* e *MLH1*, foi feita pela técnica de HRM (Figura 7).



**Figura 7** – A) Curvas de *melting* mostrando diferenças no padrão de metilação de *MGMT*. Vermelho – Não metilado; Azul – 50% Metilado; Verde – 100% metilado. B) Curvas de *melting* mostrando diferenças no padrão de metilação de *MLH1*. Verde claro – Não metilado; Azul – 50% Metilado; Verde Escuro - 100% metilado

Baseado nestas análises, os resultados indicam que em PTC, *MGMT* e *MLH1* foram considerados hipermetilados em 66% e 45% dos casos, respectivamente, em PTC, enquanto em FTC, a região promotora do gene *MGMT* foi considerada hipermetilada em 77% das amostras ao passo que no gene *MLH1*, a hipermetilação foi detectada em 38% das amostras. O grupo benigno apresentou 53% de amostras metiladas para *MGMT* e 60% para *MLH1* (Tabela 5).

**Tabela 5 – Padrão de metilação de *MGMT* e *MLH1***

<b>Subtipos</b>	<b>Metilação</b>	
	<i>MGMT</i>	<i>MLH1</i>
<b>Histológicos</b>		
PTC	51/77 (66%)	35/77 (45%)
FTC	10/13 (77%)	5/13 (38%)
Benigno	8/15 (53%)	9/15 (60%)

É importante ressaltar que em todos os pacientes foi detectada uma diminuição significativa nos níveis de expressão de *MGMT* nas amostras hipermetiladas no subgrupo PTC (Tabela 6).



**Tabela 6** – Padrão de expressão de *MGMT* e *MLH1* em amostras metiladas ou não metiladas

Subtipo	<i>MGMT</i>		<i>MLH1</i>	
	Metilado	Não Metilado	Metilado	Não Metilado
PTC	1,19±0.01*	3,06±0.07	3,79±0.16	4,77±0.21

\*p<0,05 quando comparado ao grupo *MGMT* não metilado

Além disso, avaliou-se a associação entre a metilação da região promotora dos genes *MGMT* e *MLH1* em PTC e FTC para cada mutação. As mutações *BRAF* e *RET/PTC* não mostraram associações significativas entre a metilação da região promotora de *MGMT* e/ou *MLH1*. No entanto, em relação mutação *IDH1* no grupo FTC, os dados mostraram uma diferença significativa tanto para metilação de *MGMT* quanto para *MLH1*, com valores de p de 0,02 e 0,04, respectivamente (Tabela 7).

**Tabela 7** – Frequência de metilação de *MGMT* e *MLH1* por mutação e subtipo histológico.

		<b>Genes</b>				
		<b>Mutações</b>	<b><i>MGMT</i> M</b>	<b><i>MGMT</i> U</b>	<b><i>MLH1</i> M</b>	<b><i>MLH1</i> U</b>
<b>PTC</b>	<b>BRAF</b>	Sim	72%	28%	28%	72%
		Não	54%	46%	54%	46%
	<b>RET/PTC</b>	Sim	52%	48%	56%	44%
		Não	64%	36%	39%	61%
	<b>IDH1</b>	Sim	80%	20%	40%	60%
		Não	60%	40%	46%	54%
<b>FTC</b>	<b>IDH1</b>	Sim	50%*	50%	87%*	13%
		Não	89%	11%	50%	50%

\*p <0, 05 quando comparado com o grupo selvagem IDH1 das amostras oriundas de FTC; M –metilado, U – não metilado; Sim – presença da mutação, Não – ausência da mutação.

Houve uma tendência estatisticamente significativa em relação à metilação dos genes *MGMT* e *MLH1* e níveis mais baixos de expressão no grupo *BRAF* mutante (3,1 vezes e 2,4 vezes, respectivamente) quando comparados ao grupo não metilado de cada gene (Tabela 8). Os níveis de expressão de *MGMT* e *MLH1* das amostras metilados e mutantes *RET/PTC* mostraram um silenciamento gênico de 1,7 vezes e 1,6 vezes, respectivamente. A análise da relação entre a mutação *IDH1* e o nível de expressão de ambos os genes *MLH1* e *MGMT* metilados teve uma diminuição significativa no nível de expressão em 23 vezes e 1,8 vezes, respectivamente. Quanto aos pacientes FTC e *IDH1* mutantes nossos dados também mostraram uma diminuição

estatisticamente significativa nos níveis de expressão das amostras *MGMT* metiladas (10,6 vezes).

**Tabela 8** – Mutações e padrão de metilação em relação às expressões relativas dos genes *MGMT* e *MLH1*.

Subtipos	Padrão de metilação	BRAF	RET/PTC	IDH1
<b>Histológicos</b>				
PTC	<i>MGMT</i> metilado	0.69±0.16*	1.71±0.48	0.62±0.14 <sup>†</sup>
	<i>MGMT</i> não metilado	2.16±0.81	2.88±0.86	1.12±0.21
	<i>MLH1</i> metilado	2.18±0.76 <sup>#</sup>	2.89±0.91	0.25±0.041 <sup>&amp;&amp;</sup>
	<i>MLH1</i> não metilado	5.32±1.35	4.57±1.41	5.86±1.98
FTC	<i>MGMT</i> metilado	-	-	0.19±0.02 <sup>‡</sup>
	<i>MGMT</i> não metilado	-	-	2.05±0.91
	<i>MLH1</i> metilado	-	-	N/A
	<i>MLH1</i> não metilado	-	-	N/A

\*p <0,05 quando comparado ao grupo PTC mutante BRAF - *MGMT* não metilado; <sup>#</sup>p<0,05 quando comparado ao grupo PTC mutante BRAF - *MLH1* não metilado; <sup>†</sup>p<0,05 quando comparado ao grupo PTC mutante IDH1 - *MGMT* metilado; <sup>&&</sup>p<0,01 quando comparado ao grupo PTC mutante IDH1 - *MLH1* não metilado; <sup>‡</sup>p <0,05 quando comparado ao grupo FTC mutante IDH1 - *MGMT* metilado. N/A - Não avaliado.

### 4.3 Análise do perfil de MSI

Inicialmente, todos os marcadores de MSI foram avaliados em 50 amostras de DNA oriundas de voluntários sadios, armazenadas no banco de DNA do Laboratório de Biologia Molecular – UNIFAG – Universidade São Francisco – Bragança Paulista, com o propósito de determinar a acurácia de cada marcador. Os marcadores BAT25, BAT26 e D2S123 apresentaram melhores resultados, sendo totalmente estáveis para estas

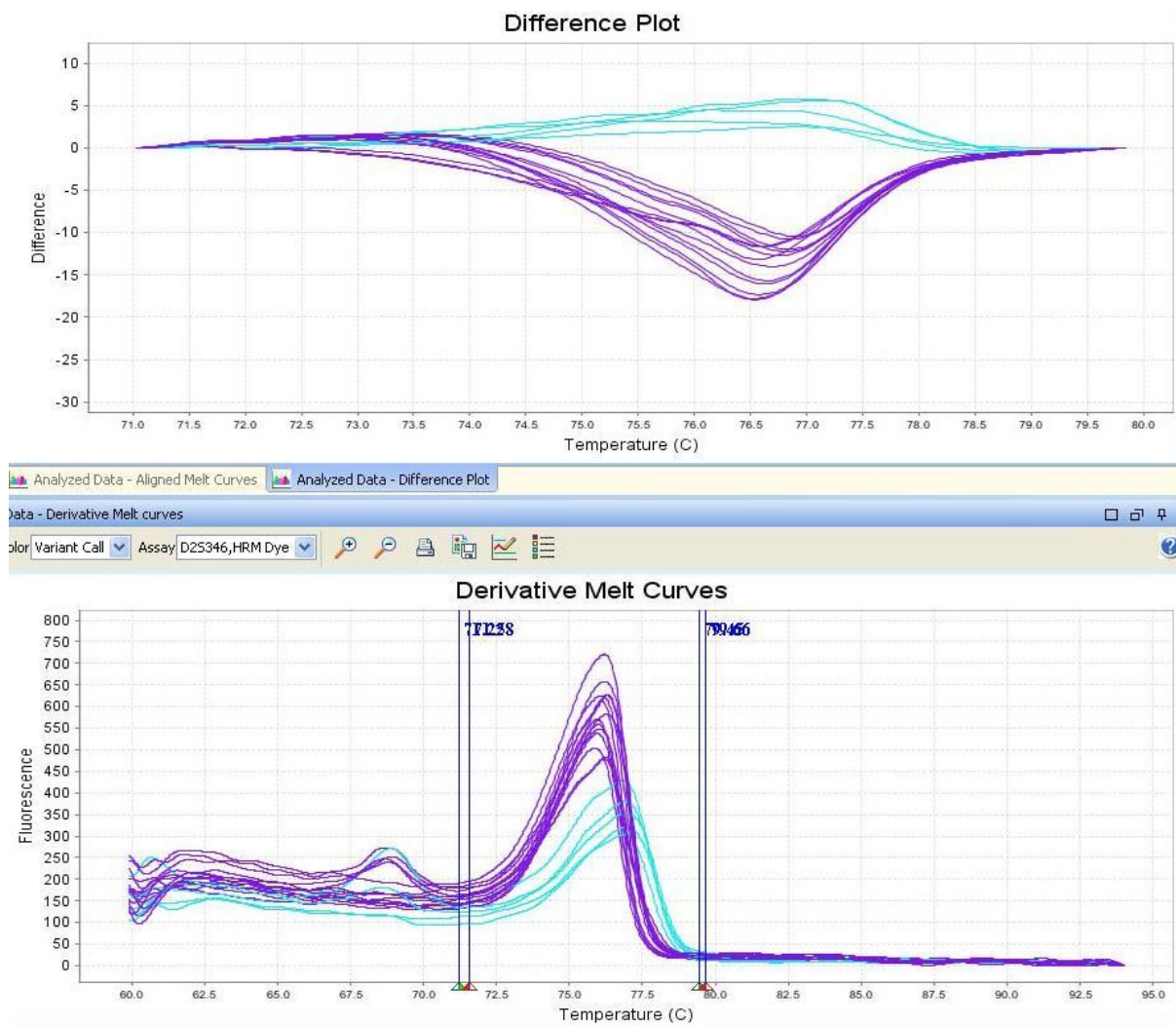
amostras. O marcador D17S250 também se mostrou eficaz em sua validação, com apenas 2% de instabilidade. Já os marcadores BAT40, D11S912 e D5S346 mostraram uma frequência de instabilidade de 10%, 20% e 12%, respectivamente (Tabela 9). Em relação aos pacientes com tumores malignos de tireoide (PTC e FTC), os marcadores que permitiram a melhor determinação do padrão de MSI foram D2S123, D17S250 e D5S346 respectivamente.

**Tabela 9 – Frequência de instabilidade por marcador**

Amostras	Marcadores						
	BAT25	BAT26	D2S123	D17S250	BAT40	D11S912	D5S346
Voluntários	0%	0%	0%	2%	10%	20%	12%
Câncer de tireoide	2%	10%	19%	39%	26%	32%	46%

Para determinar o padrão de MSI, além da PCR-SSCP, também foi selecionada uma parte das amostras (35%) para validação dos resultados por meio de HRM, como mostrado na Figura 8.

**Figura 8** – Diferenças nas curvas de *melting* obtidas por HRM para validação do padrão de MSI. Roxo – MSS; Azul – MSI.



Observou-se que a instabilidade de microssatélites foi mais frequente nos indivíduos do grupo maligno (Tabela 10). Em relação aos subgrupos histológicos, foram encontrados 84% de instabilidade em PTC, 92% em FTC e 46% no grupo benigno, com diferenças significativas em PTC e FTC quando comparados com o grupo benigno ( $p=0,001$  e  $p=0,009$ , respectivamente) (Tabela 10).

Para avaliar a significância da presença das mutações como um indicador de MSI, foi analisada a associação entre cada mutação com o perfil de MSI. Como mostrado na Tabela 10, a frequência de MSI nos casos PTC foi observada em 85% do grupo BRAF e RET/PTC mutantes e 20% do grupo IDH1 mutante, enquanto que no grupo FTC somente a mutação IDH1 mostrou padrão de MSI, com uma recorrência de 100%. Entretanto, nenhuma associação significativa entre MSI e qualquer mutação foi encontrada.

**Tabela 10** – Relação entre mutações e MSI por subtipo histológico

Subtipos Histológicos	Status de MSI (%)			
	Total	BRAF	RET/PTC	IDH1
PTC	65/77 (84%)*	23/27 (85%)	22/26 (85%)	1/5 (20%)
FTC	12/13 (92%)*	-	-	4/4 (100%)
Benigno	7/15 (46%)	-	-	-

\*p <0,01 quando comparado com o grupo benigno.

#### 4.4 Correlação entre metilação em *MGMT* e *MLH1* e MSI

Visto que a metilação aberrante de genes de reparo ao DNA como *MGMT* e *MLH1* pode prejudicar a transcrição gênica e, assim, predispor a instabilidade genômica na célula, avaliou-se a correlação do padrão de metilação destes genes com o status de MSI.

A hipermetilação da região promotora de *MGMT* foi associada de forma significativa com a MSI em pacientes que tinham os tumores PTC e FTC (p=0, 01), quando comparado ao grupo benigno. Em relação à associação entre metilação de

*MLH1* e MSI, não houve diferença estatisticamente significativa em qualquer subtipo histológico (Tabela 11).

**Tabela 11** – Padrão de metilação de *MGMT* e *MLH1* e status de MSI combinados

<b>Subtipos Histológicos</b>	<b><i>MGMT</i></b>	<b><i>MLH1</i></b>
	Metilados e instáveis	Metilados e instáveis
PTC	43/51 (84%)*	28/35 (80%)
FTC	9/10 (90%)*	4/5 (80%)
Benigno	3/8 (37%)	5/9 (55%)

\*p < 0,01 quando comparado ao grupo benigno.

Adicionalmente, avaliou-se a associação da instabilidade de microssatélites ao nível de expressão de *MGMT* e *MLH1* nos pacientes PTC, FTC e benigno e foi possível detectar que no grupo FTC, houve uma diminuição significativa nas expressões cujas amostras estavam instáveis, em ambos os genes (Tabela 12).

**Tabela 12** - Expressão de *MGMT* e *MLH1* nas amostras MSI e MSS

<b>Subtipos Histológicos</b>	<b>Expressão</b>	<b>MSI</b>	<b>MSS</b>
PTC	<i>MGMT</i>	1,93±0,04	1,74±0,02
	<i>MLH1</i>	8,55±1,34	9,85±1,99
FTC	<i>MGMT</i>	0,49±0,006*	1,53±0,02
	<i>MLH1</i>	13,26±2,58*	44,41±6,21
Benigno	<i>MGMT</i>	0,61±0,008	0,60±0,007
	<i>MLH1</i>	9,60±2,34*	14,16±3,10

\*p < 0,05 quando comparado às amostras MSS.

## 5. DISCUSSÃO

Ao longo das últimas décadas, a epigenética, particularmente o estudo da metilação na região promotora dos genes, obteve uma grande importância na pesquisa do câncer, pois muitos genes são silenciados através deste mecanismo durante o desenvolvimento do câncer (Xing, 2007). É sabido que os mecanismos de reparo ao DNA contribuem para a manutenção da integridade genômica, e que o silenciamento de genes de reparo ao DNA poderiam estar relacionados à ocorrência de mutações com potencial tumorigênico (Guan *et al.*, 2008). Desse modo, foi demonstrado que a instabilidade genômica, gerada por um defeito no sistema de reparo, poderia favorecer o aparecimento dessas mutações (Grady, 2004). Assim, avaliou-se os efeitos da metilação da região promotora de *MGMT* e *MLH1* na instabilidade genômica de acordo com o perfil mutacional em pacientes com tumores de tireoide.

Em relação ao perfil mutacional de PTC, os dados apresentados neste trabalho indicam que a prevalência de *BRAFV600E* e *RET/PTC* em nossa população corrobora a literatura, que apresenta uma variação entre 29 a 69% (Greco *et al.*, 2009). Mutações no gene *IDH1* têm sido amplamente associadas com glioblastoma, com uma frequência superior a 70%, porém são relativamente raras em outros cânceres (Bleeker *et al.*, 2009). Recentemente, a mutação *IDH1* foi encontrada em MTC, PTC (Bleeker *et al.*, 2009), ATC (Murugan *et al.*, 2010), FTC e variante folicular de PTC (FVPTC) (Hemerly *et al.*, 2010) de forma similar a este trabalho, que indicou 6% da mutação em PTC e 31% em FTC.

Ao avaliar-se o padrão de metilação da região promotora dos genes de reparo ao DNA *MGMT* e *MLH1*, observou-se uma alteração na frequência de metilação nos tumores benignos e malignos. É sabido que a metilação na região promotora pode levar a um silenciamento gênico. Desse modo, ao analisar os níveis de expressão de *MGMT* e *MLH1* verificou-se que ambos os genes foram reprimidos nas amostras metiladas.



Recentemente alguns autores têm mostrado que a expressão de *MGMT* é aumentada em pacientes com tumores malignos de tireoide, quando comparada ao tecido normal (Yilike *et al.*, 2010), e que com a malignização do tumor, há uma queda nesta expressão (Yilike *et al.*, 2010; Giaginis *et al.*, 2011). Por outro lado, tem sido demonstrado que a expressão de *MLH1* é aumentada com a malignização do fenótipo (Giaginis *et al.*, 2011).

Diversos estudos têm relacionado a metilação de *MGMT* com a mutação *IDH1* em pacientes com glioblastoma (Tuononen *et al.*, 2012), principalmente com uma maior resposta à temozolomida, uma droga quimioterápica alquilante (Songtao *et al.*, 2011). Resultados semelhantes foram encontrados neste estudo, no qual foram observadas diferenças significativas entre a metilação de *MGMT* e *MLH1* e a mutação *IDH1* em pacientes com FTC, bem como uma diminuição significativa nos níveis de expressão destes genes. Esta relação pode ser atribuída ao fato de que a inativação de *MGMT* favorece o surgimento de transições G para A e desta forma, pacientes com *MGMT* hipermetilados poderiam apresentar uma alta taxa da transição G395A no códon 132 de *IDH1* (Sanson *et al.*, 2009).

Sabe-se que a hipermetilação de *MLH1* está associada à mutação *BRAF V600E* em câncer de cólon. Uma vez que esta mutação também é recorrente em câncer de tireoide, avaliou-se o perfil de metilação e os níveis de expressão de *MLH1* em mutantes *BRAF V600E* oriundos de pacientes com PTC. Os dados apresentados neste trabalho não indicam nenhuma associação entre o perfil de metilação deste gene e a mutação *BRAF V600E*, mas foi encontrado uma diminuição significativa nos níveis de expressão de *MLH1* em amostras mutantes *BRAF V600E*, sugerindo uma possível metilação em outro sítio CpG ou outro mecanismo de inativação deste gene envolvido na carcinogênese de PTC. Embora em um estudo publicado por Guan *et al.* (2008) tenha sido reportado que a metilação de *MLH1* estaria associado à mutação *BRAF V600E*, este trabalho apresenta o viés de ter analisado um pequeno número de amostras.

Tumores da tireoide, bem como câncer colorretal, surgem através de uma série de mutações genéticas encontradas em uma variedade de genes diferentes. Estas mutações, majoritariamente somáticas, ocorrem em todo o genoma, em ambas as regiões intrônicas e exônicas. Mais especificamente, mutações somáticas que ocorrem nas regiões de microssatélites mostraram-se ligados à etiopatogenia de alguns tumores de órgãos sólidos (Bolland et al., 1998). Mudanças semelhantes ocorrem na glândula tireoide, e verificou-se o papel da MSI em lesões tanto benignas quanto malignas da tireoide.

Para o desenvolvimento deste estudo usou-se 7 marcadores comumente utilizados na literatura. Dentre estes os que apresentaram os melhores resultados foram D2S123, D17S250 e D5S346, respectivamente. Outro dado interessante mostrado neste trabalho é a pouca relevância dos marcadores BAT25, BAT26 e BAT40. Em um estudo recente Mitmaker *et al.* (2008) mostraram resultados semelhantes para o marcador D2S123 e D5S346, e a baixa relevância dos marcadores BAT26 e BAT40. Embora o marcador D11S912 tenha sido escolhido porque o cromossomo 11 carrega um gene supressor tumoral importante na tumorigênese da tireoide, os resultados apresentados neste trabalho e dados disponíveis na literatura indicam que este não é um bom marcador para análise da MSI em tumores de tireoide (Onda *et al.*, 2001). Em câncer colorretal existe um painel de referência composto por 5 marcadores (BAT26, BAT25, D2S123, D5S346 e D17S250), porém o caráter de MSI em tumores não-colônicos foi revisado por Boland *et al.* (1998), que concluiu que este painel, utilizado para avaliar MSI em câncer colorretal, não é adequado para servir como um painel de referência para outros tipos de câncer. Desta forma, o presente trabalho pôde caracterizar marcadores que melhor elucidem o envolvimento de MSI na tumorigênese da tireoide.

Atualmente existem poucos trabalhos mostrando o papel da MSI em câncer de tireoide. A partir do presente estudo, pode-se constatar que há uma maior incidência de MSI nos tumores malignos do que em lesões benignas da tireoide. De modo complementar, esses dados corroboram outros que indicam que a MSI pode influenciar

a biologia de tumores da tireoide (Lazzereschi *et al.*, 1999; Mitmaker *et al.*, 2008). Dessa forma, este estudo contribui para base de possíveis alvos terapêuticos, uma vez que a MSI é uma importante ferramenta no diagnóstico de tumores malignos de tireoide, cuja aplicação, futuramente, eliminaria a necessidade de remoção desnecessária da glândula ou favoreceria a remoção de um tumor maligno (Mitmaker *et al.*, 2008).

Tem sido sugerido que a MSI é um importante indicador de defeitos no sistema de reparo ao DNA, particularmente o sistema MMR, o qual poderia ser um potencial marcador prognóstico em tumores de tireoide (Vaish *et al.*, 2004). Embora não tenha sido observada uma relação entre metilação de *MLH1* e instabilidade, os resultados apresentados neste trabalho mostram que os níveis de expressão de *MLH1* foram menores nas amostras instáveis, sugerindo assim, uma possível falha no sistema de reparo ao DNA. Além disso, apesar de *MLH1* ser considerado o principal gene responsável pela MSI (Rossi, 2002), no presente estudo foi encontrada uma associação significativa entre a metilação da região promotora de *MGMT* e MSI nas amostras oriundas de PTC e FTC. Em seu trabalho, SVRCEK *et al.* (2010) indicaram um papel preferencial de inativação de *MGMT* na iniciação da MSI na carcinogênese de cólon. Sua hipótese é baseada em um modelo no qual deficiências em *MGMT* poderiam tanto favorecer a transformação celular através do desenvolvimento de um MMR deficiente, o que favoreceria a MSI, quanto poderia promover a iniciação de MSI pelo favorecimento da metilação da região promotora de *MLH1*, ou outros defeitos através de diferentes mecanismos, incluindo eventos transicionais na codificação da sequência de genes MMR. Esse mecanismo também poderia explicar o desenvolvimento de MSI no processo de carcinogênese de tireoide em nossas amostras.

Avaliou-se também se alguma das mutações estudadas estaria associada à MSI. Os dados apresentados nestes estudos indicam uma tendência na associação entre às mutações BRAF V600E e RET/PTC e a instabilidade genômica, porém de forma não significativa. Resultados semelhantes foram obtidos quando as variáveis mutações, MSI e metilação foram estudados. Consistente com o presente trabalho, Vilkin *et al.* (2009)

relatou que não existiam diferenças significativas entre a frequência de MSI, a metilação da região promotora de *MLH1*, ou a mutação *BRAF* em pacientes com câncer colorretal esporádico, apoiando a ideia de que modificações epigenéticas são eventos adquiridos em certos tipos de cânceres, e diferentes fatores ambientais têm sido propostos por afetar a metilação do DNA e resultar num fenótipo metilado (Samowitz *et al.*, 2006).

## 6. CONCLUSÃO

- Houve uma alteração no padrão de metilação de *MGMT* e *MLH1* nos tumores malignos (PTC e FTC), assim como uma redução na expressão de ambos os genes em PTC;
- A mutação *IDH1* no grupo FTC foi associada à metilação em *MGMT* e *MLH1*, bem como uma repressão do gene *MGMT*;
- A mutação *BRAF* não foi associada com a hipermetilação de *MLH1*, porém menores níveis de expressão deste gene foram observados nestas amostras;
- Os marcadores *D2S123*, *D17S250* e *D5S346* foram os mais adequados para seleção de um painel de referência para análise de MSI em tumores de tireóide;
- Houve uma maior incidência de MSI em tumores malignos do que em benignos da tireoide;
- Em tumores instáveis para os microssatélites analisados, observou-se uma redução nos níveis de expressão de *MGMT* e *MLH1* nos tumores FTC;
- Houve uma associação entre a metilação de *MGMT* e MSI nas amostras oriundas de PTC e FTC;
- A MSI não estava associada a nenhuma mutação estudada.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avruch J., Khokhlatchev A., Kyriakis J. M., Luo Z., Tzivion G., Vavvas D., Balss J., Meyer J., Mueller W., Korshunov A., Hartmann C., von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon132 mutation in brain tumors. **Acta Neuropathol**;116:597–602, 2008.

Bao S., Tibbetts R.S., Brumbaugh K.M., Fang Y., Richardson D.A., Ali A., Chen S.M., Abraham R.T, Wang X.F. ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. **Nature**. 411(6840):969-74, 2001.

Baylin S., Hoppener J., Steenberg P. *et al.* DNA methylation patterns of calcitonin gene in human cancers and lymphomas. **Cancers research**, 1986.

Bestor T. Gene silencing. Methylation meets acetylation. **Nature**, 1998.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev**. Jan 1;16(1):6-21, 2002

Bird A. Molecular biology. Methylation talk between histones and DNA. **Science**. Dec 7;294(5549):2113-5, 2001.

Bleeker F.E., Lamba S., Leenstra S., Troost D., Hulsebos T., Vandertop W.P., Frattini M., Molinari F., Knowles M., Cerrato A., Rodolfo M., Scarpa A., Felicioni L., Buttitta F., Malatesta S., Marchetti A., Bardelli A. IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. **Hum Mutat**; 30:7–11, 2009.

Boland C. R., Thibodeau S. N., Hamilton S. R., Sidransky D., Eshleman J. R., Burt R. W., Meltzer S. J., Rodriguez-Bigas M. A., Buckhaults P., Rago C, St Croix B, Romans K.E., Saha S., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler K.W. Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors. **Cancer Res**. 1;61(19):6996-7001, 2001.

Boland C. R., Thibodeau S. N., Hamilton S. R., Sidransky D., Eshleman J. R., Burt R. W., Meltzer S. J., Rodriguez-Bigas M. A., Fodde R., Ranzani G. N., Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. **Cancer Res**., 58: 5248–5257, 1998.

Bongarzone M.G., Butti, Fugazzola L., Pacini F., Pinchera A., Vorontsova T.V., Demidchik E.P., Pierotti M.A. Comparison of the breakpoint regions of ELE1 and RET genes involved in the generation of RET/PTC3 oncogene in sporadic and in radiation-associated papillary thyroid carcinomas. **Genomics** 42 252–259, 1997.

Buckhaults P., Rago C., St Croix B., Romans K.E., Saha S., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler K.W. Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors. **Cancer Res.** 61(19):6996-7001, 2001.

Canman C.E., Lim D.S., Cimprich K.A., Taya Y., Tamai K., Sakaguchi K., Appella E., Kastan M.B., Siliciano J.D. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. **Science** 281(5383):1677-9, 1998.

Castedo M., Perfettini J.L., Roumier T., Yakushijin K., Horne D., Medema R., Kroemer G. The cell cycle checkpoint kinase Chk2 is a negative regulator of mitotic catastrophe. **Oncogene**, 23(25):4353-61, 2004.

Chan J.K. Papillary carcinoma of thyroid: classical and variants. **Histol Histopathol** 5:241–257, 1990.

Chen H., Kunnimalaiyaan M., Van Compel J. J. Medullary thyroid cancer: the functions of Raf-1 and human achaete-scute homologue-1. **Thyroid**, vol. 15, no. 6, pp. 511– 521, 2005.

Chen H., Roberts J. R., Ball D. W., *et al.*, “Effective long-term palliation of symptomatic, incurable metastatic medullary thyroid cancer by operative resection,” **Annals of Surgery**, vol. 227, no. 6, pp. 887–895, 1998.

Christopher P. Gilfillan. Review of the genetics of thyroid tumours: diagnostic and prognostic implications. **ANJ surg**, 2010.

Ciampi R., Nikiforov Y.E. RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. **Endocrinology**. Mar;148(3):936-41, 2007.

Cook, M.; YU, X.; CHEN, H. Notch in the development of thyroid C-cells and the treatment of medullary thyroid cancer. **J Transl Res**, 2010.

Cyniak-Magierska A., Wojciechowska-Durczyńska K., Krawczyk-Rusiecka K., Zygmunt A., Lewiński A. Assessment of RET/PTC1 and RET/PTC3 rearrangements in fine-needle aspiration biopsy specimens collected from patients with Hashimoto’s thyroiditis. **Thyroid Research**, 4:5, 2011.

Davies H., Bignell G.R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., Teague J., Woffendin H., Garnett M.J., Bottomley W., Davis N., Dicks E., Ewing R., Floyd Y., Gray K., Hall S., Hawes R., Hughes J., Kosmidou V., Menzies A., Mould C., Parker A., Stevens C., Watt

S., DeGroot L.J., Kaplan E.L., McCormick M., Straus F.H. Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab** 71:414–424, 1990.

Derbel O., Limem S., Ségura-Ferlay C., Lifante J.C., Carrie C, Peix J.L., Borson-Chazot F., Bournaud C., Droz J.P., de la Fouchardière C. Results of combined treatment of anaplastic thyroid carcinoma (ATC). **BMC Cancer**. 1;11:469, 2011.

Dhomen N., Marais R. New insight into BRAF mutations in cancer. **Curr Opin Genet Dev** 17:31–39, 2007.

Dobosz T., Lukieniczuk T., Sasiadek M., Kuczynska A., Jankowska E., Blin N. Microsatellite instability in thyroid papillary carcinoma and multinodular hyperplasia. **Oncology**, 58: 305–310, 2000.

Farid N.R. p53 mutations in thyroid carcinoma: tidings from an old foe, **J. Endocrinol. Invest.** 24 536–545, 2001.

Feinberg A., Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature** 1983.

Feinberg A.P., Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature**. 301(5895):89-92, 1983.

Ferlay J., Bray F., Pisani P., Parkin D.M. GLOBOCAN2000: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Ver.1.0. IARC CancerBase No.5. Lyon: IARC Press. Available at

Fisher D.A.; Polk D.H. Development of thyroid. **Bailliere's Clin Endocrin Metabol**, 1989.

Fodde R., Ranzani G. N., Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. **Cancer Res**. 58: 5248–5257, 1998.

Franco R., Schoneveld O., Georgakilas A., Panayiotidis M. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. **Cancer Letters**. 2008.

Frattini M., Ferrario C., Bressan P., Balestra D., De Cecco L., Mondellini P., Bongarzone I, Collini P., Gariboldi M., Pilotti S., Pierotti M.A., Greco A. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. **Oncogene** 23:7436–7440, 2004.

Fuks F., Hurd P.J., Deplus R., Kouzarides T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. **Nucleic Acids Res**. 31(9):2305-12, 2003.



Garnett M.J., Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. **Cancer Cell** 6:313–319, 2004.

Gately D.P., Hittle J.C., Chan G.K., Yen T.J. Characterization of ATM expression, localization, and associated DNA-dependent protein kinase activity. **Mol Biol Cell.** Sep;9(9):2361-74, 1998.

Gatzidou E.; Michailidi C.; Tseleni-Balafouta S.; Thocharis S. An epitome of DNA related genes and mechanisms in thyroid carcinoma. **Cancer Letters.** 2010.

Giaginis C., Michailidi C., Stolakis V., Alexandrou P., Tsourouflis G., Klijanienko J., Delladetsima I., Theocharis S. Expression of DNA repair proteins MSH2, *MLH1* and *MGMT* in human benign and malignant thyroid lesions: an immunohistochemical study. **Med Sci Monit.** Feb 25;17(3):BR81-90, 2011.

Gilliland F.D., Hunt W.C., Morris D.M., Key C.R. Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15,698 cases from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973- 1991. **Cancer**; 79(3):564-73, 1997.

Golbert L., Wajner S.M., Rocha A.P., Maia A.L., Gross J.L. Differentiated thyroid carcinoma: initial evaluation and follow-up. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** 49(5):701-10, 2005.

Grady W.M: Genomic instability and colon cancer. **Cancer Metastasis Rev**, 23(1-2):11-27, 2004.

Greco A., Borrello M.G., Miranda C., Degl'Innocenti D., Pierotti M.A. Molecular pathology of differentiated thyroid cancer. **Q J Nucl Med Mol Imaging.** 53(5):440-53. Review, 2009.

Guan H. *et al*; Hypermethylation of the DNA Mismatch Repair Gene *hMLH1* and Its Association With Lymph Node Metastasis and T1799A BRAF Mutation in Patients With Papillary Thyroid Cancer. **American Cancer Society**, 2008.

Guo C.Y., Brautigan D.L., Larner J.M. ATM-dependent dissociation of B55 regulatory subunit from nuclear PP2A in response to ionizing radiation. **J Biol Chem.** 277(7):4839-44, 2002.

Hemerly J. P., Bastos A.U., Cerutti J. M. Identification of several novel non-p.R132 IDH1 variants in thyroid carcinomas. **European Journal of Endocrinology** 163 747–755, 2010.

Herman J., Umar A., Polyak K., *et al*. Incidence and functional consequences of *hMHL1* promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. **Proc. Natl. Acad Sci USA** 1998.

Hermann A., Gowher H., Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. **Cell Mol Life Sci.** 61(19-20):2571-87, 2004.

Hooper S., Wilson R., Jayatilake H., Gusterson B.A., Cooper C., Shipley J., Hargrave D., Pritchard-Jones K., Maitland N., Chenevix-Trench G., Riggins G.J., Bigner D.D., Palmieri G., Cossu A., Flanagan A., Nicholson A., Ho J.W., Leung S.Y., Yuen S.T., Weber B.L., Seigler H.F., Darrow T.L., Paterson H., Marais R., Marshall C.J., Wooster R., Stratton M.R., Futreal P.A. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature** 417:949–954, 2002.

Hoque M.O., Rosenbaum E., Westra W.H., Xing M., Ladenson P., Zeiger M.A., Sidransky D. Quantitative assessment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms. **J Clin Endocrinol Metab**, 2005.

Hoshino R., Chatani Y., Yamori T., Tsuruo T., Oka H., Yoshida O., Shimada Y., Ari-i S., Wada H., Fujimoto J., Kohno M. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. **Oncogene** 18:813–822, 1999.

Hou P.; Ji M.; Xing M. Association of PTEN Gene Methylation With Genetic Alterations in the Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Signaling Pathway in Thyroid Tumors. **American Cancer Society**, 2008.

Hu S., Liu D., Tufano R.P., Carson K.A., Rosenbaum E., Cohen Y., Holt E.H., Kiseljak-Vassiliades K., Rhoden K.J., Tolaney S., Condouris S., Tallini G., Westra W.H., Umbricht C.B., Zeiger M.A., Califano J.A., Vasko V., Xing M. Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF Mutation in papillary thyroid cancer. **Int J Cancer** 119:2322–2329, 2006.

Hundahl S.A., Fleming I.D., Fremgen A.M., Menck H.R. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma Treated in the U.S., 1985-1995. **Cancer**; 83:2638-2648, 1998.

Ishida E., Nakamura M., Shimada K. *et al.* DNA hypermethylation status of multiple genes in papillary thyroid carcinomas. **Pathobiology**. 74: 344–52, 2007.

Jemal A., Siegel R., Ward E., *et al.*, Cancer Statistics, **CA Cancer J Clin** 56: 106-130, 2006.

Kanai Y., Hirohashi S. Alterations of DNA methylation associated with abnormalities of DNA methyltransferases in human cancers during transition from a precancerous to a malignant state. **Carcinogenesis**. 28(12):2434-42, 2007.

Kebebew E., Kikuchi S., Duh Q.-Y., Clark O. H. “Long-term results of reoperation and localizing studies in patients with persistent or recurrent medullary thyroid cancer,” **Archives of Surgery**, vol. 135, no. 8, pp. 895–901, 2000.

Kebebew E., Weng J., Bauer J., Ranvier G., Clark O.H., Duh Q.Y., Shibru D., Bastian B., Griffin A. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. **Ann Surg.** 246(3):466-70; discussion 470-1, 2007.

Keelawat S., Poumsuk U. Association between different variants of papillary thyroid carcinoma and risk-group according to AMES (age, metastasis, extent and size) classification system. **J Med Assoc Thai** 89:484–489, 2006.

Kim K.H., Kang D.W., Kim S.H., Seong I.O., Kang D.Y. Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. **Yonsei Med J.** 45(5):818-21, 2004.

Kim T.Y.; Kim W.B.; Rhee Y.S.; Song J.Y.; Kim J.M.; Gong G.; Lee S.; Kim S.Y.; Kim S.C.; Hong S.J.; Shong Y.K. The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with convectional papillary thyroid carcinoma. **Clin Endocrinol** 65:364-368, 2006.

Kimura E.T.; Nikiforova M.N.; Zhu Z.; Kauf J.A.; Nikiforov Y.E.; Fagin J.A. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. **Cancer Res** 63: 1454-1457, 2003.

Klose R.J., Bird A.P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends Biochem Sci.** 31(2):89-97, 2006.

Klugbauer S., Pfeiffer P., Gassenhuber H., Beimfohr C., Rabes H.M. RET rearrangements in radiation-induced papillary thyroid carcinomas: high prevalence of topoisomerase I sites at breakpoints and microhomology-mediated end joining in ELE1 and RET chimeric genes, **Genomics** 73 149–160, 2001.

Knauf J.A., Ma X., Smith E.P., Zhang L., Mitsutake N., Liao X.H., Refetoff S., *et al.* Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. **Cancer Res.** 65:4238–45, 2005.

Kohno M., Pouyssegur J. Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. **Ann Med** 38:200–211, 2006.

Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. **Biochem J.** 351 Pt 2:289-305, 2000.

Landa I., Robledo M. Association studies in thyroid cancer susceptibility: are we on the right track? **J Mol Endocrinol.**;47(1):R43-58, 2011.

Lang B.H., Lo C.Y., Chan W.F., Lam A.K., Wan K.Y. Classical and follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a comparative study on clinicopathologic features and long-term outcome. **World J Surg** 30:752–758, 2006.

Lazzereschi D., Palmirotta R., Ranieri A. *et al*: Microsatellite instability in thyroid tumors and tumor-like lesions. **Br J Cancer**; 79: 340–45, 1999.

Lee D.F., Drouin R., Pitsikas P., Rainbow A.J. Detection of an involvement of the human mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 in nucleotide excision repair is dependent on UVC fluence to cells. **Cancer Res.** 64(11):3865-70, 2004.

Lee S.M., Koh H.J., Park D.C., Song B.J., Huh T.L., Park J.W. Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. **Free Radic Biol Med** 32:1185–1196, 2002.

Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. **Cancer Res**, 51, 3075-3079, 1991.

Lu H., Yue J., Meng X., Nickoloff J.A., Shen Z. BCCIP regulates homologous recombination by distinct domains and suppresses spontaneous DNA damage. **Nucleic Acids Res**, 35(21):7160-70, 2007.

Mazzaferri E.L. An overview of the management of thyroid cancer. In: Mazzaferri EL, Harmer C, Mallick UK, Kendall-Taylor P, eds. Practical management of thyroid cancer: a multidisciplinary approach. **London: Springer-Verlag**; 1–28, 2006.

Mazzaferri E.L., Jhiang S.M. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. **Am J Med** 97:418–428, 1994.

Mazzaferri E.L., Kloos R.T. Clinical review 128: current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. **J Clin Endocrinol Metab** 86:1447–1463, 2001.

Meltzer S.J., Yin J., Manin B. *et al*. Microsatellite instability occurs frequently and in both diploid and aneuploid cell population of Barrett's associated esophageal adenocarcinoma. **Cancer Res** 54, 3379-3382, 1994.

Mercer K.E., Pritchard C.A. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. **Biochim Biophys Acta** 1653:25–40, 2003.

Michels J.J., Jacques M., Henry-Amar M., Bardet S. Prevalence and prognostic significance of tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. **Hum Pathol** 38:212–219, 2007.

Mitmayer E., Alvarado C., Bégin L.R., Trifiro M. Microsatellite Instability in Benign and Malignant Thyroid Neoplasms. **J Surg Res** 150: 40–48, 2008.

Moley J. F., Lairmore T. C., Phay J. E. "Hereditary endocrinopathies," Current Problems in Surgery, vol. 36, no. 9, pp. 653–762, 1999.

Morio T., Kim H. Ku, Artemis, and ataxia-telangiectasia-mutated: signalling networks in DNA damage. **Int J Biochem Cell Biol.** 40(4):598-603, 2008.

Morrison D. K., Cutler R. E. The complexity of Raf-1 regulation. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 9: 174–179, 1997.

Moses T. Y., Hostetter G., Wagner U., Kakareka J., Salem G., Pohida T., Heenan P., Duray P., Kallioniemi O., Hayward N. K., Trent J. M., Meltzer P. S. High frequency of BRAF mutations in nevi. **Nat. Genet.**, 33: 19–20, 2003.

Murugan A.K., Bojdani E., Xing M. Identification and functional characterization of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutations in thyroid cancer. **Biochem Biophys Res Commun.** 393(3):555-9, 2010.

Nakachi K., Hayashi T., Hamatani K., Eguchi H., Kusunoki Y. Sixty years of follow-up of Hiroshima and Nagasaki survivors: current progress in molecular epidemiology studies. **Mutat Res.** 659(1-2):109-17, 2008.

Nan X., Campoy F.J., Bird A. MECP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. **Cell.**1997

Narayanan S., McConnell J., Little J. Sharp L., Piyathilake C.J., Powers H., Basten G., Duthie S.J. Associations between two common variants C677T and A1298C in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and measures of folate metabolism and DNA stability (strand breaks, misincorporated uracil, and DNA methylation status) in human lymphocytes in vivo. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 13(9):1436-43, 2004.

Nijnik A., Woodbine L., Marchetti C., Dawson S., Lambe T., Liu C., Rodrigues N.P., Crockford T.L., Cabuy E., Vindigni A., Enver T., Bell J.I., Slijepcevic P., Goodnow C.C., Jeggo P.A., Cornall R.J. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. **Nature.** Jun 7;447(7145):686-90, 2007.

Nikiforov Y.; Nikiforova M.; Fagin J. Prevalence of minisatellite and microsatellite instability in radiation-induced post-Chernobyl pediatric thyroid carcinomas. **Oncogene**, 1998.

Nikiforov Y.E. Genetic alterations involved in the transition from well-differentiated to poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas. **Endocr Pathol.** 15(4):319-27, 2004.

Nikiforov Y.E. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. **Endocr Pathol.**;13:3-16, 2002.

Nikiforov Y.E. Thyroid Carcinoma: Molecular Pathways and Therapeutic Targets. **Mod Pathol.** 2008.

Nikiforov Y.E., Koshoffer A., Nikiforova M., Stringer J., Fagin J.A. Chromosomal breakpoint positions suggest a direct role for radiation in inducing illegitimate recombination between the ELE1 and RET genes in radiation-induced thyroid carcinomas, **Oncogene** 18 6330–6334, 1999.

Nunez E.A., Gershon M.D. Cytophysiology of thyroid parafollicular cells. **Int Rev Cytol**, 1978.

Nussey S., Whitehead S. Endocrinology: An Integrated Approach. **Oxford: BIOS Scientific Publishers**; 2001.

Oler G. and J. M. Cerutti. "High prevalence of BRAF mutation in a Brazilian cohort of patients with sporadic papillary thyroid carcinomas: correlation with more aggressive phenotype and decreased expression of iodide-metabolizing genes." **Cancer** 115(5): 972-980, 2009.

Onda M. *et al.*; Microsatellite Instability in Thyroid Cancer: Hot Spots, Clinicopathological Implications, and Prognostic Significance. **Clinical Cancer Research**, 2001.

Parsons D.W., Jones S., Zhang X., Lin J.C., Leary R.J., Angenendt P., Mankoo P., Carter H., Kamiyama H., Jimeno A., Hong S.M., Fu B., Lin M.T., *et al.* An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. **Science** 321:1807–1812, 2008.

Patrick L.; Thyroid Disruption: Mechanisms and Clinical Implications in Human Health. **Alternative Medicine Review** Volume 14, 2009.

Peyssonnaud C., and Eychene, A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. **Biol Cell**. 93(1-2):53-62, 2001.

Porra V., Ferraro-Peyret C., Durand C., Selmi-Ruby S., Giroud H., Berger-Dutrieux N., Decaussin M., Peix J.L., Bournaud C., Orgiazzi J., Borson-Chazot F., Dante R., Rousset B. Silencing of the tumor suppressor gene SLC5A8 is associated with BRAF mutations in classical papillary thyroid carcinomas. **J Clin Endocrinol Metab**, 2005.

Povirk L.F. Biochemical mechanisms of chromosomal translocations resulting from DNA double-strand breaks, **DNA Repair** 5 1199–1212, 2006.

Puxeddu E.; Moretti S. Prognóstico clínico em BRAF-evoluiu PTC. **ARQ Bras Endocrinol Metab** vol.51 no.5 São Paulo, 2007.

Razin A., Shemer R. DNA methylation in early development. **Hum MOL Genet**. 1995.

Rhyu M-G, Park W-S, Meltzer S.J. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. **Oncogene** 9, 29-32, 1994.

Richter H.; Lohrer H.; Hieber L.; Kellerer A.; Lengfelder E.; Bauchinger M. Microsatellite Instability and loss of heterozygosity in radiation associated thyroid carcinomas of Belarussian children and adults. **Carcinogenesis**, 1999.

Romagnoli S.; Moretti S.; Voce P.; Puxeddu E. Terapias moleculares direcionadas em câncer de tireoide. **ARQ Bras Endocrinol Metab** vol.53 no.9 São Paulo, 2009.

Rossi B.M., Lopes A., Ferreira F.O. *et al* hMLH1 and hMSH2 gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Ann Surg Oncol** 9:555–561, 2002.

Ruschenburg, Vollheim B., Stachura J., Cordon-Cardo C., Korabiowska M. Analysis of DNA mismatch repair gene expression and mutations in thyroid tumours, **Anticancer Res.** 26 2107– 2112, 2006.

Russo D., Celano M., Bulotta S., Bruno R., Arturi F., Giannasio P., Filetti S., Damante G., Tell G. APE/Ref-1 is increased in nuclear fractions of human thyroid hyperfunctioning nodules, **Mol. Cell. Endocrinol.** 194 71–76, 2002.

Salehi F., Kovacs K., Scheithauer B.W., Lloyd R.V., Cusimano M. Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update. **Endocr. Relat. Cancer** 15 721–743, 2008.

Samaan, N.A.; Schultz, P.N.; Hickey, R.C.; Goepfert, H.; Haynie, T.P.; Johnston. D.A. *et a*. The results of various modalities of treatment of well differentiated thyroid carcinomas: an retrospective review of 1599 patients. **J Clin Endocrinol Metab** 1992.

Samowitz W.S., Albertsen H., Sweeney C., *et al*. Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer. **J Natl Cancer Inst.**;98:1731-1738, 2006.

Sanson M., Marie Y., Paris S., Idbaih A., Laffaire J., Ducray F., El Hallani S., Boisselier B., Mokhtari K., Hoang-Xuan K., Delattre J.Y. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. **J Clin Oncol.** Sep 1;27(25):4150-4, 2009.

Schagdarsurengin U., Gimm O., Dralle H. *et al*: Island methylation of tumor-related promoters occurs preferentially in undifferentiated carcinoma. **Thyroid** 16: 633–42, 2006.

Schlumberger M.J. Papillary and follicular thyroid carcinoma. **N Engl J Med**;338(5):297-306, 1998.

Shen M., Hung R.J., Brennan P., Malaveille C., Donato F., Placidi D., Carta A., Hautefeuille A., Boffetta P., Porru S. Polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1, XRCC3, XPD, interaction with environmental exposures, and bladder cancer risk in a

case-control study in northern Italy. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** Nov;12(11 Pt 1):1234-40, 2003.

Sherman S.I., Angelos P., Ball D.W., Beenken S.W., Byrd D., Clark O.H., Daniels G.H., Dilawari R.A., Ehya H., Farrar W.B., Gagel R.F., Kandeel F., Kloos R.T., Kopp P., Lamonica D.M., Loree T.R., Lydiatt W.M., McCaffrey J., Olson Jr J.A., Ridge J.A., Robbins R., Shah J.P., Sisson J.C., Thompson N.W. Thyroid carcinoma. **J Natl Compr Canc Netw** 3:404–457, 2005.

Sherman S.I., Brierley J.D., Sperling M., Ain K.B., Bigos S.T., Cooper D.S., Haugen B.R., Ho M., Klein I., Ladenson P.W., Robbins J., Ross D.S., Specker B, Taylor T., Maxon III HR Prospective multicenter study of thyroid carcinoma treatment: initial analysis of staging and outcome. National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Registry Group. **Cancer.** 83(5):1012-21, 1998.

Silva S.N., Gil O.M., Oliveira V.C., Cabral M.N., Azevedo A.P., Faber A., Manita I., Ferreira T.C., Limbert E., Pina J.E., Rueff J., Gaspar J. Association of polymorphisms in ERCC2 gene with non-familial thyroid cancer risk, **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** 14 2407–2412, 2005.

Siraj A.K., Al-Rasheed M., Ibrahim M., Siddqui K., Al-Dayel F., Al-Sanea O., Uddin S., Al-Kuraya K., RAD52 polymorphisms contribute to the development of papillary thyroid cancer susceptibility in Middle Eastern population, **J. Endocrinol.** Invest. 31 893–899, 2008.

Slough C.M., Randolph G.W. Workup of well-differentiated thyroid carcinoma. **Cancer Control.** 13(2):99-105, 2006.

Smallridge R.C., Marlow L.A., Copland J.A. Anaplastic thyroid cancer: molecular pathogenesis and emerging therapies. **Endocr Relat Cancer.** 16(1):17-44, 2009.

Soares P., dos Santos N.R., Seruca R. *et al*: Benign and malignant thyroid lesions show instability in microsatellite loci. **Eur J Cancer** 33: 293–96 42, 1997.

Sobrinho-Simões M., Máximo V., Rocha A.S., Trovisco V., Castro P., Preto A., Lima J., Soares P. Intragenic mutations in thyroid cancer. **Endocrinol Metab Clin North Am.** 37(2):333-62, viii, 2008.

Song J.Y., Lim J.W., Kim H., Morio T., Kim K.H. Oxidative stress induces nuclear loss of DNA repair proteins Ku70 and Ku80 and apoptosis in pancreatic acinar AR42J cells. **J Biol Chem.** 278(38):36676-87, 2003.

Songtao Q., Lei Y., Si G., Yanqing D., Huixia H., Xuelin Z., Lanxiao W., Fei Y. IDH mutations predict longer survival and response to temozolomide in secondary glioblastoma. **Cancer Sci** 2011.



Sonkar A.A., Rajamanickam S., Singh D. Papillary thyroid carcinoma: Debate at rest. **Indian J Cancer**. Apr-Jun;47(2):206-16, 2010

Su T.T. Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. **Annu Rev Genet.**;40:187-208, 2006.

Svrcek M., Buhard O., Colas C., Coulet F., Dumont S., Massaoudi I., Lamri A., Hamelin R., Cosnes J., Oliveira C., Seruca R., Gaub M.P., Legrain M., Collura A., Lascols O., Tiret E., Fléjou J.F., Duval A. Methylation tolerance due to an O6-methylguanine DNA methyltransferase (*MGMT*) field defect in the colonic mucosa: an initiating step in the development of mismatch repair-deficient colorectal cancers. **Gut**. 59(11):1516-26, 2010.

Tallini G., Asa S.L. RET oncogene activation in papillary thyroid carcinoma. **Adv Anat Pathol**. 8:345-354, 2001.

Tanaka K., Sonoo H., Hirono M., Ohkubo S., Nomura T., Ikeda M., Nakajima K., Kurebayashi J. Retrospective analysis of predictive factors for recurrence after curatively resected papillary thyroid carcinoma. **Surg Today** 35:714–719, 2005.

Tang K.; Lee C. BRAF Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma: Pathogenic Role and Clinical Implications. **J Chin Med Assoc**, 2010.

Tuononen K., Tynninen O., Sarhadi V.K., Tyybäkinöja A., Lindlöf M., Antikainen M., Näpänkangas J., Hirvonen A., Mäenpää H., Paetau A., Knuutila S. The hypermethylation of the O(6) -methylguanine-DNA methyltransferase gene promoter in gliomas-correlation with array comparative genome hybridization results and IDH1 mutation. **Genes Chromosomes Cancer**. 51(1):20-9, 2012.

Vaish, M.; Mishra, A.; Kaushal, M.; Mishra, S.; Mittal, B. Microsatellite instability and its correlation with clinicopathological features in a series of thyroid tumors prevalent in iodine deficient areas. **Experimental and Molecular Medicine**, Vol. 36, No. 2, 122-129, 2004.

Vermiglio, F., Schlumberger, M., Lazar, V., Lefrere, I., and Bressac, B. Absence of microsatellite instability in thyroid carcinomas. **Eur. J. Cancer**, 1: 128, 1995.

Vertino P.M., Yen R.W., Gao J., Baylin S.B. De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase. **Mol Cell Biol**. 16(8):4555-65, 1996.

Vilkin A., Niv Y., Nagasaka T., Morgenstern S., Levi Z., Fireman Z., Fuerst F., Goel A., Boland C. R. Microsatellite Instability, *MLH1* Promoter Methylation, and BRAF Mutation Analysis in Sporadic Colorectal Cancers of Different Ethnic Groups in Israel. **American Cancer Society**, 2009.

Wajed S., Laird P., and Demeester T. DNA Methylation: An alternative pathway to cancer. **Annals of Surgery**, 2001.

Ward, E; Jemal, A; Chen, A. Increasing incidence of thyroid cancer: is diagnostic scrutiny the sole explanation? **Future Oncol**. 6(2):185-8, 2010.

Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. **Endocr Relat Cancer** 12:245–262, 2005.

Xing M. Minireview: Gene Methylation in Thyroid Tumorigenesis. **Endocrinology**, 148(3):948–953, 2007.

Xing M., Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. **Thyroid**. 20(7):697-706, 2010.

Xing, M. BRAF mutation in papillary thyroid Cancer: Pathogenic role, Molecular bases, and Clinical implications. **Endocrine Reviews**, 2007.

Yan H., Parsons D.W., Jin G., McLendon R., Rasheed B.A., Yuan W., Kos I., Batinic-Haberle I., Jones S., Riggins G.J., Friedman H., Friedman A., Reardon D., Herndon J., Kinzler K.W., Velculescu V.E., Vogelstein B., Bigner D.D. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **N Engl J Med**;360:765–773, 2009.

Yilike X, Kuerban G, Yang X, Wu S, Abudula A. Expression of MGMT and its clinopathological significance in thyroid carcinoma. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**. 35(12):1219-24, 2010.

Zedenius J., Auer G., Bäckdahl M. *et al* – Follicular tumors of the thyroid gland: diagnosis, clinical aspects and nuclear DNA analysis. **World J Surg**; 16: 589-94, 1992.

Zhao S., Lin Y., Xu W., Jiang W., Zha Z, Wang P. *et al* Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. **Science** 324:261–265, 2009.

Zhu C., Zheng T., Kilfoy B.A. *et al*: A birth cohort analysis of the incidence of papillary thyroid cancer in the United States, 1973–2004. **Thyroid** 19(10), 1061–1066, 2009.

Zhu Z., Ciampi R., Nikiforova M.N., Gandhi M., Nikiforov Y.E. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. **J Clin Endocrinol Metab**, 91:3603-3610, 2006.

São Paulo, 18 de novembro de 2011

CEP Nº: 1259/11

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): ANDRÉ UCHIMURA BASTOS

Disciplina/Departamento: Genética Humana/Morfologia

Pesquisadores associados: Janete Matria Cerutti (orientadora)

**Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo**

**TÍTULO DO ESTUDO:** Rearranjos RET/PTC: prevalência, correlação com características clínico-patológicas e perfil da expressão gênica em paciente com carcinoma papilífero da tireóide :

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** ESTUDO GENÉTICO

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** Material estocado

**OBJETIVO DO ESTUDO:** Investigar a prevalência dos rearranjos RET/PTC1, RET/PTC2 e RET/PTC3 em Carcinomas Papilíferos de Tireóide em um grupo de pacientes brasileiros e correlacionar com os parâmetros clínico-patológicos e modulação da expressão dos genes associados ao metabolismo do iodo NIS e TSH-R.

**RESUMO:** Baseando-se na literatura, a busca pelos rearranjos RET/PTC será feita em amostras de Carcinoma Papilífero de Tireóide que não apresentam mutação em BRAF, previamente selecionados em outro estudo, que totalizam 62 amostras (52%), das 120 previamente investigadas. As amostras foram obtidas de pacientes que realizaram tireoidectomia de 2000 a 2007 no Hospital São Paulo, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os tecidos foram congelados imediatamente após a cirurgia e armazenados a -80°C até o uso, e a classificação histológica foi feita através de tecidos emblocados em parafina e corados com hematoxilina e eosina. As amostras serão avaliadas segundo os seguintes critérios clínico-patológicos como variante histológica, sexo, idade ao diagnóstico, multifocalidade, infiltração vascular linfática, invasão extra-tiroidiana, pTNM (TNM patológico), recorrência ou persistência e dose de iodo. A extração do RNA de tumores será realizada por meio do método com Trizol Reagent (Invitrogen), da região central (para evitar contaminação com tecido normal). O RNA será quantificado e, em seguida, será feita a síntese de cDNA com 1µg de RNA, tratado com DNase, submetido à transcrição reversa usando enzima SuperScript III e oligo(dT) primer e 10U de inibidor de RNase (Invitrogen). A estratégia inicialmente utilizada para investigar a expressão do gene RET nas amostras de CPT consiste em (1) realizar uma reação de PCR quantitativo utilizando uma alíquota do cDNA sintetizado utilizando primers específicos para os éxons 16-18 do gene RET (que incluem a sequência presente em todos os rearranjos); (2) investigação da expressão dos genes candidatos que se fundem a RET nas formas de rearranjo RET/PTC1-3, bem como da região do gene RET perdido no rearranjo. Essa estratégia, além de quantificar a expressão relativa dos genes dos rearranjos, possibilita uma pré-seleção das amostras que potencialmente apresentam rearranjo do tipo RET/PTC e para identificar o rearranjo será realizado PCR com primer sense para o gene do rearranjo e antisense para o gene RET, assim somente amplificará a amostra que possuir o referido rearranjo. A avaliação da expressão de NIS e TSH-R também será feita através de qPCR, usando uma alíquota do cDNA sintetizado e primers para os genes alvo e controle (RS8, gene ribossomal protein 8).

**MATERIAL E MÉTODO:** Estão descritos os procedimentos do estudo, utilizando amostras congeladas e estocadas.

**TCLE:** Apresentada justificativa para não obtenção do TCLE

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** FAPESP- R\$ 6153,20

**CRONOGRAMA DO ESTUDO:** 24 MESES

**PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 12/11/2012 e 07/11/2013**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo