Ana Luiza Resende Galrão

Metilação do gene simportador sódio-iodo (NIS) em tumores de tireóide

VERSÃO CORRIGIDA

**Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

Programa de Endocrinologia

Orientador: Profa. Dra. Ileana Gabriela Sanchez de Rubio

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Galvão, Ana Luiza Resende

Metilação do gene simportador sódio-iodo (NIS) em tumores de tireóide / Ana Luiza Resende Galvão. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Ileana Gabriela Sanchez de Rubio.

Descritores: 1.Neoplasias da glândula tireóide 2.Simportadores 3.Metilação de DNA 4.Iodo

USP/FM/DBD-322/11

À minha amada família: Delfino, Eliane, Célia, Cadu, Renata, Paulo, Maristela, e principalmente aos meus lindos e gostosos sobrinhos: Juliana, Mariana e Luiz Henrique.

Obrigada por tudo! Amo muito vocês!! ∞

Aos meus falecidos: avós Alfredo Galvão e Luis de Resende, e padrinho Jose Henrique de Azevedo.

Onde estiverem, este trabalho também é para vocês!!!

Obrigada pela constante inspiração!!!

*“Cada pessoa deve trabalhar para o seu
aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo,
participar da responsabilidade coletiva por
toda a humanidade”*

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades e iluminação recebida.

Obrigada meus anjinhos e mentores espirituais que estiveram ao meu lado, sempre zelando o meu bem estar diante todas as adversidades, dando-me suporte para me reerguer e lutar, nunca me deixando desistir de meus sonhos.

À minha orientadora professora Dra Ileana Rúbio por ter confiado e acreditado em mim ao longo de todo este trabalho, sempre atenciosa, compreensiva, disposta a ensinar e a me ajudar.

Ile, obrigada por ter me aberto as portas da ciência, por me fazer uma pesquisadora, sempre ensinando-me a pensar, a questionar e solucionar os enigmas que nos rodeia. Obrigada por inspirar-me profissional e pessoalmente. E obrigada por ser acima de tudo...uma maravilhosa AMIGA.

Ao professor Dr. Geraldo Medeiros-Neto, pelo grande exemplo como educador e pela honra de ter feito parte deste trabalho e da minha vida.

Ao Dr. Eduardo Tomimori e a Dra. Rosalinda Camargo, pela grande amizade e apoio.

Aos cirurgiões, Dr. Celso Friguglietti e Dr Marco Kulcsar, pela atenção e colaboração, fundamentais para realização desta tese .

À professora Dra Janete Cerutti pela colaboração neste trabalho, disponibilizando-me materiais, espaço físico e mão de obra sempre que necessário

À professora Dra Edna Kimura por ter me cedido alguns materiais essenciais para a realização deste estudo

À Erika Urbano, pela imensa ajuda, auxiliando-me sempre nas horas de desespero. *Valeu Keta!!!*

Às minhas eternas amigas do laboratório: Viviane, Roberta, Solange, Kátia, Karina, Paola e Ester pelo auxílio durante a realização deste trabalho e principalmente pela companhia agradável e apoio durante o tempo de convivência. *Muito obrigada LAS CHICAS!!!!*

Aos colegas dos laboratórios vizinhos (LIM-25 e LIM-12), que me permitiram o uso de seus equipamentos e materiais sempre que necessário. Além de todo o carinho e atenção a mim dispensados.

À Dra Ericka Trarbach e Dra. Suemi Marui, pela ajuda e colaboração.

À FAPESP e ao Indatir pelo apoio financeiro deste estudo

E a todos aqueles que não pude citar aqui, mas que de algum modo tiveram importância na realização desta tese.

"Se me esqueceres, só uma coisa, esquece-me bem devagarinho."

Mário Quintana

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos periódicos de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

INTRODUÇÃO	1
Simportador sódio-iodo (<i>NIS</i>)	2
Aspectos fisiológicos do <i>NIS</i>	3
Regulação da expressão do <i>NIS</i>	7
<i>NIS</i> e doenças	9
Mecanismos epigenéticos: Metilação	11
Avaliação da metilação do DNA	15
Tratamento do DNA com bissulfito de sódio	16
PCR metilação específica (MSP)	17
PCR em tempo real quantitativo metilação específica (QMSP)	17
Bissulfito-Sequenciamento	18
Metilação e Câncer de Tireóide	19
Metilação, Cancer de Tireoide e <i>NIS</i>	21
OBJETIVOS	23
CASUÍSTICA E METODOLOGIA	24
Casuística	24
Metodologia	27
Extração do DNA genômico de tecido	27
Quantificação de DNA	28
Amplificação por Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	28
Análise dos produtos de PCR	30
Avaliação da qualidade do DNA	31
Sequenciamento	33

Análise das sequências	34
Tratamento do DNA com bissulfito de sódio	34
Tratamento do DNA com bissulfito de sódio empregando-se o estojo comercial EpiTect Bisulfite (QIAgen, Valencia, CA)	36
Purificação do DNA bissulfito convertido com estojo comercial EpiTect Bisulfite (QIAgen, Valencia, CA).	36
Preparação dos DNAs controles	37
Avaliação do grau de metilação da ilha1 CpG do gene <i>NIS</i>	38
PCR em tempo real quantitativo metilação específica (QMSP)- modificada	39
PCR metilação específica semiquantitativa (MSP)- modificada	40
Identificação <i>in silico</i> de ilhas CpG no promotor de <i>NIS</i>	43
Avaliação do grau de metilação da ilha2 CpG do gene <i>NIS</i>	45
Amplificação por PCR da ilha2 CpG	45
Clonagem dos fragmentos da ilha2 CpG	46
Transformação de Bactérias por Eletroporação	46
Amplificação por PCR do plasmídio presente na bactéria	47
Bissulfito seqüenciamento	47
Avaliação da presença da mutação V600E no gene <i>BRAF</i>	48
Quantificação da expressão gênica de <i>NIS</i>	48
Extração de RNA total de tecido	48
Quantificação do RNA total	49
Síntese de DNA complementar (cDNA)	49
Quantificação da expressão gênica por RT-PCR em tempo real	50
Estudo funcional da ilha2 CpG do promotor de <i>NIS</i>	50
Construção dos plasmídios pGL3b-NIS2isl e pGL3c-NIS2isl	51
Cultura de células de mamífero	52
Transfecção em célula de mamífero	53
Teste para avaliação de atividade de luciferase	53

Tratamento com agente desmetilante 5-Aza-2'-deoxicitidina (5-Aza-CdR)	54
Extração de RNA de cultura de células	55
Análises estatísticas	56
RESULTADOS	57
Avaliação da presença da mutação V600E no gene <i>BRAF</i>	57
Avaliação do grau de metilação da ilha1 CpG do gene <i>NIS</i>	58
Método MSP	60
Método MSP-semi-quantitativo	62
Identificação <i>in silico</i> de ilhas CpG do promotor do gene <i>NIS</i>	68
Avaliação da metilação da ilha2 CpG do gene <i>NIS</i>	70
Estudo funcional da ilha2 CpG do promotor de <i>NIS</i>	76
Tratamento com agente desmetilante 5-Aza-2'-deoxicitidina (5-Aza)	77
DISCUSSÃO	79
CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	88

LISTA DE ABREVIATURAS

5-Aza	aza-2'-deoxicitina
5'UTR	região do gene 5' não traduzida
AMPc	adenosina monofosfato cíclica
ATG	sítio de início da tradução
<i>bACT</i>	β -actina
<i>BRAF</i>	B-type Raf kinase
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CLC-5	canal de cloreto
CpG	dinucleotídeo citosina-guanina
DEHAL I	desalogenase 1
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	trifosfato desoxinucleotídeo
DNMT	DNA-metiltransferase
DIT	didiotirosina
DUOX1	tireóide oxidase um
DUOX2	tireóide oxidase dois
et al.	e outros/colaboradores
<i>GAPDH</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HDACs	histonas desacetilases
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
Kb	kilo pares de bases
kDa	kilo daltons
MCT8	transportador de monocarboxilato 8
MIT	moniodotirosina
MSP	PCR metilação específica

<i>NIS</i>	simportador de sódio/iodo
<i>PAX-8</i>	paired box transcription factor 8
pb	pares de base
PBF	fator de ligação do PTTG
PCR	reação em cadeia da polimerase
<i>PTTG</i>	tumor de hipófise transformado
QMSP	PCR em tempo real quantitativo metilação específica
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	PCR <i>transcriptase reversa</i>
<i>rTSH</i>	receptor do hormônio tireoestimulante
SLC5A	carreadores de solutos 5
SAM	S-adenosilmetionina
T3	triiodotironina
T4	tiroxina
TG	tireoglobulina
TPO	tireoperoxidase
TSH	hormônio tireoestimulante
<i>TTF-1</i>	fator de transcrição tireoideano 1
UA	unidades arbitrárias

RESUMO

Galvão, ALR. *Metilação do gene simportador sódio-iodo (NIS) em tumores de tireóide* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

O iodo é transportado para a célula tireoideana através do simportador sódio-iodo (*NIS*). Estudo anterior de nosso grupo mostrou que a expressão do RNAm de *NIS* estava reduzida nos tecidos tumorais (T) tireoideanos quando comparada à dos tecidos não tumorais (NT) adjacentes. A metilação de ilhas CpG localizadas em promotores é um dos mecanismos epigenéticos que regula a expressão gênica. Já foi demonstrado que a metilação aberrante desempenha papel importante na tumorigênese humana, porém, estudos qualitativos não conseguiram definir um padrão de metilação do promotor de *NIS* no câncer diferenciado de tireóide. Assim, o presente estudo visou (1) investigar o padrão de metilação do promotor do gene *NIS* em amostras T (benignos e malignos) e NT adjacentes, e correlacionar o grau de metilação com os valores de RNAm, e (2) identificar novas sequências regulatórias, alvos de metilação do DNA, que pudessem também modular a expressão de *NIS*. Foram estudados 30 pares de amostras de tecido tireoideano T e NT adjacente, sendo 10 benignos e 20 malignos. Também foi avaliado um par de amostras de paciente com nódulo maligno com alta captação de iodo (hipercaptante). A metilação da ilha1 CpG foi avaliada por PCR Metilação Específica (MSP) semiquantitativa e a metilação da ilha2 CpG foi analisada por bissulfito seqüenciamento; ambas com DNA bissulfito convertido. Novas ferramentas de bioinformática foram utilizadas na análise *in silico* para identificar ilhas CpG funcionais na região 5' "upstream" da seqüência promotora de *NIS*. Plasmídios foram construídos contendo o fragmento de DNA da Ilha2 CpG na frente de gene reporter (luciferase) e usados em transfecções de células HEK293 para avaliar a atividade regulatória desta ilha. Células tumorais com baixa expressão de *NIS* foram tratadas com agente desmetilante 5Aza e a expressão de RNAm de *NIS* foi avaliada por PCR em tempo real.

Na ilha1 CpG, todas as amostras (T e NT) do grupo benigno e maligno apresentaram metilação, não observando-se diferença no grau de metilação entre os grupos. No entanto, maiores níveis de metilação foram detectados na região 5' desta ilha, que decresceram na direção da extremidade 3'. Observou-se maior grau de metilação no tecido T em relação ao tecido NT adjacente (T>NT) em 60% das amostras do grupo benigno e em 35% do grupo maligno. Não foi identificada correlação entre o grau de metilação da ilha1 CpG e a expressão de RNAm de *NIS*. Nas amostras (T e NT) do paciente com tumor hipercaptante não foi detectada metilação nesta ilha. Assim foi realizada nova análise *in silico*, a qual identificou por primeira vez uma segunda ilha CpG, ilha2 CpG, com 256pb, localizada entre as posições -2152 e -1887 (em relação ao sítio ATG), contendo 14 sítios CpG. As análises da metilação da ilha2 CpG indicaram que essa região também é alvo de metilação, sendo observada hipermetilação (66.07%) em todas as amostras T quando comparada às amostras NT(23,21%), nos grupos

benigno e maligno. A análise individual de cada par de amostras detectou um padrão de metilação do gene *NIS* em tecidos tireoideanos; sendo que 100% das amostras do grupo benigno e 95% das do grupo maligno apresentavam a ilha2 CpG mais metilada no tecido T do que no tecido NT (T>NT). Além disso, foi possível identificar correlação inversa significativa entre o grau de metilação da ilha2 CpG e a expressão gênica de *NIS*. Estudos *in vitro* para caracterização funcional da ilha CpG2 mostraram que esta nova ilha pode ser considerada como um *enhancer* do gene *NIS* na presença de fatores de transcrição da tireóide. Também foi possível detectar, em linhagem de carcinoma folicular da tireoide, a reexpressão do RNAm de *NIS* paralelamente à redução do grau de metilação da ilha2 CpG, após o tratamento com agente desmetilante. Sendo assim, confirmamos que a metilação do promotor *NIS* é um evento freqüente em amostras T (benignas e malignas) e NT. Este é o o primeiro trabalho que descreve a existência da ilha2 CpG, na região 5' do gene *NIS*, com atividade de enhancer, que regularia a expressão gênica por metilação do DNA. Pela primeira vez identificou-se a existência de um padrão de metilação no gene *NIS* em tecido tireoideanos (T>NT), assim como correlação inversa entre o grau de metilação da ilha2 CpG e a expressão de RNAm de *NIS*. Estes resultados poderiam explicar a reduzida expressão do *NIS* observada em amostras tumorais benignas e malignas e a baixa captação de iodo dos tumores tireoideanos.

Descritores: Neoplasias da glândula tireóide, Simportador, Metilação de DNA, Iodo.

SUMMARY

Galvão, ALR. *Methylation of sodium iodide symporter (NIS) gene in thyroid tumors* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Iodide is transported from the blood into thyroid cell through the sodium iodide symporter (*NIS*). We have previously detected reduced *NIS* mRNA expression in thyroid tumoral tissue (T) when compared with the non tumoral tissue (NT). Methylation of DNA's "CpG islands", very common in promoters, is an epigenetic alteration that regulates gene expression. Aberrant gene methylation plays an important role in human tumorigenesis. Previous qualitative studies have failed to define a *NIS* promoter methylation pattern in thyroid cancer. This study aimed (1) to investigate the methylation pattern of the *NIS* gene promoter in thyroid tumors (benign and malignant), and to correlate the methylation status with cellular levels of *NIS* mRNA, in T and adjacent NT samples; (2) to identify new regulatory DNA sequences that could modulate *NIS* gene expression by methylation of the DNA. Thirty pairs of thyroid samples (tumoral and non-tumoral), 10 benign and 20 malignant tumors were included. A pair of samples of a malignant nodule with high iodide uptake was also included. Methylation of CpG Island1 was evaluated by semiquantitative Methylation Specific PCR (MSP) and methylation of CpG island2 was analyzed by bisulfite sequencing; both using bisulfite converted DNA. New bioinformatic tools were used in *in silico* analysis to identify functional CpG islands in the 5' upstream region of the *NIS* promoter. Plasmids were constructed containing the CpG island2 DNA fragment in front of a reporter gene (luciferase) and used in transfections assays of HEK293 cells to assess the regulatory activity of this island. Tumor thyroid cell cultures with low *NIS* expression were treated with the demethylating agent 5Aza and *NIS* mRNA expression was quantified by real time PCR.

Methylation of CpG island1 was detected in all the samples (NT and T) of benign and malignant group, no differences were observed in the methylation degree between the groups. However, highest methylation levels were detected in the 5' region of CpG island1, which decreased to the 3' end. The analysis of each pair of samples revealed higher methylation degree in T tissue with respect to NT adjacent tissue (T > NT) in 60% of the benign group and in 35% of the malignant group. No quantitative correlation was found between CpG island1 methylation and *NIS* mRNA levels in both groups. Methylation was not detected in the NT and T samples of the patient with high iodine uptake. Furthermore, new *in silico* analysis allowed to identify a second CpG island, CpG island2, with 256pb, located between positions -2152 and -1887 (relative to ATG), containing 14 CpG sites. The analysis of the CpG island2 indicated that this region is also a target of DNA methylation. Hypermethylation was observed in all T samples (66.07%) when compared with NT samples (23.21%), in benign and malignant groups. The analysis of each pair of samples allowed to detect a *NIS* gene methylation pattern in thyroid tissues. In 100% of the benign group and in 95% of the malignant

group methylation degree of the CpG island2 was higher in the T tissue as compared to NT tissue (T>NT). Moreover, it was possible to identify significant negative correlation between the methylation degree of CpG island2 and *NIS* mRNA gene expression. In vitro functional characterization of the CpG island2 showed that this new island may be considered an enhancer of *NIS* gene in the presence of thyroid transcription factors. The treatment of follicular thyroid carcinoma cells with demethylating agent restored the *NIS* mRNA expression, in parallel with the reduction of the CpG island2 methylation degree. In conclusion, we confirm that the *NIS* promoter methylation is a frequent event in thyroid T (benign and malignant) and NT samples. This is the first description of a new second CpG island in the 5' region of the *NIS* gene, with enhancer activity, which may regulate gene expression by DNA methylation. This is the first report that described the existence of a *NIS* gene methylation pattern of in thyroid tissue (T>NT) as well as a negative correlation between the methylation degree of CpG island2 and *NIS* mRNA expression. These results may explain the reduced *NIS* expression observed in benign and malignant tumor samples as well as the low iodine uptake of thyroid tumors.

Descriptors: Thyroid neoplasms, Symporters, DNA methylation, Iodine

INTRODUÇÃO

O controle da ativação e repressão gênica é essencial para o crescimento e diferenciação celular normal. Quando este processo é desregulado pode haver bloqueio da diferenciação, crescimento celular anormal e/ou apoptose aberrante podendo levar ao processo de tumorigênese (Melnick *et al*, 2005).

Os tumores de tireóide derivados de células epiteliais são relativamente freqüentes e podem ser divididos em benignos e malignos. Os tumores benignos são os adenomas e fibroadenomas. Já os tumores malignos são classificados em: carcinomas papilífero, folicular e anaplásico; com freqüência de 83%, 15% e 2% respectivamente (Xing M, 2007).

Em estudos *in vivo*, Elisei *et al.* (2003) mostraram que o tecido neoplásico tireoideano geralmente não é captante de iodo (“frio”) na técnica de cintilografia porque, enquanto que no tecido normal a captação de radioiodo é de 1%, no tecido tumoral é de 0,1 - 0,01% por grama de tecido. Apesar da captação de iodo estar reduzida na maioria dos cânceres, ainda é suficiente para levar à destruição dos restos tumorais e metástases após dose terapêutica de radioiodo. No entanto, Smanik *et al.* (1996) documentaram várias linhagens celulares de cânceres tireoideanos que perderam a habilidade de concentrar iodo. A compreensão dos complexos mecanismos que regulam a captação de iodo pode levar ao desenvolvimento de melhores opções terapêuticas para os tumores de tireóide com baixa ou nula capacidade de concentrar este halogênio.

Simportador sódio-iodo (NIS)

O iodo é um elemento químico fundamental para a síntese dos hormônios tireoideanos os quais possuem importante papel na formação do sistema nervoso central do feto e do recém-nascido, e na regulação metabólica do organismo (Medeiros-Neto G, 2005).

Devido à limitada oferta de iodo no ambiente, um sistema eficiente de transporte faz com que a maior parte do iodo ingerido seja acumulada na tireóide. Esta glândula tem capacidade de concentrar iodo de 20 a 40 vezes mais que a concentração plasmática deste halogênio em condições fisiológicas e, devido ao seu arranjo folicular, ela é capaz não só de transportar, mas também de estocar iodo para suas futuras necessidades (Dohán *et al.*, 2000; Riedel *et al.*, 2001).

Baumann E. (1896) descreveu pela primeira vez a habilidade das células foliculares tireoideanas de concentrar na glândula a maior parte do iodo ingerido.

O transporte deste elemento para o tecido tireoideano é mediado pelo simportador sódio-iodo (NIS). Em 1996, Daí *et al.* isolaram pela primeira vez o DNA complementar (cDNA) que codifica a NIS de rato . Neste mesmo ano, Smanik *et al.*(1996) conseguiram clonar o gene *NIS* humano.

O seqüenciamento do *NIS* humano revelou um gene com 1929 nucleotídeos. Um ano mais tarde, o mesmo grupo (Smanik *et al.*,1997) concluiu que o gene *NIS* está localizado no cromossomo 19p12-13.2 e que contém uma região codificadora de 15 exons alternados por 14 íntrons que codifica o RNA mensageiro (RNAm) de 3,9Kb.

Aspectos fisiológicos da proteína NIS

A NIS é uma glicoproteína de 643 aminoácidos, com peso molecular de 70-90 kDa. Levy *et al.*, (1998) propuseram modelo da estrutura secundária da proteína NIS, a qual seria composta por 13 segmentos transmembranosos, uma região aminoterminal extracelular e uma região carboxiterminal intracelular (Figura 1). Os segmentos de membrana são compostos por 20 a 28 aminoácidos, com exceção do segmento V que contém 18 aminoácidos.

Figura 1: Modelo da estrutura secundária da proteína NIS (Spitzweg *et al.*, JCEM, 2001)
 1-Números da seqüência; I- Domínios transmembranosos; 1- Domínios extramembranosos;
 ▲ Sítios de glicosilação.

A proteína NIS é membro de uma família de transportadores dependentes de sódio chamada família de carreadores de solutos 5 (SLC5A) que inclui mais de 60 membros. Todos têm bastante similaridade entre si e usam o gradiente eletroquímico do transporte de sódio como meio de transportar solutos para a célula. (Turk & Wright, 1997).

O transporte do iodo para o tecido tireoideano, mediado pelo simportador sódio-iodo (NIS), é o processo conhecido como captação de iodo (figura 2). NIS localiza-se na membrana basolateral das células

foliculares tireoideanas (Dohán *et al.*, 2000) e transporta dois íons de sódio (a favor do gradiente eletroquímico) para cada ânion de iodo (contra o gradiente eletroquímico) (Eskandari *et al.*, 1997). O gradiente de sódio que fornece energia para a captação de iodo é mantido pela bomba sódio-potássio-ATPase, também localizada na membrana basolateral (Eskandari *et al.*, 1997). Em seguida, o iodo é transportado passivamente do citoplasma para o lúmen folicular, através da membrana apical, por meio do transportador cloro-iodo (pendrina) (Scott *et al.*, 1999) e possivelmente pelo canal de cloreto (CLC-5) (van den Hove *et al.*, 2006; Senou *et al.*, 2010). Este último poderia compensar a falta de pendrina garantindo o efluxo de iodo. O lúmen folicular, preenchido de colóide, é composto principalmente por tireoglobulina (TG).

Na interface célula-colóide, o iodo é organificado através de uma complexa reação catalisada pela tireoperoxidase (TPO). A organificação envolve a oxidação do iodo e a incorporação dele em resíduos tirosil da TG. Nesta etapa, é necessária a presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é produzido por um sistema gerador de H_2O_2 , no qual as tireóide-oxidases um e dois (DUOX1 e 2) são essenciais (De Deken *et al.*, 2000)

As iodotirosinas da TG, também por ação da TPO, são conjugadas para formar monoiodotirosina (MIT) e didiotirosina (DIT). Uma molécula de DIT e uma de MIT se ligam para formar triiodotironina (T3) e duas de DIT se ligam para formar tiroxina (T4). As moléculas de MITs e DITs que não se ligaram para formar hormônio tireoideano sofrem a ação da enzima desalogenase 1 (DEHAL I), que libera o iodo para ser reaproveitado pela

célula (Gnidehou *et al.*, 2004). Recentemente, foi mostrado em sistema murino que o transportador de monocarboxilato 8 (MCT8), localizado na membrana basolateral, promove o transporte de T4 e T3 para a circulação (Di Cosmo *et al.*, 2010).

O processo de organificação é inibido competitivamente pelo tiocianato, perclorato e outros ânions. Em virtude da pronta organificação do iodo na tireóide, ela consegue um acúmulo prolongado deste íon, diferentemente de outros tecidos (como as glândulas salivares, estômago, timo e mama) também capazes de concentrar iodo (Filetti *et al.*, 1999).

Toda essa etapa da biossíntese hormonal é estimulada pelo hormônio tireoestimulante (TSH) que interage com seu receptor (rTSH) localizado na membrana basolateral dos tireócitos (Dohán *et al.*, 2003).

Figura 2: Representação esquemática da síntese dos hormônios tireoideanos. 1) o hormônio estimulante da tireoide (TSH) liga-se em seu receptor de membrana e estimula a síntese de RNAm da TG no núcleo da célula; 2) o RNAm sintetizado migra para o retículo endoplasmático rugoso (ER), onde ocorre a síntese proteica. Após a tradução, a proteína sofre intenso controle de qualidade realizado pelas chaperonas; 3) a TG migra do RER para o complexo de Golgi, já como um dímero, onde se completa o processamento pós-traducional (glicosilação); 4) a TG dimérica ainda imatura migra para o lúmen folicular por invaginação. A enzima TPO na presença de H_2O_2 , sintetizado pelo sistema DUOX, promove a oxidação e o acoplamento do iodo no resíduo tirosil da TG para a formação de MIT e DIT. Ainda no lúmen folicular, ocorre a síntese dos hormônios tireoideanos (T3 e T4) pela junção de MIT e DIT; 5) o complexo TG-hormônio entra novamente na célula e sofre proteólise para a liberação dos hormônios tireoideanos na corrente sanguínea; 6) nesta etapa, a enzima DEHAL 1 retira o iodo não utilizado na síntese dos hormônios para ser reaproveitado pela célula; 7) moléculas de TG madura são liberadas na corrente sanguínea juntamente com os hormônios tireoideanos (ação do MCT8).

L: lisossomo; **M:** mitocôndria; **R:** ribossomos; **P:** peroxissomo; **G:** complexo de Golgi; **ER:** retículo endoplasmático rugoso; **N:** núcleo; **E:** endossomo.

Regulação da expressão do NIS

Já é bem estabelecido que o TSH regula a captação de iodo através da regulação da expressão de *NIS* via adenosina monofosfato cíclica (AMPc), tanto em nível transcricional como pós-traducional. O TSH induz a transcrição do gene *NIS*, aumenta a meia vida da proteína *NIS* e ainda regula sua fosforilação (Riedel *et al.*, 2001).

Além do TSH, outro regulador da captação do iodo pela tireóide é a própria concentração intracelular de iodo. Em 1944, Wolff e Chaikoff *et al.*, mostraram que a organificação do iodo é bloqueada quando o nível de iodo no plasma atinge um nível crítico, fenômeno conhecido como efeito Wolff-Chaikoff agudo, ou seja, a alta concentração de iodo leva ao bloqueio da peroxidase e, conseqüentemente, ao bloqueio da síntese hormonal. Entretanto, se a concentração do iodo continua alta por dois dias, ocorre um mecanismo de adaptação ou escape e a organificação e a síntese hormonal são retomadas (Dohán *et al.*, 2003).

Em 1963, Braverman e Ingbar propuseram que o escape do efeito Wolff-Chaikoff agudo se deve à diminuição no transporte de iodo que leva a sua baixa concentração intracelular, removendo a inibição da organificação. Atualmente, se aceita que altas doses de iodo, *in vivo*, levam à diminuição tanto do RNAm como da proteína NIS, todavia, estudos *in vitro* sugerem que há aumento do *turnover* dessa proteína (Dohán *et al.*, 2003). Recentemente foi mostrado que na glândula tireóide de rato o aumento da concentração de iodo promove a diminuição da cauda de poliA do RNAm de *NIS*, diminuindo

sua estabilidade e reduzindo, conseqüentemente, os níveis protéicos. (Serrano *et al.*, 2010).

Outro importante regulador da expressão do *NIS* é a tireoglobulina, que age como um potente supressor de genes tireoidianos, incluindo o *NIS*. O mecanismo pelo qual ocorre este efeito inibitório ainda não está claro. A inibição da expressão gênica pode ser um mecanismo regulatório de *feedback* negativo que contrabalança o efeito estimulador do TSH sobre a função folicular. (Suzuki *et al.*, 1999; Suzuki & Kohn, 2006).

O gene B-type Raf kinase (*BRAF*) também é considerado um regulador indireto da expressão do gene *NIS*. Estudos demonstraram que a mutação V600E no exon 15 do gene *BRAF* é o evento genético mais freqüentemente encontrado no carcinoma papilífero da tireoide (48%) (Kimura *et al.*, 2003). Adicionalmente, esta alteração genética tem sido correlacionada com a redução de expressão de genes envolvidos no metabolismo do iodo, como o gene *rTSH* e o gene *NIS* (Durante *et al.*, 2007, Oler & Cerutti, 2009). Estudo recente mostrou que a proteína BRAF portadora da mutação V600E reprime a expressão de *NIS* através do aumento de TGFbeta (Riesco-Eizaguirre, 2009)

Outro gene que necessita ser destacado é o gene transformador de tumor de hipófise (*PTTG*), que é um oncogene multifuncional que estimula a expressão do fator de crescimento de fibroblastos-2 (*FGF-2*) via o fator de ligação do *PTTG* (PBF). Smith *et al.*, (2007), demonstraram que PTTG e FGF-2 inibem a captação de iodo da tireóide em linhagens celulares de rato; e que PTTG e PBF reprimem a expressão do RNAm de *NIS* e a captação de

iodo em culturas primárias de tireóide humana. Além disso, já foi demonstrado que PBF é capaz também de se ligar à proteína NIS e alterar a sua localização subcelular, regulando assim a sua capacidade de absorção de iodeto (Smith *et al.*, 2009).

NIS e doenças

A partir da clonagem do *NIS* (Smanik *et al.*, 1996) observou-se enorme crescimento do número de estudos sobre o simportador sódio-iodo na tireóide normal e em suas disfunções, em especial em câncer tireoideano. Muitos estudos têm demonstrado diminuição e até ausência do transcrito deste gene em tumores na glândula tireóide de pacientes (Smanik *et al.*, 1996; Smanik *et al.*, 1997; Arturi *et al.*, 1998; Lazar *et al.*, 1999, Oler & Cerruti, 2009).

Vários trabalhos observaram que os níveis de RNA mensageiro (RNAm) do gene *NIS* nem sempre podem ser correlacionados aos níveis da proteína (Jhiang *et al.*, 1998; Caillou *et al.*, 1998; Neumann *et al.*, 2004; Trouttet-Masson *et al.*, 2004; Sodr *et al.*, 2008). At o momento no h evidncias que expliquem a ausncia ou baixos nveis de expresso da protena NIS em alguns casos de tumores tireoideanos.

Mutaes no gene *NIS* levam a defeitos no transporte de iodo, e foram associadas a hipotireoidismo congnito, caracterizado clinicamente por bcio e ausncia ou reduo da captao de iodo ou pertecnetato pela glndula tireide (Knobel & Medeiros-Neto, 2003; De La Vieja *et al.*, 2005).

Nos pacientes com hipotireoidismo por defeito no transporte de iodo foram descritas até o momento 13 mutações no gene *NIS*: V59E, G93R, Q267E, C272X, G395R, T354P, 515X frame-shift, Y531X, G543E, Δ 143-323, Δ 439-443; R124H; e uma recém descrita na região 5'UTR (exon1) -54C>T (Pohlenz *et al.*, 1997; De La Vieja *et al.*, 2005; Szinnai *et al.*, 2006; Bizhanova& Kopp, 2009; Nicola *et al.*, 2011) (Figura 3). Em alguns casos a proteína mutada é expressa e atinge a membrana plasmática, porém não é funcional e em outros não consegue alcançar a membrana plasmática (Spitzweg & Morris, 2010).

Figura 3: Esquema da localização das mutações identificadas no *NIS* em pacientes com hipotireoidismo. (De la Vieja *et al.*, 2005; Szinnai *et al.*, 2006)

No câncer de tireóide, inicialmente foi levantada a hipótese de que a diminuição da captação de iodo era consequência de mutações no gene *NIS*. Esta hipótese foi descartada por Russo *et al.* (2001) ao verificar ausência de mutação nos tecidos estudados; apesar de Liang *et al.*, (2005) terem descrito uma deleção no exon 6 (226delH) do gene *NIS* em adenoma de tireóide.

Mecanismos epigenéticos: Metilação

Eventos epigenéticos são aqueles que alteram a expressão gênica sem afetar a sequência de nucleotídeos do DNA. Estes eventos possuem papel fundamental na expressão gênica humana, particularmente durante a embriogênese, como no processo de inativação do X, na diferenciação tecido-específico e no imprinting genômico (Xing M, 2007). Estes mecanismos epigenéticos incluem: as modificações das histonas (ubiquitinação, fosforilação, ribosilação e acetilação), a edição do RNA (RNA editing), o silenciamento gênico por RNA não codificantes (microRNAs e RNAs de interferência) e a metilação do DNA. Todos esses mecanismos estão interrelacionados, trabalhando em conjunto para determinar o grau de expressão gênica (Grunstein M, 1997; Wade *et al.*, 1999).

Na literatura, um dos mecanismos epigenéticos mais estudados é a metilação do DNA (Bird A, 2002; Yoo & Jones, 2006). O fenômeno da metilação do DNA se dá pela ligação covalente de um grupo metil (CH_3) ao carbono da posição 5 da citosina de um dinucleotídeo CpG (a letra *p* entre as bases citosina e guanina denota ligação fosfodiéster) que se transformará em 5-metilcitosina. A reação é catalizada por uma DNA-metiltransferase (DNMT) e usa a S-adenosilmetionina (SAM) como doador do grupo metil. Na espécie humana a metilação encontra-se limitada às citosinas. (Arenas-Huertero & Recillas-Targa, 2002; Alberts *et al.*, 1999). (Figura 4)

Figura 4. Transferência de um grupo metil (CH₃) para o carbono 5 da citosina de um dinucleotídeo CpG do DNA. A reação é catalizada por uma DNA-metiltransferase e usa a S-adenosil metionina (SAM) como doador do grupo metil. Na espécie humana a metilação encontra-se limitada às citosinas.

A distribuição dos dinucleotídeos CpG (ou sítios CpG) no genoma humano não é uniforme, concentrando-se em regiões denominadas “Ilhas CpGs”, enquanto que no restante do DNA observa-se uma depleção deste dinucleotídeo, cerca de um quinto dos 4% de frequência que seria esperado (Lander *et al.*, 2001).

O déficit do dinucleotídeo CpG no genoma ocorreu, durante a evolução, pela ineficiência de reparo da transição da base citosina por timina causada pela deaminações de resíduos de metil-C (citosina metilada) (figura 5); ou seja metil-CpG é permanentemente convertido em TpG (Bird, 1980).

Figura 5. Quadro esquemático da ação da deaminação sobre A) citosina metilada, B) citosina não metilada. A citosina metilada no processo de deaminação sofre transição para Timina, a qual não é detectada como falha pela maquinaria de reparo do DNA. Já a citosina não metilada sofre deaminação levando a uracila, a qual é facilmente detectada e reparada novamente a citosina.

As ilhas CpGs são regiões com cerca de 1kb de tamanho, que ocorrem em média a cada 100kb. A maioria dos cromossomos têm de 5 a 15 ilhas por Mb, com média de 10,5 ilhas/Mb; contudo observamos algumas exceções como por exemplo no cromossomo 19 onde foram detectadas 43 ilhas/Mb (cromossomo no qual se encontra o gene NIS). As ilhas CpG são de muito interesse, pois normalmente estão localizadas na região 5' não traduzida (5'UTR) dos genes, especialmente no promotor e primeiro exon (regiões regulatórias); sendo que mais da metade dos genes apresentam pelo menos uma ilha CpG em sua região promotora (Larsen *et al.*, 1992; Lander *et al.*, 2001; Hutter *et al.*, 2009).

De modo geral a metilação de um promotor, particularmente na região próxima ao sítio de início de transcrição, está associada com o silenciamento gênico. Quando o promotor é metilado pode haver recrutamento de

repressores como as proteínas que se ligam a grupos metil, remodelamento da cromatina e/ou inibição da ligação de fatores de transcrição (como AP-2, myc, NFK β), interrompendo a transcrição, e conseqüentemente, a expressão gênica (Figura 6). A inativação gênica também pode decorrer do recrutamento de complexos contendo repressores transcripcionais e HDACs (histonas desacetilases) ao DNA metilado. (Bird A, 2002; Yoo & Jones, 2006)

Figura 6. Representação esquemática do silenciamento gênico. A). Os sítios CpGs encontram-se desmetilados, há ligação dos fatores de transcrição e expressão gênica. B) Os sítios CpG encontram-se metilados, C) os sítios metilados não possibilitam a ligação dos fatores de transcrição, havendo recrutamento de complexos repressores (proteínas que se ligam a grupos metilas e desacetilases de histonas) que resultam em D) remodelamento da cromatina e conseqüentemente silenciamento gênico.

Em células com funcionamento normal as ilhas CpG dos promotores ativos estão hipometiladas, aparentemente protegidas desta modificação epigenética, enquanto que 70 a 80% de todos os dinucleotídeos CpGs dispersos no DNA encontram-se intensamente metilados (hipermetilados),

assim como as regiões intergênicas (transposons, seqüências repetitivas, fragmentos de DNA viral). Estas Ilhas, localizadas nos promotores, normalmente não metiladas, podem se tornar metiladas em células cancerosas e este evento é associado à perda de expressão gênica (Nephew & Huang, 2003). Há ilhas CpG em regiões codificadoras dos genes porém sua metilação não bloqueia a transcrição gênica. (Alberts *et al.*, 1999; De Robertis & Hib, 2001). (Figura 7)

Ilha CpG desmetilada

Metilação da região promotora

Ilha CpG hipermetilada

Figura 7. Representação esquemática da metilação como mecanismo de inativação gênica. As caixas amarelas representam os éxons do gene, os círculos representam dinucleotídeos CpG. Os círculos pretos representam as citosinas metiladas e os círculos brancos denotam citosinas desmetiladas. Esteller M, 2002; - modificado.

Avaliação da metilação do DNA

Existem diferentes técnicas para avaliar o status e/ou grau de metilação do DNA. Os procedimentos atuais exigem amplificação da seqüência alvo, mas as DNAs-polimerases não conseguem discriminar entre

citossina e 5-metilcitossina, apagando todas as informações sobre a 5-metilcitossina durante a amplificação. Por este motivo, todas elas exigem um tratamento prévio do DNA com enzimas ou produtos químicos (bissulfito de sódio é o mais utilizado) capazes de modificar bases covalentes, para discriminar as citosinas metiladas das não-metiladas. (Dahl & Guldberg, 2003)

Tratamento do DNA com bissulfito de sódio

O bissulfito de sódio em reação com o DNA elimina o grupo amina da citossina, convertendo-a em uracila. Já a citossina metilada fica protegida e permanece citossina (Figura 8) (Herman *et al.*, 1996; Woodson *et al.*, 2003).

Figura 8. Esquema da conversão da sequência do DNA pela ação do bissulfito de sódio.

A etapa crítica para determinar corretamente o grau de metilação é a conversão completa das citosinas não metiladas em uracilas; que é alcançada por incubação do DNA com altas concentrações de sal de bissulfito, a elevada temperatura e baixo pH. Estas condições usualmente levam a alta degradação e subsequente perda do DNA durante a purificação (ref: EpiTect Bissulfite Kit - QIAgen, 2006).

Posteriormente ao tratamento com bissulfito pode-se aplicar diferentes metodologias para análise da metilação. Algumas das técnicas mais utilizadas são: a análise do DNA com enzimas de restrição, a PCR metilação específica (MSP) (qualitativa), PCR em tempo real quantitativo metilação específica (QMSP) e o Bissulfito-Sequenciamento.

PCR metilação específica (MSP)

A técnica de PCR metilação específica (MSP) é sensível e específica, sendo amplamente utilizada na detecção do padrão de metilação de sítios CpGs do DNA.

Esta técnica faz uso de dois pares de iniciadores cuidadosamente desenhados, sendo que um par se anela à sequência metilada e o outro à sequência não metilada (após tratamento do DNA com bissulfito). Os iniciadores são desenhados para serem homólogos a uma região rica em CpG contendo pelo menos um dinucleotídeo CpG. A presença ou ausência de alelos metilados é avaliada qualitativamente através da análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel. (Herman *et al.*, 1996).

PCR em tempo real quantitativo metilação específica (QMSP)

O método PCR em tempo real quantitativo metilação específica (QMSP) combina a tecnologia PCR em tempo real com a MSP buscando quantificar a metilação. Este método (denominado *MethylLight*) faz uso da tecnologia de fluorescência TaqMan (Applied Biosystems) e emprega iniciadores específicos além de uma sonda fluorescente. Os iniciadores e a

sonda são desenhados para anelarem-se à sequência metilada bissulfito convertida, contendo sítio CpG, do gene de interesse. Também é empregado um segundo par de iniciadores com sua respectiva sonda, para amplificar uma sequência bissulfito convertida sem sítios CpG de um gene controle interno (por exemplo *bACT* ou *COL2A1*) servindo como normalizador da quantidade de DNA adicionado em cada reação. Sendo assim, a QMSP apresenta maior sensibilidade e especificidade devido às condições de amplificação mais rigorosas. (Eads *et al.*, 2000; Ogino *et al.*, 2005)

O nível de metilação de cada amostra depende do grau de amplificação e da fluorescência emitida pela sonda hibridizada. A amplificação é proporcional ao grau de citocinas metiladas na região estudada e o nível de metilação é calculado como a relação entre o valor de amplificação do gene alvo e o do gene controle interno (Jerónimo *et al.*, 2001).

Modificações desta técnica tem sido proposta para diminuir os custos, utilizando o corante *Syber Green* para a detecção quantitativa da metilação (Chan *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2007).

Bissulfito-Sequenciamento

Esta técnica consiste no seqüenciamento do DNA bissulfito tratado, possibilitando a identificação do status de metilação de cada sítio CpG individualmente, realizando assim um mapeamento da metilação da sequência de DNA em estudo. É necessário que a sequência alvo seja

analisada por fragmentos, uma vez que esta técnica exige que os fragmentos de DNA sejam previamente clonados evitando sobreposição de bases no momento da leitura do sequenciamento. Os iniciadores utilizados são desenhados para amplificarem no máximo 250-300pb e anelarem-se à seqüência metilada bissulfito convertida sem nenhum sítio CpG, o que acaba exigindo grande cautela por se tratar de uma ilha CpG. (Frommer *et al.*, 1992). A avaliação quantitativa da metilação da região em estudo é alcançada através do seqüenciamento de vários clones do mesmo fragmento.

Metilação e Câncer de Tireóide

Muitos fatores genéticos e ambientais contribuem para o desenvolvimento do câncer, mas a metilação do DNA pode fornecer uma ligação importante entre estas influências. A estabilidade genômica e a expressão gênica normal são mantidas por um padrão fixo de metilação predeterminado (Esteller, M. 2003).

Nos últimos anos foi publicado crescente número de estudos que objetivaram aprofundar a análise dos padrões de metilação do DNA, principalmente de genes candidatos do processo de tumorigênese. Observou-se que o silenciamento gênico aberrante é um evento freqüente no câncer e está associado com o desenvolvimento da transformação maligna. (Melnick *et al.*, 2005). A metilação aberrante já foi detectada em genes supressores de tumor (*PTEN*, *RASSF1A*, *TIMP3*, *SLC5A8*, *DAPK*, *RARa2*), genes associados a apoptoses (*DAPK*, *CASP8*) e de reparo do

DNA (*hMLH1*, *MGMT*) (Esteller M, 2002; Hu *et al*, 2006; Xing M, 2007; Esteller M, 2008; Stephen *et al*, 2011).

Alvarez-Nunez *et al.* (2006), verificaram que o gene *PTEN* está aberrantemente metilado nos tumores de tireóide benignos e em cânceres papilíferos e foliculares. Este gene participa da via de sinalização PI3K/AKT. Sabe-se que alterações nesta via de sinalização são importantes para o desenvolvimento da tumorigênese da tireóide (Ringel *et al.*, 2001). Por outro lado, Xing *et al.* (2003) mostraram que a metilação do *rTSH*, nos tumores epiteliais tireoideanos, poderia ser um marcador de malignidade e causar silenciamento gênico.

Como as ilhas CpGs no câncer encontram-se freqüentemente mais metiladas nas células tumorais, esse pode ser um importante alvo na terapia anti-tumoral (Baylin, 2005). Diferentemente de outras alterações genéticas, que são praticamente irreversíveis, aberrações epigenéticas são potencialmente reversíveis permitindo que células malignas revertam para estadios menos desdiferenciados, tornando viável o tratamento epigenético do câncer. Assim a investigação da metilação pode ser muito útil para o diagnóstico precoce e para definição do tratamento de vários tipos de tumores. O perfil de metilação pode possibilitar a distinção entre tipos e sub-tipos de tumores e auxiliar na escolha do melhor agente quimioterapêutico para o tratamento. (Yoo & Jones, 2006)

A principal substancia empregada no tratamento do câncer é o 5-Aza-2'-deoxicitina (5-Aza-CdR), um análogo de desoxirribonucleosídeos, capaz de inibir a metilação do DNA pela formação do complexo covalente droga-

DNMT (DNA metiltransferases). A dificuldade da sua administração fica pela sua instabilidade em soluções aquosas. Além de apresentar efeitos tóxicos e potencialmente mutagênicos *in vivo*. (Yoo & Jones, 2006)

Metilação, Cancer de Tireoide e NIS

Em 1999, Venkataraman *et al*, realizaram pela primeira vez um estudo *in silico* da região 5'UTR (-1600b em relação ao sitio de início da tradução) até parte do primeiro exon (+400b em relação ao sitio de início da tradução) o que permitiu detectar uma ilha CpG composta por três regiões com alta frequência de dinucleotídeos CpGs, em relação ao restante do DNA (Figuras 9). Esta descoberta propiciou o início do estudo da metilação do DNA no gene *NIS*.

Figura 9. Frequência de dinucleotídeos CpGs na região promotora de *NIS*. 0:ATG, início da tradução; Caixas A, B e C correspondem às regiões de *NIS* altamente ricas em CpG (ilha CpG) em relação ao restante do DNA (Venkataraman *et al*, 1999-modificado).

Esta ilha encontra-se em regiões regulatórias do promotor do gene *NIS* (entre aproximadamente -450pb a + 350pb). O sítio de início da transcrição do gene *NIS* localiza-se a -375nt do resíduo de adenosina do sítio de início da tradução (ATG) (Ryu *et al*, 1998) e o possível TATA Box (AATAAAT) encontra-se a -404nt (Behr *et al*, 1998; Ryu, *et al*, 1998). O fragmento mínimo para atividade do promotor de *NIS* (promotor mínimo)

compreende a sequência entre os nucleotídeos -375 e -165 relativos ao sítio ATG. (Figuras 9 e 10) (Ryu, *et al.*, 1998).

Figura 10. Representação esquemática da estrutura do promotor do gene *NIS*. As posições dos nucleotídeos estão em referência ao início da tradução (ATG). Retângulo preto representa a sequência do TATA Box, O retângulo amarelo e preto representa a sequência do promotor mínimo.

Venkataraman *et al.*, (1999) mostraram que a perda de captação do iodo poderia estar associada à perda do transcrito como consequência de hipermetilação. Todavia, não conseguiram definir o padrão de metilação de *NIS* em câncer de tireóide. Além disso, mostraram pela primeira vez o restabelecimento da captação de iodo radioativo em linhagens celulares após tratamento com agentes desmetilantes.

Em 2004, Neumann *et al.*, também não conseguiram definir um padrão de metilação do gene *NIS* na células tireoideana, embora tenham detectado que 50% dos casos de nódulos benignos tireoideano (frios), com reduzidos níveis de expressão do RNAm de *NIS*, apresentavam os promotores hipermetilados.

Recentemente, Stephen *et al.* (2011), observaram considerável metilação do gene *NIS* em 54% das amostras de câncer de tireóide e em 27% das amostras de tecido adjacente analisadas

OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos:

- 1) avaliar o grau de metilação do promotor do gene *NIS*, em amostras de tumores tireoideanos (benignos e malignos) e nos tecidos não-tumorais adjacentes;
- 2) correlacionar os valores de metilação com os níveis de RNAm de *NIS*, com o intuito de verificar se a menor expressão de *NIS* nos tumores seria consequência da hipermetilação do promotor deste gene.

CASUÍSTICA E METODOLOGIA

Casuística

Foram incluídos neste estudo 30 pares de amostras de tecido tumoral e não tumoral do mesmo paciente com carcinoma diferenciado de tireóide, submetidos a tireoidectomia total no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. As amostras foram conservadas em N₂ líquido e separadas em dois grupos: as amostras dos pacientes com tumor benigno (n=10) foram denominadas grupo benigno, e as dos pacientes com tumor maligno não captantes (n=20) foram denominadas grupo maligno.

Dentre os 30 pacientes, 80% (24/30) eram do sexo feminino e 20% (6/30) do sexo masculino. No grupo benigno a idade variou de 34 a 74 (51,2 anos) e no grupo maligno a idade variou de 25 a 75anos (45,2 anos). Com relação à função tireoidiana, todos os pacientes do grupo benigno apresentavam TSH dentro da normalidade ($1,29 \pm 0,98 \mu\text{U/mL}$), assim como os do grupo maligno ($1,47 \pm 1,58 \mu\text{U/mL}$), com exceção de dois pacientes (paciente 13, TSH: $0,11 \mu\text{U/mL}$; paciente 21, TSH: $6,84 \mu\text{U/mL}$) (referência $0,5\text{-}4,2 \mu\text{U/mL}$). Deste modo os dois grupos foram homogêneos quanto à idade, sexo e TSH. (Tabela 1). Foi incluída também um par de amostras tumoral e não tumoral adjacente de um paciente portador de nódulo hipercaptante. (Tabela 1,2)

Tabela 1. Características dos pacientes, função tireoideana e diagnóstico anatomopatológico.

PAC.	SEXO	IDADE (anos)	TSH (μ U/mL)	ANÁTOMO-PATOLÓGICO
GRUPO BENIGNO				
1	F	59	1,29	Bócio Coloide multinodular
2	F	49	1,71	Bócio Coloide multinodular
3	F	34	1,18	Bócio Coloide
4	F	39	0,84	Bócio Coloide
5	M	60	3,73	Bócio Coloide
6	M	74	0,99	Bócio Coloide multinodular
7	F	49	0,42	Bócio Coloide
8	F	34	1,83	Adenoma Folicular
9	M	60	0,67	Adenoma Folicular
10	F	38	2,84	Adenoma Folicular
GRUPO MALIGNO				
11	F	68	3,04	Carcinoma Papilífero
12	F	25	0,11	Carcinoma Papilífero
13	M	31	0,89	Carcinoma Papilífero
14	F	40	2,83	Carcinoma Papilífero
15	F	49	1,60	Carcinoma Papilífero
16	F	57	0,75	Carcinoma Papilífero
17	F	49	1,63	Carcinoma Papilífero
18	F	47	0,90	Carcinoma Papilífero
19	F	40	6,84	Carcinoma Papilífero
20	F	31	1,20	Carcinoma Papilífero
21	F	26	1,04	Carcinoma Papilífero
22	M	27	1,04	Carcinoma Papilífero
23	F	46	1,72	Micro CA papilífero
24	F	54	1,19	Carcinoma Papilífero
25	F	44	3,70	Carcinoma Papilífero
26	F	45	1,29	Carcinoma Papilífero
27	F	36	3,45	Carcinoma Papilífero
28	F	48	1,52	Carcinoma Papilífero + Hurthle
29	M	48	1,96	Carcinoma Folicular
30	F	65	1,89	Carcinoma Folicular
Amostra hipercaptante				
31	F	30	0,27	Bócio adenomatoso

PAC.- paciente

Em estudo anterior realizado por nosso grupo (Sodré *et al*, 2008) foi confirmada, através de PCR em tempo real, menor expressão do gene *NIS* nos tecidos não captantes (frio) tumorais (benignos e malignos) comparativamente aos não tumorais adjacentes (Tabela 2).

Tabela 2: Expressão gênica de *NIS* (UA: unidade arbitrárias) nas amostras deste estudo

Paciente	Expressão gênica de <i>NIS</i> (UA)	
	Não Tumoral	Tumoral
GRUPO BENIGNO		
1	28,196	1,556
2	1,938	0,735
3	4,975	0,000
4	403,391	0,014
5	62,492	0,000
6	0,191	0,029
7	9,578	0,040
8	2,321	0,021
9	0,631	0,200
10	4,520	0,258
GRUPO MALIGNO		
11	19,914	0,036
12	3,425	1,126
13	153,729	15,968
14	323,650	20,580
15	5239,227	0,035
16	2,748	0,722
17	2953,720	0,252
18	30,991	0,004
19	1198,860	0,005
20	903,731	0,003
21	35,408	0,058
22	0,007	0,002
23	0,644	0,000
24	32,964	15,551
25	11,125	0,532
26	0,137	0,000
27	2,602	0,000
28	6,247	0,963
29	1,285	0,008
30	2,646	0,000
Amostra hipercaptante		
31	20,572	547,349

O estudo foi aprovado pela comissão de Ética Médica do Hospital das Clínicas da FMUSP e todos os participantes deram consentimento formal antes da coleta de material biológico, após informação sobre o estudo.

Metodologia

Extração do DNA genômico de tecido

Foi empregado o estojo comercial QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Valencia, CA) nas extrações de DNA.

Inicialmente 25mg de tecido glandular foram pulverizados em aparelho Mikro dismembrator U (B. Braun Biotech Internacional) por um minuto. Todo o pó foi ressuspensionado em 180µL de Buffer ATL e toda a solução transferida para tubo de 1,5mL. Adicionou-se 20µL de proteinase K, agitou-se e incubou-se em banho-maria a 56°C com agitação durante 3 horas. Adicionou-se 200µL de Buffer AL, agitou-se em "vortex" por 15 segundos, e incubou-se a 70°C por 10 minutos. Adicionou-se 200µL de etanol 96-100%. Após agitar por 15 segundos com cuidado, transferiu-se todo o material para coluna de purificação (com tubo coletor 2mL). Centrifugou-se a 8000rpm por 1 minuto a temperatura ambiente (TA). Colocou-se a coluna em um novo tubo coletor e adicionou-se 500µL de Buffer AW1 e centrifugou-se a 8000rpm por 1 minuto a TA. A coluna foi transferida para novo tubo coletor e acrescentou-se 500µL de Buffer AW2 e centrifugou-se a 14000rpm por 3 minutos a TA. Transferiu-se a coluna para tubo de 1,5mL e adicionou-se 200µL de água destilada. Para finalizar, incubou-se a TA por 5 minutos e centrifugou-se a 8000rpm por 1 minuto a TA. O material foi conservado a 4°C.

Através da análise por eletroforese em gel de agarose observou-se que as amostras apresentavam menor grau de degradação (Figura 12) que as obtidas com o método anterior (Figura 11). Sendo assim usou-se esta metodologia em todo o estudo.

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, de DNAs extraídos pelo estojo comercial QIAamp DNA Mini. M- marcador de peso molecular, 1-4-amostras de DNA tireoideano.

Quantificação de DNA

As amostras de DNA foram quantificadas em dois momentos durante este estudo: após extração e após tratamento com bissulfito de sódio. Quantificou-se as amostras de DNA através de leitura a DO 260nm e DO 280nm em espectrofotômetro (Nanodrop-ND1000, Wilmington, DE). Foi considerado $DO_{260nm} = 1$ equivalente a 50ng.

Amplificação por Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Todas as reações de polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas em termo-ciclador Veriti (Applied Biosystems, Life Technologies. Carlsbad, CA), e todos os iniciadores utilizados neste estudo estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Iniciadores empregados neste estudo

Iniciadores *	Seqüência 5' → 3'	Referência
Iniciadores para seqüências de DNA não tratadas com bissulfito de sódio		
1. Tg – F	5' GAAGGGAAAGTCTTGGTTTTGG 3'	Pardo <i>et al.</i> , 2008
2. Tg – R	5' GAGTCTATCGATGCAAATTGGG 3'	Pardo <i>et al.</i> , 2008
3. NISpOrig – F	5' GATCAGGGGATCACAGTGC 3'	Este trabalho
4. NISpOrig2 – R	5' CAGGCACATCCAGAGGAACT 3'	Este trabalho
5. BRAF_F	5' AAACCTCTCATAATGCTTGCTCTG 3'	Kimura <i>et al.</i> , 2003
6. BRAF_R	5' GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA 3'	Kimura <i>et al.</i> , 2003
7. gAPDH_F	5'GCTGGCATTGCCCTCA3'	Pardo <i>et al.</i> , 2008
8. gAPDH_R	5'GGCAGGGACTCCCCAG3	Pardo <i>et al.</i> , 2008
9. TTF1_F	5'CAGGACACCATGAGGAACAG 3'	Pardo <i>et al.</i> , 2008
10. TTF1_R	5'GCCATGTTCTTGCTCACGTC3'	Pardo <i>et al.</i> , 2008
11. PAX8_F	5'GGCAGCGACAAGAGGAAAAATGG3'	Pardo <i>et al.</i> , 2008
12. PAX8_R	5'GTGGCGTGTGGAAGGGGTCAG3'	Pardo <i>et al.</i> , 2008
13. rTSH_F	5'CTTGCTGGACGTGTCTCAA 3'	Pardo <i>et al.</i> , 2008
14. rTSH_R	5'TAAGAAAGGTGAGCCCGTGT3'	Pardo <i>et al.</i> , 2008
15. nconvEnhancerNIS_F-KpnI	5'CCGGGTACCGCCTGACCAGGGTGGAAGGAGA3'	Este trabalho
16. nconvEnhancerNIS_R-XhoI	5'CCGCTCGAGCTCCTCTGGCCTACCCTCTGCCC3'	Este trabalho
17. NIS-F	5'ACACTGACTGCGACCCTCTCCT3'	Sodré <i>et al.</i> , 2008
18. NIS-R	5'TGCTGAGGGTGCCACTGTAA3'	Sodré <i>et al.</i> , 2008
Iniciadores para seqüências de DNA tratadas com bissulfito de sódio		
19. bACT-F	5' GGTGGAGGTAGTTAGGGTTTATTGTGA 3'	Woodson <i>et al.</i> , 2003
20. bACT-R	5' CCACAAAATCACACTTAACCTCATTT 3'	Woodson <i>et al.</i> , 2003
21. NISA1 –F	5' TTAGGTTTGGAGGCGGAGTCGC 3'	Venkataraman <i>et al.</i> , 1999
22. NISA2 –F	5' AAGGGTGCGGTTTTGTTCG 3'	Este trabalho
23. NISA –R	5' ACCGACTATCTATCCCTCTCCCTAAACG 3'	Venkataraman <i>et al.</i> , 1999
24. NISA1 NM-F	5' TTGTTTTTAGGTTTGGAGGTGGAGTTGT 3'	Venkataraman <i>et al.</i> , 1999
25. NISA2 NM –F	5' TGAAAGGGTGTGGGTTTTGTTTG3'	Este trabalho
26. NISA NM –R	5' CAACCAACTATCTATCCCTCTCCCTAAACA 3'	Venkataraman <i>et al.</i> , 1999
27. NISB –F	5' ATAGATAGATAGTAGGGGCGGAC 3'	Venkataraman <i>et al.</i> , 1999
28. NISB –R	5' GACCTCCATAAAAACGAATACG 3'	Venkataraman <i>et al.</i> , 1999
29. NISB NM -F	5' TAGGATAGATAGATAGTAGGGGTGGAT 3'	Venkataraman <i>et al.</i> , 1999
30. NISB NM -R	5' CTCCACAACCTCCATAAAAACAAATACA 3'	Venkataraman <i>et al.</i> , 1999
31. NISC –F	5' AGGTCGTGGAGATCGGGGAAC 3'	Venkataraman <i>et al.</i> , 1999
32. NISC –R	5' ACGATAAACCTCCGACGACACG 3'	Venkataraman <i>et al.</i> , 1999
33. NISC NM -F	5' TTATGGAGGTTGTGGAGATTGGGGAAT 3'	Venkataraman <i>et al.</i> , 1999
34. NISC NM -R	5' CATAACAATAAACCTCCAACAACACA 3'	Venkataraman <i>et al.</i> , 1999
35. NISpConv - F	5' AGTTTAGGGTTGAAAGGGTG 3'	Este trabalho
36. NISpConv – R	5' TTCAAAAACCTAACCCAAACACA 3'	Este trabalho
37. NIS Is1B-F	5' GTTTGATTAGGGTGGAAGGAGA 3'	Este trabalho
38. NIS Is1B-R	5' AATAAACCTATCCCTCCCC 3'	Este trabalho
39. NIS Is1C-F	5' GAGAGGGAGTAAGAGGATTGTT 3'	Este trabalho
40. NIS Is1C-R	5' CTCCTCTAACCTACCCTCTACC 3'	Este trabalho

* F- sense, R- anti-sense, NM- não metilado.

As reações, com os iniciadores de 1 a 4 e de 19 a 36, continham: 100ng de DNA genômico, 0,3U de Taq platinum DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA); 1X Buffer PCR; 3 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, iniciadores (tabela 4) e água milique qsp 25 μ L, e foram incubadas a 95°C por 5 minutos, número variável de ciclos de 20 segundos a 94°C, 30 segundos a temperaturas de anelamento variáveis e 30 segundos a 72°C (tabela 4); e extensão final de 1 minuto a 72°C.

As reações, com os iniciadores 5, 6; 15,16 e de 37 a 40, continham: 100ng de DNA genômico, 0,3U de GoTaq® DNA Polimerase (Promega, Madison, WI, EUA); 1X de Green GoTaq® Reaction Buffer; 0,2 mM de cada dNTP, iniciadores (tabela 4) e água milique qsp 25 μ L, e foram incubadas a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 40 segundos a 95°C; 40 segundos a temperaturas de anelamento variáveis (tabela 3) e 40 segundos a 72°C; e extensão final de 7 minuto a 72°C.

Análise dos produtos de PCR

Os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,8 a 2% em TAE 1X (4,84 g tris base; 1,14mL ácido acético; 2mL EDTA 0,5M pH8 e 1000mL de água.), contendo 0,001mg/mL de brometo de etídio. Utilizando-se de 1 μ L a 9 μ L de cada amostra, e ladder 100pb (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) como marcador de tamanho molecular.

Tabela 4. Padronização das PCRs

Pares de iniciadores	Conc de cada iniciador (uM)	Ciclos (N°)	T anelamento (°C)	Tamanho do amplificado (pb)
Iniciadores para seqüências de DNA não tratadas com bissulfito				
Tg -F/ Tg -R	0,2	40	58	340
NISpOrig -F/ NISpOrig2 -R	0,12	40	63	876
BRAF_F/BRAF_R	0,1	40	52	230
nconvEnhancerNIS_F-KpnI/ nconvEnhancerNIS_R-XhoI	0,1	40	65	245
Iniciadores para seqüências de DNA tratadas com bissulfito				
bACT-F/ bACT-R	0,16	31	60	102
NISA1 -F/ NISA -R	0,24	35	60	143
NISA1 NM-F/ NISA NM -R	0,24	33	60	151
NISA2 -F/ NISA -R	0,24	38	60	166
NISA2 NM -F/ NISA NM -R	0,24	35	60	176
NISB -F/ NISB -R	0,24	44	60	265
NISB NM -F/ NISB NM -R	0,24	42	60	275
NISC -F/ NISC -R	0,24	38	60	242
NISC NM -F/ NISC NM -R	0,24	35	60	252
NISpConv-F/ NISpConv-R	0,12	40	63	769
NIS Is1C-F/ NIS Is1C-R	0,24	40	56	98
NIS Is1B-F/ NIS Is1C-R	0,24	40	58	245

uM - micro molar, N° - número, °C - graus Celsos, pb - pares de base

Avaliação da qualidade do DNA

Para verificar se o DNA, que apresentava certo grau de degradação, poderia ser utilizado, foi amplificado inicialmente o gene da tireoglobulina (*Tg*) empregando os iniciadores Tg-F/Tg-R (Tabela 3).

Verificou-se amplificação adequada dos fragmentos desejados dos diferentes DNAs extraídos (Figura 13).

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da amplificação da PCR do fragmento de TG. M- marcador de peso molecular, 1-5 DNAs de pacientes, 6- controle negativo da PCR.

Posteriormente, para verificar se a região promotora do gene *NIS* (alvo deste estudo) estava preservada, utilizou-se os iniciadores NISpOrig-F/NISpOrig2-R (Tabela 3). Após padronização da reação foi possível visualizar produto da PCR de tamanho esperado (876pb) (Figura 14). E através de sequenciamento foi confirmado que o produto amplificado correspondia à sequência do promotor do gene *NIS*.

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação da PCR da região promotora de *NIS* (876bp). M- marcador de peso molecular, 1-3, DNAs de pacientes 4- controle negativo da PCR.

Confirmou-se assim, a integridade da região em estudo, e que o DNA, mesmo com certo grau de degradação, poderia ser utilizado.

Sequenciamento

Os produtos de PCR foram tratados com 2µL da enzima Exo Sap-IT (USB ®) a cada 5µL do produto da PCR, e incubou-se por 15 minutos a 37°C, seguido de 15 minutos a 80°C.

A reação de sequenciamento continha 3,5µL de amostra tratada com Exo Sap-IT, 1µL de reagente “Big Dye”, 1µL do iniciador empregado na amplificação (5 pmol) e 1,5µL de tampão “Big Dye” do estojo *DNA Sequencing Big Dye Terminator v 3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Life Technology, Carlsbad, CA), em 10µL de volume final. A reação foi incubada em termo ciclador PTC 100 (MJ Research, Inc.) por 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos. Purificou-se por precipitação adicionando-se 40µL de isopropanol 75%. Após homogeneização, centrifugou-se por 30 segundos a velocidade máxima, e incubou-se por 20 minutos a TA, protegida da luz. Centrifugou-se por 25 minutos a velocidade máxima e o sobrenadante foi descartado por inversão de tubo. Acrescentou-se 200µL de etanol 70%, homogenizou-se, e centrifugou-se por 5 minutos a velocidade máxima. Descartou-se o sobrenadante, secou-se todo o etanol e ressuspendeu-se em tampão de amostra. Finalmente os produtos de PCR foram seqüenciados utilizando o equipamento ABI 377 (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA).

Análise das sequências

As seqüências obtidas foram comparadas com a seqüência do gene *NIS* disponível em banco de dados na internet, acesso: NM_000453, com a sequência do gene *BRAF*, acesso:NC_000007,13.

Tratamento do DNA com bissulfito de sódio

Foram testadas duas metodologias diferentes para tratar o DNA com bissulfito de sódio: utilizando estojo comercial *EpiTect Bisulfite* (QIAGEN, Valencia, CA) e técnica manual. Foram testados também quatro diferentes metodologias de purificação do DNA bissulfito tratado: utilizando estojo comercial *EpiTect Bisulfite*, estojo comercial “*GFXtm PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Uppsala, Sweden), por precipitação e por modo manual.

Após os diferentes métodos de tratamento e purificação, as amostras de DNAs foram submetidos à amplificação do promotor de *NIS* com os iniciadores NISpConv-F/NISpConv-R (Tabela 3) para verificação da eficácia do tratamento. Estes iniciadores foram especialmente desenhados para anelarem-se a uma região sem dinucleotídeos CpGs, com bases convertidas.

Verificou-se que a metodologia de tratamento do DNA com bissulfito de sódio e purificação empregando-se o estojo comercial *EpiTect Bisulfite* foi mais eficiente (Figura 15). Sendo assim usou-se esta metodologia em todo o estudo.

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação da PCR da região promotora de *NIS* convertida pelo estojo comercial *EpiTect Bisulfite*. M- marcador de peso molecular, 1-5 DNAs d pacientes, 6- controle negativo da PCR.

Novamente, a correta conversão do DNA no tratamento com bissulfito de sódio foi confirmado através de sequenciamento de algumas amostras com iniciadores NISpConv-F/ NISpConv-R (tabela 3), verificando-se a presença de timina no lugar de citosina (Figura16). O tratamento de bissulfito converte a citosina não metilada em uracila que é reconhecida como timina nas PCRs.

Figura 16. Cromatogramas das seqüências de DNA original (pré-tratamento com bissulfito de sódio) e das seqüências de DNA bissulfito convertidas (pós tratamento). Os retângulos pretos destacam as bases nitrogenadas convertidas (citosina → uracila/timina). O tratamento de bissulfito converte a citosina não metilada em uracila que é reconhecida como timina nas PCRs.

Tratamento do DNA com bissulfito de sódio empregando-se o estojo comercial *EpiTect Bisulfite* (QIAgen, Valencia, CA)

Dissolveu-se o Mix bissulfito, com água livre RNase, conforme protocolo do fabricante. Agitou-se até que o Mix bissulfito estivesse completamente dissolvido. A reação de bissulfito foi preparada em tubos de PCR de 200µL de acordo com as condições descritas na tabela 5, adicionando cada componente na ordem listada.

Tabela 5. Componentes da padronização da reação de bissulfito.

Componentes	Volume por reação (uL)
Solução de DNA (1ug)	Variável (máximo 20uL)
Água livre-Rnase	Variável (complementar o volume de solução de DNA para 20uL)
Mix bissulfito	85UI
Buffer protetor de DNA	35uL
Volume Total	140uL

Após homogenização a reação foi incubada em termo-ciclador PTC 100 (MJ Research, Inc. Waltham, MA) utilizando as condições descritas na tabela 6.

Tabela 6. Condições da reação de bissulfito em termo-ciclador

Etapas	Tempo	Temperatura
Denaturação	5 min	99° C
Incubação	25 min	60° C
Denaturação	5 min	99° C
Incubação	85 min (1h 25min)	60° C
Denaturação	5 min	99° C
Incubação	175 min (2h 55min)	60° C
	24h	20° C

Purificação do DNA bissulfito convertido com estojo comercial *EpiTect Bisulfite* (QIAgen, Valencia, CA).

Centrifugou-se brevemente os tubos de PCR contendo a reação de bissulfito e, em seguida, transferiu-se toda reação para novo tubo de 1,5mL.

Adicionou-se 560µL de tampão BL recentemente preparado contendo 10ug/mL de RNA carregador. Após misturar a solução em "vortex" e centrifugar brevemente, transferiu-se todo o volume para coluna EpiTect spin. Centrifugou-se na velocidade máxima durante 1 minuto, descartou-se o filtrado. Adicionou-se 500µL de tampão de lavagem BW e centrifugou-se na velocidade máxima durante 1 minuto. Após descartar o filtrado, adicionou-se 500µL de tampão de desulfonação BD e incubou-se durante 15 minutos a TA. Centrifugou-se na velocidade máxima por 1 minuto e descartou-se o filtrado. Adicionou-se 500µL de tampão BW, centrifugou-se na velocidade máxima por 1 minuto e descartou-se o filtrado. A lavagem foi repetida mais uma vez. Colocou-se a coluna em novo tubo coletor de 2mL e centrifugou-se a velocidade máxima por 1 minuto para remover qualquer resíduo líquido. Transferiu-se a coluna para novo tubo coletor de 1,5mL e o material foi eluído 2 X com 20µL de tampão EB, colocado no centro da membrana, e centrifugação por 1 minuto a 12000rpm. Armazenou-se o material purificado a – 20° C.

Preparação dos DNAs controles

Foram utilizados três tipos de DNAs controles, todos preparados a partir de DNA de tecido tireoideano (bócio):

- DNA sem nenhum tratamento (DNA-normal),
- DNA metilado in vitro e tratado com bissulfito (DNA-metil-bis),
- DNA somente tratado com bissulfito (DNA-normal-bis).

O DNA-metil-bis foi submetido a tratamento com a enzima CpG methylase (M. Sssl) para que todas as citosinas dos sítios CpGs fossem metiladas, e assim servir como controle 100% do grau de metilação. A reação foi realizada nas seguintes condições: 1X NEBuffer 2 (10X), 160µM S-adenosylmethionine (200X), 1U enzima CpG metilase M.Sssl metiltransferase (New England – BioLabs), 1µg do DNA e água qsp 20uL, e incubada por 1 hora a 37 °C e armazenada a 4 °C.

Amostras de DNA metilado e não metilado foram tratadas com bissulfito de sódio e purificadas. É importante ressaltar que após o tratamento com bissulfito o DNA metilado *in vitro* conserva a seqüência original nos sítios CpGs; pois a metilação protege o DNA da ação do bissulfito de sódio. Enquanto que o restante das citosinas (fora de sítios CpGs) são convertidas em uracila (timina) Já o DNA somente tratado com bissulfito (DNA-normal-bis) pode ter todas as citosinas convertidas em uracila, tanto as dos sítios CpGs (se estiverem desmetiladas) quanto às do restante do DNA. (Figura 8)

Avaliação do grau de metilação da ilha1 CpG do gene *NIS*

Para verificar o padrão de metilação do gene *NIS*, inicialmente analisou-se a região do promotor de *NIS* com alta frequência de dinucleotídeos CpGs previamente descritas por Venkataraman *et al* (1999) aqui denominada ilha1 (ilha1 CpG). Para isto, dividiu-se essa região, compreendida entre os nucleotídeos -466 e +242 (referente ao sítio de início de tradução de *NIS*) em 4 fragmentos: A1, A2, B e C. Sendo os fragmentos

A1 e A2 pertencentes a região promotora e os fragmentos B e C a regiões transcrita e traduzida respectivamente. (Figura 17)

Figura 17. Ilha CpG 1 no promotor do gene *NIS*. As posições dos nucleotídeos estão em referência ao sítio de início da tradução ATG. **AATAAAT** TATA Box, **hachuras amarelas** promotor mínimo. **→**: A1, **→**: A2, **→**: B e **→**: C correspondem às regiões de anelamento dos primers para análise do grau de metilação neste estudo.

Para avaliar o grau de metilação foram inicialmente utilizadas duas técnicas: PCR em tempo real quantitativo metilação específica modificada (QMSP-modificada) e PCR metilação específica semiquantitativa (MSP) por nós modificada e padronizada.

PCR em tempo real quantitativo metilação específica (QMSP)-modificada

Amostras de DNA bissulfito convertido foram amplificadas utilizando quatro pares de iniciadores NISA1-F/NISA-R, NISA2-F/NISA-R, NISB-F/NISB-R, NISC-F/NISC-R (Tabela 3) que se anelam especificamente às seqüências metiladas bissulfito convertidas. Também foi amplificado o gene *β-actina* (*bACT*) como controle interno cujos iniciadores bACT-F/bACT-R (Tabela 3) anelam-se a região sem sítios CpG. Sendo assim, a amplificação do controle interno é independente do grau de metilação do DNA.

As reações foram realizadas em volume final de 15μL contendo: 50 ng DNA, 1X Tampão *Sybr green*, 0,2μM iniciadores e qsp de água; e incubadas

por 5 minutos a 95°C; 60 ciclos de: 20 segundos a 94°C, 30 segundos 60°C e 30 segundos a 72°C; e extensão final de 1 minuto a 72°C. Foi empregado o equipamento Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, QIAgen, Valencia, CA) e estojo comercial *Platinum Sybr green qPCR* super mix UDG (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA). Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

PCR metilação específica semiquantitativa (MSP) - modificada

A MSP é uma técnica qualitativa na qual o DNA após ser tratado com bissulfito de sódio deve ser amplificado por PCR em duas reações distintas. São empregados um par de iniciadores que se anela à seqüência metilada e um par de iniciadores que se anela a seqüência não metilada, em reações independentes. (Herman *et al*, 1996).

A modificação introduzida neste trabalho foi a utilização da técnica de MSP para semi-quantificar o grau de metilação das regiões em estudo. Para isso, além da amplificação do gene *NIS* com dois pares de iniciadores para cada fragmento [A1 (NISA1-F/NISA-R, NISA1_NM-F/NISA_NM-R), A2 (NISA2-F/NISA-R, NISA2_NM-F/NISA_NM-R), B (NISB-F/NISB-R, NISB_NM-F/NISB_NM-R) e C (NISC-F/NISC-R, NISC_NM-F/NISC_NM-R)] foi amplificado o gene *bACT* (gene controle interno) utilizando iniciadores (bACT-F/bACT-R) que se anelam à seqüência bissulfito convertida sem sítios CpG; servindo como normalizador da quantidade de DNA adicionado a cada reação de PCR. (Tabela 3)

Todas as reações foram realizadas com 100ng de DNA tratado com bissulfito de sódio e as padronizações estão descritas no item "*Amplificação por Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)*".

Para a semiquantificação realizou-se curvas de amplificação, para cada um dos fragmentos de *NIS* e para *bACT*, com diferentes números de ciclos; com o intuito de determinar o ciclo em que a amplificação encontrava-se na fase exponencial. Para tanto, foi feita dosimetria dos produtos de PCR após eletroforese em gel de agarose 2% utilizando o programa *Molecular Analytic Software* (Figuras18 a 22). Para a avaliação semiquantitativa da metilação dos fragmentos A1, A2, B e C de *NIS* foram escolhidos os seguintes números de ciclos: *bACT*: 31 ciclos, *NIS* A1: 35 ciclos, *NIS* A2: 38 ciclos, *NIS* B:44 ciclos e *NIS* C: 38 ciclos (Figuras18 a 22).

Figura 18. Curva de amplificação, com diferentes números de ciclos, de fragmento da *bACT*. Foi escolhido o ciclo 31 como o mais adequado para a semiquantificação.

Figura 19. Curva de amplificação, com diferentes números de ciclos, do fragmento A1 de *NIS*. Foi escolhido o ciclo 35 como o mais adequado para a semiquantificação.

Figura 20. Curva de amplificação, com diferentes números de ciclos, do fragmento A2 de *NIS*. Foi escolhido o ciclo 38 como o mais adequado para a semiquantificação.

Figura 21. Curva de amplificação, com diferentes números de ciclos, do fragmento B de *NIS*. Foi escolhido o ciclo 44 como o mais adequado para a semiquantificação.

Figura 22. Curva de amplificação, com diferentes números de ciclos, do fragmento C de *NIS*. Foi escolhido o ciclo 38 como o mais adequado para a semiquantificação.

Identificação *in silico* de ilhas CpG no promotor de *NIS*

Analisou-se extensivamente a região 5' do gene *NIS*, entre as posições -4500pb e +500pb em relação ao sítio de início da tradução (ATG) empregando-se novas ferramentas de informática disponíveis visando detectar novas ilhas CpGs, ainda não relacionadas ao gene *NIS*.

Para isso utilizou-se inicialmente o programa "CpG Island Search" versão 1.3 [cpgi130.pl](http://cpgislands.usc.edu), disponível em <http://cpgislands.usc.edu> (Takai & Jone, 2002), seguindo os parâmetros descritos por esses autores (tabela 7). Este programa determina potenciais ilhas CpG através dos cálculos de porcentagem de bases guaninas e citosinas (C+G), da razão entre o número de sítios CpG observados e sítios CpG esperados (CpGobs/CpGesp) e o tamanho mínimo do fragmento desejado.

Tabela 7. Critérios adotados na identificação de uma ilha CpG

Parâmetros	<u>Gardiner-Garden & Frommer, 1987</u>	<u>Takai & Jones, 2002</u>
	(GGF)	(TJ)
Conteúdo C+G	≥50%	≥55%
CpGobs/CpGesp	≥0,6	≥0,6
Tamanho mínimo do fragmento	200pb	500pb

C. citosina, G. guanina

Em seguida, realizaram-se análises a fim de determinar se a sequência indicada como ilha CpG poderia ser considerada uma ilha CpG funcional. Deste modo, a sequência indicada pelo programa “CpG Island Search” foi analisada pelo programa “CpGcluster” disponível em <http://bioinfo2.ugr.es/CpGcluster/> (Hackenberg *et al.*, 2006), seguindo os parâmetros de limiar de distancia igual a 50 percentil e valor limite do p igual a 1E-5 (Hutter *et al.*, 2009). Este programa permite calcular a distância entre os dinecleotídios CpG de determinado fragmento, para distinguir entre um enriquecimento por acaso de CpG e um agrupamento significativo.

Posteriormente analisou-se esta mesma sequência no programa “RepeatMasker” versão aberta 3.08 disponível em <http://www.repeatmasker.org> para descartar qualquer sobreposição de sequências repetitivas. (Hutter *et al.*, 2009).

Para concluir a determinação de ilhas CpG funcionais no promotor do gene *NIS*, as sequências identificadas como únicas pelo programa “RepeatMasker” foram reanalisadas pelo programa “CpG Island Research” empregando-se desta vez os parâmetros descritos por Gardiner-Garden & Frommer (1987) (tabela 7).

Avaliação do grau metilação da ilha2 CpG do gene *NIS*

Para avaliar o grau de metilação da nova ilha identificada neste estudo (ilha 2 CpG) utilizou-se a técnica de Bissulfito-Sequenciamento. Para isso, dividiu-se esta sequência em dois fragmentos: Is1-B, Is1-C. (Figura 23)

Figura 23. Ilhas CpGs 1 e 2 no promotor do gene *NIS*. As posições dos nucleotídeos estão em referência ao sítio de início da tradução ATG. A região circutada em vermelho corresponde a nova ilha CpG (ilha2) e em preto corresponde à ilha CpG descrita por Venkataraman *et al* 1999 (ilha1). Retângulo azul: fragmento Is1-B, retângulo verde: fragmento Is1-C, setas: pares de iniciadores utilizados para amplificar cada fragmento (NIS_Is1B-F/NIS_Is1B-R, NIS_Is1C-F/NIS_Is1C-R).

Amplificação por PCR da ilha2 CpG

As amostras de DNA bissulfito convertido foram amplificadas utilizando inicialmente o par de iniciadores NIS_Is1B-F/NIS_Is1B-R e NIS_Is1C-F/NIS_Is1C-R (Tabela 3, Figura 23). Posteriormente, foi padronizada a amplificação de toda a ilha2 CpG utilizando os iniciadores NIS_Is1B-F/NIS_Is1C-R. Importante esclarecer que todos estes iniciadores se anelam especificamente às seqüências bissulfito convertidas sem sítios CpG.

Clonagem dos fragmentos da ilha2 CpG

Os fragmentos de PCR da ilha2 CpG foram clonados no vetor PCR 2.1-TOPO (estojo comercial TOPO TA Cloning - Invitrogen, Carlsbad CA), seguindo o protocolo do fabricante e a mistura de ligação foi utilizada para transformar a bactéria *E. coli* JM109.

Transformação de Bactérias por Eletroporação

Um litro de meio LB (1% triptona, 1% NaCl e 0,5% de extrato de levedura) foi inoculado com 10 mL de uma cultura de *E. coli* JM109, previamente crescida por 16 horas e incubada a 37°C, com uma agitação de 100rpm, até apresentar Ab_{600} entre 0,5 a 0,8. As células foram sedimentadas, por centrifugação a 4°C, por 6 minutos, a 4.500g, e ressuspensas em 1L de água destilada estéril gelada. A seguir, as células foram novamente sedimentadas a 4°C, centrifugando-se por 10 minutos, a 4.500 g e ressuspensas em 500mL de água destilada estéril gelada. Centrifugou-se novamente, nas mesmas condições, para posteriormente ressuspender o sedimento em 20 mL de água destilada estéril, a 4°C.

Finalmente, a suspensão de células foi centrifugada durante 10 minutos, a 4.500g, a 4°C, ressuspensa em glicerol 10% a 4°C num volume final de 2 a 3mL e fracionada em alíquotas de 40µL em tubo "eppendorf". Estes tubos foram estocados a -80°C.

Para cada transformação, uma alíquota de 40µL de células competentes foi descongelada, incubando-se em gelo, e adicionou-se de 1,5µL da reação de ligação. Esta mistura foi incubada em gelo por 1 minuto

e posteriormente transferida para uma cubeta de eletroporação de 1mm gelada. O pulso elétrico foi aplicado com o aparelho de eletroporação “Multiporator Eppendorf” calibrado para U 1700 V, T 5,0, modo procariota. Logo após a aplicação do pulso elétrico, as células foram imediatamente ressuspensas em 1mL de meio SOC (2% triptona, 2,5% extrato de levedura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 20mM glicose)., transferidas para um tubo estéril e incubadas durante 1 hora e 15 minutos, a 37°C, com agitação a 150rpm. Finalmente, as células foram semeadas em placas contendo meio seletivo LB ágar-AP. (1% triptona, 1% NaCl, 0,5% de extrato de levedura, 2% Agar e 1% de ampicilina). As placas foram incubadas a 37°C, por 12 horas.

Amplificação por PCR do plasmídio presente na bactéria

Foi realizada a PCR direto das colônias obtidas após transformação utilizando-se 1µL da cultura dos clones obtidos e a metodologia descrita em “*Amplificação por PCR da ilha2 CpG*”.

Bissulfito seqüenciamento

Para análise do grau de metilação da ilha2 CpG foram sequenciados os produtos de PCR dos clones contendo os fragmentos da ilha2, seguindo a mesma metodologia já descrita no item “Seqüenciamento”. Para cada amostra foram seqüenciados 8 clones independentes.

Avaliação da presença da mutação V600E no gene *BRAF*

Todos os DNAs oriundos de tecido tumoral tanto do grupo benigno quanto do grupo maligno tiveram sua sequência analisada com intuito de verificar presença ou ausência de mutação no gene *BRAF*, tendo maior ênfase a busca da mutação V600E. Os DNAs oriundos de tecido não-tumoral também foram seqüenciados, principalmente para confirmação de não contaminação pelas amostras tumorais adjacentes no momento da coleta.

Para isso foi realizada amplificação por PCR do DNA genômico das amostras de tireóide utilizando os iniciadores BRAF_F/BRAF_R (Tabela 3) que amplificam o exon 15. O material obtido da amplificação foi seqüenciado utilizando os mesmos iniciadores e a metodologia já descrita no item “Seqüenciamento”.

Quantificação da expressão gênica de *NIS*

Extração de RNA total de tecido

Pulverizou-se 50 a 100mg de tecido congelado em nitrogênio líquido por 1 a 2 minutos no equipamento *Mikro dismembrator U* (B. Braun Biotech Internacional, Allentown, PA). Em seguida, acrescentou-se 1mL de Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) e homogeneizou-se por 10 segundos. O material foi transferido para tubo de 1,5mL e incubado por 5 minutos a 25°C. Adicionou-se 200µL de clorofórmio, agitou-se por 15 segundos e incubou-se por 15 minutos a 25°C. Centrifugou-se a 12000rpm por 15 minutos a 4°C, e a fase aquosa em suspensão foi transferida para

outro tubo de 1,5mL onde 500µL de álcool isopropílico foram adicionados. O material foi incubado a -20°C por 30 minutos, e posteriormente, centrifugado a 12000rpm por 20 minutos a 4°C. A fase líquida foi desprezada e 500µL de etanol 70% foram adicionados. Após nova centrifugação a 12000rpm por 10 minutos a 4°C, o sedimento foi seco e ressuspendido em 20µL de água. O RNA foi conservado a -70°C até sua utilização.

Quantificação do RNA total

A quantidade e a pureza do RNA extraído foi avaliada pela absorbância das amostras em espectrofotômetro (Pharmacia, Uppsala, Suécia) a 260nm e 280nm, considerando-se que amostras de RNA de boa qualidade possuem relação $DO_{260}/DO_{280} > 1,8$ e $DO_{260} = 1$ equivalente a 40ng/µL

Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada empregando-se 2µL de *random hexâmeros* (50mM), 1µL de dNTP (10mM), 1µg de RNA e água q.s.p. 13,5uL. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos. Em seguida, acrescentou-se 4µL de tampão de reação 5x *First strand*, 1µL de DTT (0,1M), 1µL de inibidor de RNase (20U/uL) e 0,5µL da enzima *Super script III RNA H* transcriptase reversa. Esta última reação foi incubada a 50°C por 60 minutos e, em seguida, a 70°C por 15 minutos. Todos os reagentes utilizados eram marca Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA.

Quantificação da expressão gênica por RT-PCR em tempo real

A quantificação do RNAm de *NIS* nos tecidos tireoideanos foi realizada por RT-PCR (PCR transcriptase reversa) quantitativo em tempo real, empregando-se o equipamento *Rotor-Gene 3000* (Corbett Research, Mortlake, Austrália), o estojo comercial *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), e iniciadores descritos na tabela 3. Quantificou-se também a expressão do gene *GAPDH* (*glyceraldeido-3-fosfato desidrogenase*), utilizado como controle interno, para normalização dos valores de expressão. As amostras foram aquecidas a 50°C e a 95°C por 2 minutos, seguidos de 45 ciclos de amplificação: 95°C por 20 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos.

Para o cálculo da expressão gênica foi empregado o método de $\Delta\Delta CT$ (*User Bulletin # 2, ABI Pism 7700 Sequence Detection System*, 1997, Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA,).

Estudo funcional da ilha2 CpG do promotor de *NIS*

No intuito de verificar se ilha2 CpG é uma região regulatória do promotor de *NIS* realizamos clonagem do fragmento contendo esta ilha em vetores com gene reporter (luciferase): pGL3basic e pGL3control (Promega Madison, WI, EUA).

Construção dos plasmídios pGL3b-NIS2isl e pGL3c-NIS2isl

Fragmento de DNA da ilha2 CpG do promotor *NIS* foi amplificado por PCR, utilizando DNA de amostra tireoideana controle e os iniciadores nconvEnhancerNIS-F-KpnI e nconvEnhancerNIS-R-XhoI (tabela 3).

O produto da reação de PCR foi tratado inicialmente com enzima *KpnI* (Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA) e posteriormente com a enzima de restrição *XhoI* (Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA), seguindo o protocolo do fabricante. Esta etapa foi fundamental para orientação correta do inserto. (Figura 24)

O fragmento foi clonado nos vetores pGL3-*basic* (pGL3b-vazio) e pGL3-control (pGL3c-vazio) (Promega Madison, WI, EUA), que possuem o gene repórter da luciferase *firefly*, tratados também com *KpnI* (Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA) e *XhoI* (Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA), segundo protocolo do fabricante (Figura 24). Concluindo assim a construção dos plasmídios pGL3b-NIS2isl e pGL3c-NIS2isl respectivamente.

O sistema de ligação foi montado para um volume final de 20µL, contendo uma proporção vetor/inserto de 1:30, 1µL de T4 DNA ligase *High concentration* (Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA) e 4µL de tampão 5X. A reação foi incubada a 16°C por 24 horas.

Posteriormente a bactéria *E. coli* JM109 foi transformada por eletroporação e a presença do inserto no DNA plasmidial nos clones recombinantes foi confirmado por PCR e seqüenciamento.

Figura 24. Representação das etapas da construção dos plasmídios pGL3basic-NIS2isl e pGL3control-NIS2isl.

Cultura de células de mamífero

Neste trabalho foram utilizadas células de mamífero HEK293 (célula renal de embrião humano). As células HEK293 foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose 1X* (DMEM 1X) (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), na presença de 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Gibco), em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

As células ($1,5 \times 10^6$) foram cultivadas em placa de 3,5cm de diâmetro em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24h antes de realizar a transfecção.

Transfecção em célula de mamífero

As células foram cotransfectadas através do método de cloreto de cálcio. Foram misturados 19,8µL de CaCl₂ (2,5M) com 2500ng do plasmídeo alvo (pGL3b-NIS2isl, pGL3b-vazio, pGL3c-NIS2isl ou pGL3c-vazio) juntamente com 50ng de pRL-CMV (plasmídeo contendo a luciferase *Renilla*) para normalizar os resultados. Os experimentos foram realizados na ausência e presença de fatores de transcrição, adicionando 800ng do plasmídeo pCDNA-PAX8 e 800ng do plasmídeo pCDNA-NKX2.1 nas cotransfecções (gentilmente cedidos pelo Dr Roberto Di Lauro, da Universidade Federico II de Nápoles, Itália). Estas soluções contendo os plasmídeos foram agitadas a 25°C por 30 segundos. Logo após, foram adicionados vagorosamente 300µL de HBS 1X [HBS 2X: 5 g de HEPES 1M (Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA), 8 g de NaCl; 1 g de dextrose; 0,37 g de KCl; 0,099 g de Na₂HPO₄.7H₂O, água q.s.p 500 mL e pH 7,2]. Incubou-se por 10 minutos a 25°C e todo o volume foi transferido para a placa 3,5cm contendo as células HEK293.

Teste para avaliação de atividade de luciferase

Após 48 horas da cotransfecção o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas com 500µl de PBS. Após a retirada da solução de lavagem foi adicionado 500µl de *passive lyses buffer* (*Dual-Luciferase Repórter Assay System* – Promega Madison, WI, EUA). As células foram lisadas com auxílio de instrumento apropriado (*Cell scraper*- TPP) e todo o volume foi transferido para tubo de microcentrífuga. O produto de lise foi

centrifugado por 30 segundos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para novo tubo de microcentrífuga.

A leitura da emissão de luz da luciferase foi realizada em luminômetro (TD-20/20 Luminometer - DRL Ready). Em tubo de microcentrífuga de 2ml foi colocado 100µl de Luciferase Assay Reagent II e 20µl do lisado celular, sem agitar e feita a leitura da luciferase *firefly*, em seguida, adicionou-se 100µl de *Stop & Glo Reagent (Dual-Luciferase Repórter Assay System –* Promega Madison, WI, EUA), homogenizou-se, e realizou-se leitura da emissão da luciferase *renilla*.

Tratamento com agente desmetilante 5-Aza-2'-deoxicitidina (5-Aza)

Para confirmar o papel da metilação na regulação da expressão do gene *NIS*, tratou-se com o agente desmetilante 5-Aza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 3 linhagens celulares tumorais: NPA de melanoma, WRO de tumor folicular primário da tireóide e FTC388 de carcinoma de tireóide folicular metastático, todas gentilmente cedidas pela Dra Janete Cerutti da Universidade Federal de São Paulo.

As células ($5,0 \times 10^5$ células) foram semeadas em placa de 3,5cm de diâmetro em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24h em meio devidamente suplementado. Após a adesão das células à placa, estas foram cultivadas por 4 dias consecutivos em meio DMEM acrescido de 15µM de 5-Aza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). O meio com a droga foram trocados diariamente. Em paralelo, células foram cultivadas acrescentando-se somente

DMSO, sem 5-Aza, como controle do experimento. Os experimentos foram realizado em triplicata.

No final do tratamento efetuou-se a extração do RNA total e DNA de cada cultura celular para analisar a expressão de *NIS* por RT-PCR em tempo real e o grau de metilação da ilha2 CpG.

Extração de RNA de cultura de células

Inicialmente retirou-se todo o meio de cultura e lavou-se as células com 1 mL de PBS (Gibco) e após retirar todo o PBS, foi adicionado 1 mL de Trizol (Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA). As células foram lisadas utilizando instrumento apropriado (*Scrapper cells*, TPP). O material foi transferido para tubo de microcentrífuga de 1,5mL e homogeneizado por 10 segundos. Após incubação por 5 minutos em temperatura ambiente, adicionou-se 266ul de clorofórmio, agitou-se por 15 segundos e incubou-se por 15 minutos em temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12.000rpm por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa em suspensão foi transferida para outro tubo de 1,5 mL onde foi adicionado 666µL de álcool isopropílico. O material foi incubado a -20°C por 10 minutos, e posteriormente, centrifugado a 12.000rpm por 15 minutos a 4°C. A fase líquida foi desprezada e foi adicionado 1ml de etanol 75%. Após nova centrifugação a 12000rpm por 10minutos a 4°C, manteve-se somente o sedimento que foi seco e ressuspendido em 20 µL de água DEPC. O RNA foi conservado a -80°C até sua utilização.

Análises estatísticas

Os valores de metilação e expressão gênica foram descritos como média $\pm$ desvio padrão ou mediana (mínimo e máximo). A comparação da expressão gênica e do grau de metilação, entre tecidos NT e T, foi realizada utilizando testes de Wilcoxon (Conover, 1980). Para comparar os grupos benigno e maligno foi utilizado o teste Mann-Whitney, e as análises considerando a presença da mutação no gene *BRAF* foram realizadas utilizando testes Kruskal-Wallis (Neter, et. al., 1996).

Os valores de metilação nos diferentes fragmentos foram comparados com testes de Friedman (Neter *et. al.*, 1996) seguidos de comparações múltiplas não paramétricas para medidas repetidas (Neter *et. al.*, 1996) quando necessárias.

Todos os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Avaliação da presença da mutação V600E no gene BRAF

Recentemente foi mostrado que amostras com a mutação V600E do gene BRAF no exon15 podem apresentar menor expressão de *NIS* (Oler & Cerutti, 2009). Sendo assim as amostras de DNAs tumorais e não tumorais adjacentes foram seqüenciadas para avaliar a presença ou ausência da mutação.

Nenhuma amostra do grupo benigno apresentou a alteração. Já no grupo maligno, esta mutação foi detectada em 45% das amostras tumorais (todas carcinoma papilífero), todas em heterozigose (Figura 25). Os tecidos tumorais dos pacientes 11, 12, 14, 16, 17, 18, 20, 24, e 27 apresentavam a mutação, sendo estas amostras denominadas BRAF+. Não foi observada nenhuma alteração do gene BRAF nas amostras não tumorais de grupo maligno.

Figura 25. Cromatograma da sequência sem alteração e da sequência alterada em heterozigose do exon 15 do gene BRAF (V600E).

Avaliação do grau de metilação da ilha1 CpG do gene *NIS*

O padrão de metilação da ilha1 CpG do gene *NIS* foi investigado utilizando inicialmente a técnica quantitativa QMSP. Diferentes ensaios foram realizados a fim de obter um resultado quantitativo da metilação de *NIS*, mas o equipamento utilizado não conseguiu captar ou detectar a fluorescência oriunda da amplificação das amostras da PCR. Aqui é necessário esclarecer que apesar do equipamento não ter captado a fluorescência, a reação de PCR funcionou, tendo sido visualizados os fragmentos amplificados após eletroforese em gel de agarose.

Procurou-se então uma nova abordagem na busca da detecção do grau de metilação de *NIS*. Para isto, optou-se por modificar a técnica de MSP, tornando-a semi-quantitativa ao invés de qualitativa.

Após padronização da técnica, as amostras de DNAs tumorais e não tumorais tratadas com bissulfito de sódio foram submetidas às reações de MSP visando amplificar cada um dos fragmentos (A1, A2, B e C) com dois conjuntos de iniciadores específicos, um para seqüências metiladas (M) e outro para não metiladas (NM). Os produtos amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 2%. As figuras 26, 27 e 28 são representativas das amplificações de cada um dos fragmentos estudados.

Figura 26. Resultado representativo da MSP-modificada do fragmento A1. P:marcador de peso molecular, c: controle interno (bATC), M: DNA metilado, NM: DNA não metilado, Eletroforese em gel de agarose 2%.

Figura 27. Resultado representativo da MSP-modificada do fragmento A2. P:marcador de peso molecular, c: controle interno (bATC), M: DNA metilado, NM: DNA não metilado, Eletroforese em gel de agarose 2%.

Figura 28: Resultado representativo da MSP-modificada do fragmento C. P:marcador de peso molecular, c: controle interno (bATC), M: DNA metilado, NM: DNA não metilado, Eletroforese em gel de agarose 2%.

A análise dos resultados foi realizada de duas maneiras:

1) MSP: abordagem qualitativa para determinar a presença ou ausência de produto amplificado após eletroforese.

2) MSP-semi-quantitativa, dosimetria das bandas amplificadas com o programa *Molecular Analytic Software*, normalizando os valores de amplificação com o controle interno *bACT*.

1- Método MSP

A análise dos resultados obtidos pela técnica MSP seguem abaixo e estão resumidos na tabela 8.

Fragmento A1: no grupo benigno detectou-se metilação em 100% dos tecidos não tumorais (10/10) e em 90% dos tecidos tumorais (9/10). No grupo maligno, detectou-se metilação em 95% (19/20) de ambos os tecidos não tumorais e tumorais.

Fragmento A2: tanto no grupo benigno quanto no grupo maligno, observou-se metilação em 90% (9/10, 18/20 respectivamente) de ambos os tecidos não tumorais e tumorais.

Fragmento B: no grupo benigno, observou-se metilação em 70% (7/10) dos tecidos não tumorais e em 80% (8/10) dos tecidos tumorais. No grupo maligno, verificou-se metilação em 75% (15/20) dos tecidos não tumorais e em 55% (11/20) dos tecidos tumorais.

Fragmento C: no grupo benigno, observou-se metilação em somente 50% (5/10) dos tecidos não tumorais e 40% (4/10) dos tumorais. Já no grupo maligno, verificou-se metilação em 20% (4/20) dos tecidos não tumorais

e em apenas 10% (2/20) dos tecidos tumorais. A metilação deste fragmento foi muito escassa, sendo ausente nos tecidos tumoral e não tumoral adjacente em 60% das amostras analisadas.

Tabela 8: Análise das freqüências de amostras metiladas na ilha1CpG do promotor de *NIS* nos grupos benignos e malignos

Fragmento		Grupo						P
do gene	Metilação	Benignos		Malignos		Total		
NIS		n	%	n	%	N	%	
A1 NT	Sim	10	100	19	95	29	96,7	0,24
	Não	0	0	1	5	1	3,3	
A1 T	Sim	9	90	19	95	28	93,3	
	Não	1	10	1	5	2	6,7	
A2 NT	Sim	9	90	18	90	27	90	0,37
	Não	1	10	2	10	3	10	
A2 T	Sim	9	90	18	90	27	90	
	Não	1	10	2	10	3	10	
B NT	Sim	7	70	15	75	22	73,3	0,27
	Não	3	30	5	25	8	26,7	
B T	Sim	8	80	11	55	19	63,3	
	Não	2	20	9	45	11	36,7	
C NT	Sim	5	50	4	20	9	30	0,5
	Não	5	50	16	80	21	70	
C T	Sim	4	40	2	10	6	20	
	Não	6	60	18	90	24	80	

NT: não tumoral, T: Tumoral

2- Método MSP-semi-quantitativo

Os resultados do grau de metilação da ilha1 CpG estão descritos na tabela 8.

Tabela 8: Grau de metilação na ilha1 CpG do promotor de *NIS* (UA)

Fragmentos da Ilha 1 do promotor de <i>NIS</i>								
Pac	A1		A2		B		C	
	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T
GRUPO BENIGNO								
1	0,971	0,902	0,962	0,720	0,000	0,000	0,000	0,000
2	1,081	1,077	1,036	0,000	0,336	0,424	0,421	0,541
3	0,873	0,000	0,725	0,771	0,627	0,614	0,627	0,000
4	0,930	0,914	0,941	0,915	0,442	0,439	0,813	0,953
5	1,113	1,025	0,504	0,695	0,529	0,322	0,288	0,000
6	1,154	1,166	0,619	0,757	0,000	0,367	0,000	0,000
7	1,320	1,199	0,322	0,600	0,000	0,481	0,000	0,000
8	1,259	1,363	0,733	0,341	0,408	0,000	0,000	0,788
9	1,395	1,340	0,000	0,805	0,406	0,355	0,000	0,000
10	0,242	0,366	0,579	0,758	0,404	0,475	0,257	0,474
GRUPO MALIGNO								
11	0,811	0,769	0,707	0,853	0,338	0,000	0,000	0,000
12	1,199	1,003	1,194	1,193	0,455	0,500	0,000	0,000
13	0,738	0,868	0,854	0,232	0,000	0,000	0,000	0,000
14	1,135	0,000	1,215	0,000	1,034	0,549	0,000	0,494
15	0,745	1,662	0,715	1,115	0,398	0,000	0,000	0,000
16	0,846	0,685	0,773	0,767	0,372	0,341	0,000	0,000
17	0,931	1,019	1,072	0,000	0,568	0,509	0,000	0,000
18	1,139	1,268	0,000	0,299	0,000	0,000	0,000	0,000
19	1,259	1,286	0,356	0,381	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,892	0,910	0,940	1,048	0,000	0,482	0,000	0,000
21	0,769	0,735	0,933	0,967	0,452	0,000	0,000	0,000
22	1,213	0,669	0,582	0,565	0,553	0,000	0,466	0,000
23	0,804	0,699	0,554	0,398	0,000	1,044	0,000	0,000
24	0,724	0,732	0,450	0,422	0,886	0,831	0,000	0,000
25	0,780	0,680	0,763	0,320	0,847	0,693	0,669	0,000
26	0,622	0,654	0,611	0,617	0,656	0,827	0,640	0,000
27	0,870	0,865	1,870	0,980	1,058	0,905	0,000	0,000
28	0,937	0,747	0,709	0,785	0,975	0,747	0,627	0,800
29	1,400	1,393	0,000	0,869	0,330	0,000	0,000	0,000
30	0,000	0,659	0,000	0,611	0,586	0,000	0,000	0,000
Amostra hipercaptante								
31	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Pac. paciente

Importante observar que independentemente do grupo (benigno ou maligno) ou do tipo de tecido (tumoral ou não tumoral) foi detectada alta frequência e alto grau de metilação na ilha1 CpG. Com exceção do fragmento C, correspondente a região traduzida do gene, que mostrou-se pouco metilada.

Análise por grupo

O grau de metilação dos fragmentos A1, A2, B e C do gene *NIS* das amostras tumorais e não tumorais, em ambos os grupos (benigno e maligno) foram similares. (figura 29)

Por outro lado, em ambos os grupos foi observado que o grau de metilação do fragmento A1 foi maior que o A2, que por sua vez foi maior que o B, que foi maior que o C (metilação $A1 > A2 > B > C$); tanto nas amostras não tumorais (benigno $p=0,001$; maligno $p<0,001$) quanto nas amostras tumorais (benigno $p=0,037$; maligno $p<0,001$). (figura 29)

Figura 29. Grau de metilação (media±desvio padrão) dos fragmentos da ilha1 CpG sendo A1>A2>B>C nos tecidos não tumorais (NT) e tumorais (T) do grupo benigno ($p=0,001$ e $p=0,037$ respectivamente) e do grupo maligno ($p<0,001$ em ambos).

Quando analisado o grau de metilação total da ilha1 CpG (A1+A2+B+C) observou-se valores similares entre as amostras não tumorais e tumorais, tanto do grupo benigno ($p=0,7$) quanto do grupo maligno ($p=0,2$). (Figura 30).

Figura30. Grau de metilação (media±desvio padrão) da ilha1 CpG (A1+A2+B+C) nos tecidos não tumorais (NT) e tumorais (T) dos grupos benigno e maligno

Novas análises foram feitas retirando as amostras (tumoral e não-tumoral) dos pacientes portadores da mutação V600E do gene *BRAF*. Foi observado o mesmo padrão de metilação anterior.

Análise das amostras pareadas (Tumor Vs Não tumor adjacente)

Quando foi analisado o grau de metilação total da ilha1 CpG de cada amostra individualmente, observou-se que todas elas (tumoriais e não tumoriais do grupo benigno e maligno) estavam metiladas. (Figura 31)

Figura 31. Grau de metilação da ilha1 CpG das amostras tumorais e não tumorais adjacentes de pacientes do grupo benigno e maligno

Quando foi comparado o grau de metilação total de cada par de amostras individualmente (tumor Vs não tumor adjacente), observou-se que 60% dos pacientes do grupo benigno apresentaram maior grau de metilação no tecido tumoral em relação ao seu tecido não tumoral adjacente, enquanto que no grupo maligno, 35% dos pacientes apresentavam este mesmo padrão. Quando retiramos das análises do grupo maligno os pacientes BRAF+, apesar de não haver significância estatística verificou-se que 45,5%

dos pacientes apresentavam maior nível de metilação no tecido tumoral em comparação ao seu tecido não tumoral, e nas amostras BRAF+ somente 22% apresentavam este padrão. (Figura 32).

Figura 32. Porcentagem de pacientes com a ilhaCpG 1 mais metilada no tecido tumoral em relação ao tecido não tumoral adjacente.

Avaliação da metilação do nódulo hipercaptante

As amostras de tecido tumoral e não tumoral do paciente 31, portador de tumor maligno hipercaptante (quente) não apresentou qualquer sinal de metilação em nenhum dos três fragmentos estudados. Mostrando-se até o momento estar 100% desmetilada na ilha CpG1 do promotor de NIS. (tabela 8)

Correlação dos valores de expressão de *NIS* (RNAm) e o grau de metilação da ilha1 CpG

Não foi possível detectar correlação entre os valores da expressão gênica e os níveis de metilação total nas amostras não tumorais (figura 33) e tumorais (figura 34) de ambos os grupos.

Figura 33. Correlação entre os valores de RNAm do gene *NIS* e o grau de metilação total da ilha1 CpG nas amostras não tumorais do grupo benigno e maligno ($p>0,05$).

Figura 34. Correlação entre os valores de RNAm do gene *NIS* e o grau de metilação total da ilha1 CpG nas amostras tumorais do grupo benigno e maligno ($p>0,05$).

Identificação *in silico* de ilhas CpG no promotor do gene *NIS*

Como os resultados de avaliação da metilação da ilha1 CPG do promotor de *NIS* não explicavam a diferença de expressão do RNAm de *NIS* entre tumores e não tumores nas amostras; foi feita análise *in silico* na tentativa de identificar outras ilhas CpGs neste promotor .

A análise computacional da região promotora de *NIS* (-4500pb até +500pb em relação sítio de início da tradução) identificou inicialmente duas sequências como potenciais ilhas CpG, com tamanho de 712pb e 1.133pb, respectivamente. A primeira ilha CpG corresponde à ilha1 CpG já descrita por Venkataraman (1999) e alvo inicial deste estudo, localizada entre as posições -343 a +368 em relação ao sítio ATG, contendo 57 sítios CpG (figura 35).

Análise mais profundo da segunda potencial ilha CpG (de 1.133bp) identificou várias sequências repetitivas de diferentes classes, como Alu, SINE, LINE e repetição simples que não podem ser consideradas como parte de uma ilha CpG. Deste modo, o tamanho da ilha foi reduzido para 256pb (figura 36). Sendo assim, confirmou-se a existência de uma nova segunda ilha CpG funcional, denominada ilha2 CpG na região promotora do gene *NIS* (Figura 35), localizada entre as posições -2152 e -1887 (em relação ao sítio ATG), contendo 14 sítios CpG.

Figura 35. Ilhas CpG do promotor do gene *NIS* identificadas através de estudo *in silico*. Os números são as posições dos nucleotídeos, em referência ao sítio de início da tradução ATG. Em cinza: sequência submetida a análise computacional. Em vermelho: a nova ilha CpG identificada (ilha2 CpG) e, em azul: a ilha CpG alvo inicial deste estudo (ilha1 CpG).

Figura 36. Análise computacional da potencial nova ilha CpG do promotor do gene *NIS*.

- Nova Ilha CpG (Ilha 2 CpG) identificada neste estudo.
- sítios CpG
- Sequência de tamanho insuficiente para se caracterizar uma ilha CpG
- Repetição simples, SINE/ALU 1, Sine/ALU2, LINE/L2

Avaliação da metilação da ilha2 CpG do gene *NIS*

Para análise da metilação desta nova ilha foi utilizada a técnica bissulfito sequenciamento. Verificou-se que a ilha2 CpG também era alvo de metilação.

O grau de metilação nos tecidos tumorais foi significativamente mais elevado que nos tecidos não tumorais, dos grupos benigno ($p=0,008$) e maligno ($p<0,001$) (figura 37). Nas amostras tumorais 66,07% dos dinucleotídeos CpG estavam metilados (benignos 64,29%, malignos 69,64%), enquanto que somente 23,21% nos tecidos não-tumorais (benignos 20,54%; malignos 25,13%). Quando considerada a presença da mutação no gene BRAF nas amostras de tumores malignos, observou-se que o grau de metilação nas amostras BRAF+ foi 60% e nas BRAF- foi 73,21% ($p>0,05$). Nos tecidos não tumorais adjacentes aos tumores BRAF+ o grau de metilação foi de 25,93%, enquanto que o grau dos não tumorais adjacente aos tumores BRAF- foi de 24,32%. (figura 38)

Figura 37. Análise da metilação da ilha2 CpG em amostras tireoideanas tumorais e não tumorais; dos grupos benigno e maligno.

1 a 14:- sítio CpG, sítio metilado, sítio não metilado, sítio não avaliado.

Figura 38. Porcentagem de sítios CpGs metilados na ilha2 do gene *NIS*, nos tecidos não tumorais (NT) e tumorais (T) dos grupos benigno, maligno, maligno (BRAF+) e maligno (BRAF-). * $p < 0,005$ entre NT e T

Quando foi analisado o grau de metilação de cada um dos 14 sítios CpG separadamente, foi observado que cada sítio apresentava maior grau de metilação na amostra tumoral em relação a amostra não tumoral em ambos os grupos (benigno e maligno). (Figura 39)

Figura 39. Grau de metilação de cada sítio da ilha2 CpG, nos tecidos não tumorais (NT) e tumorais (T) dos grupos benigno e maligno.

Posteriormente foi realizada a análise por paciente. Verificou-se maior metilação no tecido tumoral em relação ao não tumoral em 100% (9/9) dos pacientes do grupo benigno, e em 95% (19/20) dos pacientes do grupo maligno. Somente o paciente 21 apresentou metilação similar entre os tecidos não tumoral e tumoral. As amostras do paciente com tumor hipercaptante apresentaram grau de metilação similar entre os tecidos tumoral e não tumoral adjacente (33%) e semelhante aos dos não tumorais dos grupos benigno e maligno (23,21%). (tabela 9)

Tabela 9. Porcentagem de metilação da ilha2 CpG nos diferentes tecidos de cada paciente.

Paciente	Não tumoral	Tumoral
GRUPO BENIGNO		
1	20,54	52,68
2	29,46	68,75
3	39,29	81,25
4	17,86	54,46
5	14,29	75,89
6	46,43	66,07
7	15,18	64,29
8	NF	NF
9	23,21	62,50
10	19,82	55,86
GRUPO MALIGNO		
11	21,43	59,82
12	25,93	71,82
13	23,21	49,11
14	19,64	50,89
15	14,68	77,68
16	38,39	60,00
17	16,07	71,43
18	28,83	73,21
19	13,39	64,29
20	32,14	76,79
21	55,36	54,46
22	51,38	83,04
23	35,71	73,21
24	41,96	50,89
25	19,64	75,89
26	56,25	83,04
27	5,45	25,23
28	15,18	61,61
29	24,32	67,86
30	32,71	81,25
Amostra hipercaptante		
31	33,04	32,14

NT: não tumoral, T: Tumoral, NF: não feito

Correlação dos valores de expressão do RNAm de *NIS* e o grau de metilação da ilha2 CpG

Observou-se correlação significativa e inversa entre os valores de expressão de RNAm de *NIS* e o grau de metilação das amostras não tumorais ($r = -0,500$ e $p = 0,006$) (figura 40) e tumorais ($r = -0,594$ e $p = 0,001$) (figura 41) de ambos os grupos, benigno e maligno. Verificando-se assim que quanto maior o grau de metilação da ilha2 CpG menor a expressão do gene *NIS*.

Figura 40. Correlação inversa entre os valores de RNAm do gene *NIS* e o grau de metilação da ilha2 CpG, nas amostras não tumorais do grupo benigno e maligno. ($r = -0,500$ e $p = 0,006$)

Figura 41. Correlação inversa entre os valores de RNAm do gene *NIS* e o grau de metilação da ilha2 CpG, nas amostras tumorais do grupo benigno e maligno. ($r = -0,594$ e $p = 0,001$)

Estudo funcional da ilha2 CpG do promotor de *NIS*

Na expectativa de verificar se a região correspondente a ilha2 CpG era uma região regulatória do promotor de *NIS*, clonou-se o fragmento contendo esta ilha em vetores com gene repórter (luciferase).

Inicialmente foi avaliado se esta região apresentava atividade promotora. Para tanto a ilha2 CpG foi clonada na região 5' do gene da luciferase do plasmídio pGL3basic pois não possui promotor. Não se observou diferença de expressão do gene luciferase nas células transfectadas com o plasmídio pGL3b-NIS2isl ($0,004 \pm 0,0$) e com o pGL3b-vazio ($0,007 \pm 0,007$) indicando que a sequência da ilha2 CpG não promove a expressão do gene reporter.

Em uma segunda etapa foi avaliado se a região da ilha2 CpG regulava a atividade de um promotor. A ilha 2 CpG foi clonada na região 5' do cassete de expressão do plasmídio pGL3control formado por um promotor e gene da luciferase, Considerando que o promotor do gene *NIS* é regulado por fatores de transcrição TTF1 e PAX8, plasmídios contendo estes genes foram cotransfectados com o plasmídio pGL3c-NIS2isl ou pGL3c-vazio. Observou-se que a expressão da luciferase foi significativamente maior nas células transfectadas com pGL3c-NIS2isl + fatores de transcrição (TTF1 e PAX8), do que nas outras (figura 42). Indicando assim, que a ilha2 CpG de *NIS* tem atividade regulatória; podendo ser considerada um aumentador ("enhancer").

Figura 42. Expressão da luciferase em diferentes plasmídios para avaliação da atividade regulatória da Ilha2 CpG de *NIS* (* $p < 0,005$ comparado aos outros três grupos)

Tratamento com agente desmetilante 5-Aza-2'-deoxicitidina (5-Aza)

Para confirmar o papel da metilação na regulação da expressão do gene *NIS*, as linhagens WRO, NPA e FTC328 foram tratadas com o agente desmetilante 5-Aza (15uM) e avaliada a expressão do RNAm de *NIS* antes e após o tratamento.

A expressão do RNAm de *NIS* foi maior nas células FTC tratadas com 5Aza (1957,488UA) do que nas não tratadas (18,669UA) ($p < 0.05$), sugerindo que o gene *NIS* foi desmetilado após este tratamento (tabela 10). Não se observou alteração da expressão de *NIS* após o tratamento nos outros tipos celulares.

Para confirmar que a ilha2 CpG foi alvo de desmetilação, avaliou-se o grau de metilação dessa ilha nas culturas tratadas e não tratadas com 5aza. Verificou-se que o grau de metilação da ilha2 CpG nas células FTC 328 tratadas era aproximadamente 56% menor que nas células não

tratadas, confirmando que a desmetilação desta ilha2 CpG do gene *NIS* promove o aumento da expressão do seu mRNA. Por outro lado, o grau de metilação do DNA das células NPA foi similar antes e após o tratamento, concordando com os valores de expressão de NIS obtidos (tabela 10).

Tabela 10: Valores de expressão de mRNA de NIS (UA) e do grau de metilação (%) da ilh2 CpG em culturas tratadas e não tratadas com o agente desmetilante 5-AZA

	<u>Expressão (UA)</u>		<u>Metilação (%)</u>	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
FTC 328	18,670	1957,488	30	13
NPA	4,117	3,815	43	43

DISCUSSÃO

Diferentes estudos sobre expressão do gene *NIS* mostraram que em tumores tireoideanos há menor expressão do RNAm de *NIS*, quando comparado com o tecido não tumoral. (Smanik *et al.*, 1996; Smanik *et al.*, 1997; Arturi *et al.*, 1998; Lazar, 1999). Nosso grupo, em estudo anterior (Sodré *et al.*, 2008), obteve resultados similares quando analisou amostras tireoideanas pareadas (tumoral e não tumoral) de pacientes com carcinoma diferenciado de tireóide. Dando continuidade a este estudo, buscamos investigar se a diminuição da expressão de *NIS* estaria associada com a metilação do promotor deste gene nesses tecidos. Sendo assim, o presente estudo visou investigar o padrão de metilação do gene *NIS* e correlacionar os valores de metilação com seus níveis de RNA mensageiro nas amostras tumorais e não tumorais adjacentes de pacientes com tumores tireoideanos benignos e malignos. Além disso, procurou-se identificar novas sequências regulatórias que pudessem também ser alvo de metilação e modular a expressão gênica de *NIS*.

Em 1999 Venkataraman *et al.*, estudaram o grau de metilação da ilha1 CpG do gene *NIS* em diferentes tumores tireoideanos, sugeriram que a perda de captação do iodo poderia estar associada à perda do transcrito devido a hipermetilação do promotor de *NIS*. No entanto, não conseguiram definir um padrão de metilação de *NIS* no câncer diferenciado de tireóide.

Assim, no presente projeto foi proposto inicialmente avaliar a mesma ilha1 CpG, incluindo um novo fragmento para análise (A2), através de uma técnica quantitativa, a QMSP, ao invés de uma metodologia qualitativa, a MSP, utilizada nos trabalhos anteriores (Venkataraman *et al.*, 1999, Neuman *et al.*, 2004). A escolha dessa nova metodologia se deu devido à diferença de sensibilidade entre as técnicas, uma vez que a QMSP é 10 vezes mais sensível que a MSP (sensibilidade de 1:10.000 e 1:1.000, respectivamente) (Herman *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 2004). Deste modo, iniciamos o estudo utilizando a QMSP com o corante *Syber green* fluorescente (QMSP-modificada). Após diferentes ensaios, observamos que o equipamento utilizado não conseguia captar ou detectar a fluorescência oriunda da amplificação das amostras da PCR, impossibilitando a avaliação. Uma explicação para estes resultados poderia ser a menor especificidade do *Syber green* para corar o DNA bissulfito tratado ou a possível interferência do excesso de sal presente na amostra de DNA após tratamento com bissulfito de sódio. É necessário enfatizar que poucos estudos foram feitos empregando esta metodologia (Chan *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2007).

Adotou-se então uma nova técnica para detectar o grau de metilação de *NIS*. Para isto, modificamos a técnica de MSP com intuito de torná-la semi-quantitativa ao invés de qualitativa. Assim, incluímos a amplificação de um gene controle interno (*bACT*).

As análises da ilha1 CpG confirmaram que esta região do promotor de *NIS* é alvo de metilação. Observou-se que todas as amostras (tumoriais e não tumorais) de pacientes portadores de tumores (benigno ou maligno)

apresentaram algum grau de metilação nesta região. Apesar disso, não foi possível detectar um padrão de metilação nos diferentes tipos de amostras estudadas. Estes achados são concordantes com os resultados obtidos por Venkataraman *et al.* (1999) e por Neuman *et al.* (2004) que também não conseguiram definir o padrão de metilação do gene *NIS*, embora tenham detectado que 50% dos nódulos benignos tireoideano (frios), com reduzidos níveis de expressão do RNAm de *NIS*, apresentavam os promotores hipermetilados.

Quando analisamos a frequência de metilação nas diferentes regiões da ilha 1 (A1, A2, B e C, Tabela 8) observamos maior número de amostras metiladas no fragmento A1 (90 - 100%), em relação a fragmento A2 (90%), em relação ao fragmento B (55 - 80%). Por outro lado uma menor quantidade de amostras apresentou metilação no fragmento C (10-50%). Estes resultados foram observados tanto no grupo benigno como maligno. Diferente de Smith *et al.* (2007) que verificaram que o fragmento B apresentava-se desmetilado em todas as amostras de pacientes com tumor benigno (0/27) e metilado em 22% (7/32) das amostras de pacientes com tumor maligno. Estes resultados contraditórios podem ser consequência da técnica (MSP) utilizada por Smith *et al.* (2007) para a análise de metilação. Nossa experiência mostrou haver grande probabilidade de falha da amplificação durante a realização da MSP, originada pela baixa qualidade do DNA bissulfito convertido ou pela presença de grande quantidade de sal na amostra. No presente estudo todas as amostras que apresentaram metilação negativa foram reavaliadas para confirmação do resultado, além

de utilizarmos um controle positivo (100% metilado) e a amplificação do controle interno *bACT* em todos os ensaios realizados. Por outro lado, o número de amostras metiladas em cada fragmento (excluindo o fragmento A2, incluído neste estudo) foi similar aos obtidos por Venkataram *et al.* (1999) e Neumann *et al.* (2004).

Quando analisamos o grau de metilação das diferentes regiões (A1, A2, B e C, figura 29) observamos um decaimento significativo do grau de metilação ao longo da ilha1 CpG. Sendo a região A1 mais metilada que A2, que por sua vez estava mais metilada que B; e a região C com o menor grau de metilação. Esta diferença do grau de metilação pode estar relacionada com a posição dos sítios CpG na sequência do gene; uma vez que A1 e A2 encontram-se na região promotora, B faz parte da região 5'UTR do gene (transcrita) e C pertence ao primeiro exon do gene (traduzida).

Quando o par de amostras de cada paciente foi analisado separadamente observou-se maior grau de metilação no tecido tumoral em relação ao não tumoral adjacente (T>NT) em 60% do grupo benigno e em 35% do grupo maligno. Uma vez que já foi demonstrado que amostras de tecidos tumorais de tireóide portadoras da mutação V600E no gene *BRAF* (Kimura *et al.*, 2003) apresentam menor expressão de *NIS* (Oler & Cerutti, 2009); refez-se as análises do grupo maligno considerando a presença (*BRAF*+) ou ausência (*BRAF*-) da mutação. Verificou-se que 45,5% do grupo maligno *BRAF*- apresentavam maior nível de metilação no tecido tumoral em comparação ao seu tecido não tumoral, e nas amostras *BRAF*+ somente 22%. É importante notar que o padrão de metilação T>NT no grupo maligno

BRAF- aproximou-se da frequência observada no grupo benigno (60%) e à observada nas amostras, todas benignas, estudadas por Neuman *et al.* (2004) (50%). Apesar de não haver detectado diferença significativa entre os grupos, não podemos descartar uma possível influência da mutação de BRAF na metilação, neste caso sugerindo que na presença da mutação o controle da expressão gênica por metilação pode estar diminuída. Resultado similar foi mostrado no estudo de Xing *et al.*, 2004, onde verificaram que a metilação do gene supressor de tumor *RASSF1A* estava aumentada nas amostras sem a mutação de *BRAF*. Todavia, o mesmo grupo identificou maior metilação de promotores de genes silenciados no carcinoma papilífero da tireóide em amostras com a mutação em *BRAF* (Hu *et al.*, 2006).

Deste modo, este estudo assim como outros (Neuman *et al.*, 2004) não identificou associação significativa entre o grau de metilação da ilha1 CpG de *NIS* e sua expressão gênica.

No entanto, não descartamos o possível envolvimento da metilação na regulação gênica de *NIS*, uma vez que foi observado hipometilação nas amostras (tumoral e não tumoral) do paciente com tumor hipercaptante. Sendo assim, foi levantada a hipótese do envolvimento de outros dinucleotídeos CpG da região 5' do gene *NIS* ainda não estudados na sua regulação gênica.

Diversos programas de bioinformática podem ser utilizados para identificar ilhas CpG. Contudo, esta tarefa pode ser prejudicada dependendo dos critérios adotados (Hutter *et al.*, 2009). Assim, realizamos nova análise *in silico* utilizando ferramentas mais modernas que as utilizadas em estudo

anterior (Venkataraman *et al.*, 1999). Esses autores foram os primeiros e únicos até o momento a realizarem a identificação de ilhas CpG neste promotor, analisando somente a sequência compreendida entre -1600 e +400 bases em relação ao sítio ATG. Assim, nosso trabalho estendeu a região analisada para a sequência compreendida entre as posições -4500pb e +500pb em relação ao ATG. Este novo rastreamento permitiu a identificação de duas ilhas CpG funcionais. A primeira correspondente à ilha1 CpG já descrita por Venkataraman *et al.* (1999) e alvo inicial deste estudo; e a segunda, ainda não descrita na literatura, aqui denominada ilha2 CpG, com 256pb, localizada entre as posições -2152 e -1887 (em relação ao sítio ATG), contendo 14 sítios CpG.

Foi iniciada então a avaliação da metilação da ilha2 CpG por bissulfito-sequenciamento. Esta técnica foi escolhida por possibilitar a identificação do status da metilação de todos os sítios CpG individualmente, permitindo um mapeamento mais fidedigno da metilação da sequência de DNA (Frommer *et al.*, 1992).

As análises da ilha2 CpG indicaram que essa região também é alvo de metilação, assim como a ilha1 CpG. Foi possível verificar nesta nova ilha uma hipermetilação nos tecidos tumorais quando comparados aos tecidos não tumorais, em 100% das amostras do grupo benigno e 95% das do grupo maligno. Assim pela primeira vez, foi detectado um padrão de metilação do gene *NIS* em tecidos tireoideanos: metilação ilha 2 CpG T>NT.

Além disso, foi possível verificar, também pela primeira vez, uma significativa correlação inversa entre o grau de metilação da ilha2 CpG e a

concentração de RNAm de *NIS* em todas as amostras. Ou seja, quanto maior o grau de metilação da ilha2 CpG menor expressão do gene *NIS* (metilação ilha2 CpG T>NT $\Rightarrow$ RNAm de *NIS* T<NT). A análise conjunta destes resultados sugere que a alteração do padrão de metilação nos tecidos tumorais pode ser um evento inicial no processo de tumorigênese.

Decidiu-se então realizar a caracterização funcional da ilha2 CpG. Estudos *in vitro* mostraram que esta ilha não tem atividade promotora. Este resultado poderia ser explicado por sua localização (--2152 e -1887, em relação ao sítio ATG). Mas, os estudos mostraram que esta ilha pode ser uma sequência regulatória (*enhancer*) do gene *NIS*, já que modula a expressão do gene repórter em cultura de células. Diversos trabalhos mostraram a relevância da metilação de *enhancers* na regulação da expressão gênica (Shore *et al.*, 2010, Wiench *et al.* 2011). Além disso, o gene *Nis* de rato também apresenta um enhancer (NUE), localizado entre as posições -2264 e -2495, que confere aspectos relevantes à regulação da expressão de *Nis*, como a ligação de PAX-8 e de fatores que se ligam a sítios CRE (Ohno *et al.*, 1999).

Posteriormente foi investigado se esta nova ilha2 CpG poderia ser alvo de agentes desmetilantes, com intuito de uma futura terapia epigenética. O tratamento com o desmetilante 5-aza confirmou o envolvimento da metilação desta ilha na regulação da expressão do gene *NIS*, em linhagem de carcinoma folicular de tireóide (FTC 328); uma vez que foi possível detectar a reexpressão do RNAm de *NIS* paralelamente à redução do grau de metilação da ilha2 CpG após o tratamento.

Este resultado não foi observado em outras linhagens. O tempo do tratamento ou o tipo de agente desmetilante poderiam ser a causa deste resultado. Mesmo assim, na célula NPA foi possível confirmar a relação entre o grau de metilação da ilha 2 CpG e os níveis de RNA de *NIS*.

Estudos anteriores atribuíram o restauro da expressão de *NIS* e o aumento da captação de iodo radioativo somente à desmetilação da região 3' da ilha1 CpG (Venkataraman *et al.*, 1999). No entanto, até o momento nenhum estudo mostrou correlação significativa entre o grau de metilação da ilha1 CpG e a expressão gênica de *NIS*. Deste modo, com a identificação de uma nova região regulatória *enhancer* do gene *NIS* (ilha2 CpG), modulada epigeneticamente por metilação do DNA, sugerimos que a desmetilação deste *enhancer* pode estar envolvido na sua reexpressão gênica, sendo a desmetilação da ilha1 CpG um “aditivo” nesse processo.

Finalizando, podemos afirmar que eventos epigenéticos estão envolvidos na expressão do gene *NIS*, e que esta nova ilha2 CpG pode ser um novo alvo de terapia epigenética, com drogas alvo-moleculares desmetilantes, para o tratamento do câncer de tireóide.

Conclusões

1- Este estudo identificou por primeira vez a existência de uma segunda ilha CpG (ilha2 CpG) funcional na região 5' do gene *NIS*, com atividade de enhancer, que regularia a expressão do gene por metilação do DNA.

2- Identificou-se, por primeira vez, a existência de um padrão de metilação no gene *NIS* em tecido tireoideanos, sendo a nova ilha2 CpG do tecido tumoral (benigno ou maligno) mais metilada que a do tecido não tumoral adjacente.

3- Identificou-se, pela primeira vez, correlação inversa entre o grau de metilação da ilha2 CpG e a expressão de RNAm de *NIS*; resultado que pode explicar a reduzida expressão do *NIS* observada em amostras tumorais.

REFERÊNCIAS

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Fundamentos da Biologia Celular: uma introdução à biologia molecular da célula. 1ª edição; Ed. Artmed. Porto Alegre, 1999.

Alvarez-Núñez F, Bussaglia E, Mauricio D, Ybarra J, Vilar M, Lerma E, Leiva A de, Matias-Guiu X. PTEN Promoter Methylation in Sporadic Thyroid Carcinomas. *Thyroid*. 2006; 16(1): 17-23.

Arenas-Huertero, F.; Recillas-Targa, F. Modificaciones epigenéticas de la cromatina en la generación de cáncer. *Gac Méd Méx*. 2002; 138 (6): 547-555.

Arturi F, Russo D, Schlumberger M, Du Villard JA, Caillou B, Vigneri P, Wicker R, Chieffari E, Suarez HG, Filetti S. Iodide symporter gene expression in human thyroid tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1998; 83: 2493-2496.

Baumann E. Über den jodgehalt der schilddrüsen von menschen und tierem. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem*. 1896; 22: 1-17.

Baylin S. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*. 2005; 2: S4-S11.

Behr M, Schmitt T, Espinoza C, Loos U. Cloning of a functional promoter of the human sodium/iodide-symporter gene. *Biochem J*. 1998; 331:359-363.

Bird AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res*. 1980; 8(7):1499-504.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002; 16: 6-21.

Bizhanova A & Kopp P. Minireview: The sodium-iodine symporter *NIS* and pendrin in iodine homeostasis of the thyroid. *Endocrinology*. 2009; 150(3): 1084-1090.

Caillou B, Troalen F, Baudin E, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M, Bidart JM. Na⁺/I⁻ symporter distribution in human thyroid tissues: an immunohistochemical study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; 83: 4102-4106.

Dahl C, Guldberg P. DNA methylation analysis techniques. *Biogerontology.* 2003; 4:233-250

Dai, G., Levy, O. and Carrasco, N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature.* 1996; 379, 458-460.

De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of NADPH oxidase family. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:23337-23233.

De La Vieja A, Ginter C, Carrasco N. Molecular analysis of a congenital hióide transport defect: G543E impairs maturation and trafficking of the Na⁺/I⁻ symporter. *Molecular endocrinólogo.* 2005; 19 (11):2847-2858.

De Robertis E, Hib J. Bases da Biologia Celular e Molecular. 3ª edição; Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2001.

Di Cosmo C, Liao XH, Dumitrescu AM, Philp NJ, Weiss RE, Refetoff S. Mice deficient in MCT8 reveal a mechanism regulating thyroid hormone secretion. *J Clin Invest.* 2010;120(9):3377-88.

Dohán O, De La Vieja A, Carrasco N. Molecular study of the sodium-iodide symporter (NIS): a new field in thyroidology. *Trends Endocrinol. Metab.* 2000; 11: 99-105.

Dohán O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr. Rev.* 2003; 24:48-77.

Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, et al. BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 927:2840-3.

Eads C, Danenberg K, Kawakami K, Saltz L, Blake C, Shibata D, Danenberg P, Laird P. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 2000; 15;28(8):E32.

Elisei R, Vivaldi A, Pacini F. Biology and clinical application of the *NIS* gene. *Tumori.* 2003; 89(5): 523-528.

EpiTect Bissulfite Kit - QIAgen, 2006. (www1.qiagen.com/Products/Epigenetics/Epitect/EpitectBisulfiteKit.aspx?ShowInfo=1) acessado em :27/10/2006 às 12:30.

Eskandari S, Loo DD, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N. Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 27230–27238.

Esteller M. CpG islands hipermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene.* 2002; 21: 5427-5440.

Esteller, M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Oncology.* 2003; 4:351-358.

Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008; 358:1148-59.

Filetti S, Bidart JM, Arturi F, Caillou B, Russo D, Schlumberger M. Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism. *Eur. J. Endocrinol.* 1999; 141:443-57.

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL and Paul CL. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992, 89:1827–1831

Gnidehou S, Caillou B, Talbot M, Ohayon R, Kaniewski J, Noël-Hudson MS, Morand S, Agnangji D, Sezan A, Courtin F, Virion A, Dupuy C. Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site. *FASEB J.* 2004; 18(13):1574-1576.

Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature.* 1997; 389: 349-352.

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Medical Sciences*. 1996; 93: 9821-9826.

Hu S, Liu D, Tufano RP, Carson KA, Rosenbaum E, Cohen Y, Holt EH, Kiseljick-Vassiliades K, Rhoden KJ, Tolaney S, Condouris S, Tallini G, Westra WH, Umbricht CB, Zeiger MA, Califano JA, 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*. 2006; 119(10):2322-9.

Hutter B, Paulsen M, Helms V. Identifying CpG Islands by different computational techniques. *OMICS*. 2009; 13(2):153-164.

Jerónimo C, Usadel H, Henrique R, Oliveira J, Lopes C, Nelson W, Sidransky D. Quantitation of GSTP1 Methylation in Non-neoplastic Prostatic Tissue and Organ-Confined Prostate Adenocarcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001; 93(22):1747-1752.

Jhiang SM, Cho JY, Ryu KY, Deyoung BR, Smanik PA, Mcgaughy VR, Fischer AH, Mazzaferri EL. An immunohistochemical study of Na⁺/I⁻ symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues. *Endocrinology*. 1998; 139: 4416-4419.

Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTCRAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 2003;637:1454-7.

Knobel M & Medeiros-Neto G. An Outline of Inherited Disorders of the Thyroid Hormone Generating System. *Thyroid*. 2003; 13(8): 771-801.

Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001; 409:860-921.

Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics*. 1992; 13(4):1095-1107.

Lazar V, Bidart JM, Caillou B, Mahé C, Lacroix L, Filetti S, Schlumberger M. Expression of the Na⁺/I⁻ symporter gene in human thyroid tumors: a

comparison study with other thyroid-specific genes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84: 3228-32234.

Liang J, Chen CP, Huang SJ, Ho TY, Hsiang CY, Ding HJ, Wu SL. A novel loss-of-function deletion in sodium/iodide symporter gene in follicular thyroid adenoma. *Cancer Lett.* 2005; 230: 65-71.

Levy O, De la Vieja A, Ginter CS, Riedel C, Daí G, Carrasco N. N-link Ed glycosylation of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter (NIS). Implications for its secondary structure model. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:22657-63.

Medeiros-Neto G. Tudo o que você gostaria de saber sobre o câncer de tireóide. 1ª edição; Ed. Sambureau&Publicidade, São Paulo, 2005.

Melnick AM, Adelson K, Licht JD. The theoretical basis of Transcriptional Therapy of Cancer: Can it be put into practice?. *J. Clin. Oncology.* 2005; 23:3957-3970.

Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C Jr, Zhang L, Fagin JA. Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. *Cancer Res.* 2005; 65(6):2465-73.

Nephew KP, Huang THM. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Letters* , 2003:190, 125-133

Neumann S, Schuchardt K, Reske A, Reske A, Emmrich P, Paschke R. Lack of correlation for sodium iodide symporter mRNA and protein expression and analysis of sodium iodide symporter promoter methylation in benign cold thyroid nodules. *Thyroid.* 2004;14: 99-111.

Nicola JP, Nazar M, Serrano-Nascimento C, Goulart-Silva F, Sobrero G, Testa G, Nunes MT, Muñoz L, Miras M and Masini-Repiso AM. Iodide Transport Defect: Functional Characterization of a Novel Mutation in the Na/I Symporter 5-Untranslated Region in a Patient with Congenital Hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011, 96(7):E1100–E1107

Ohno M, Zannini M, Levy O, Carrasco N, di Lauro R. The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat

sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(3):2051-60.

Oler G, Cerutti JM. 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.* 2009; 115:972–980.

Pohlenz J, Medeiros-Neto G, Gross JL, Silveiro SP, Knobel M, Refetoff S. Hypothyroidism in a Brazilian kindred due to iodide trapping defect caused by a homozygous mutation in the sodium/iodide symporter gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 240(2):488-91.

Provenzano MJ, Fitzgerald MP, Krager K, Domann FE. Increased iodine uptake in thyroid carcinoma after treatment with sodium butyrate and decitabine (5-Aza-dC). *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007; 137(5):722-8.

Riedel C, Dohán O, De la Vieja A, Ginter CS, Carrasco N. Journey of the iodide transporter NIS: from its molecular identification to its clinical role in cancer. *Trends Biochem. Sci.* 2001;26:490-6.

Riedel C, Levy O, Carrasco N. Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *J. Biol. Chem.* 2001;276:21458–21463.

Ringel MD, Anderson J, Souza SL, Burch HB, Tambascia M, Shriver CD, Turtle RM. Expression of the sodium iodide symporter and thyroglobulin genes are reduced in papillary thyroid cancer. *Mod Pathol.* 2001;14(4):289-96.

Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P. A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications. *Eur J Endocrinol.* 2006; 155(4):495-512.

Riesco-Eizaguirre G, Rodríguez I, De la Vieja A, Costamagna E, Carrasco N, Nistal M, Santisteban P. The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer Res.* 2009 ;69(21):8317-25.

Ryu K, Tong Q, Jhiang S. Promoter characterization of the human Na⁺/I⁻ symporter. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83(9):3247-3251.

Russo D, Manole D, Arturi F, Suarez HG, Schlumberger M, Filetti S, Derwahl M. Absence of sodium/iodide symporter gene mutations in differentiated human thyroid carcinomas. *Thyroid*. 2001; 11(1):37-9.

Serrano-Nascimento C, Calil-Silveira J, Nunes MT. Posttranscriptional regulation of sodium-iodide symporter mRNA expression in the rat thyroid gland by acute iodide administration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;298(4):C893-9.

Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karniski LP. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat. Genet*. 1999;21:440–443.

Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1996; 226: 339-345.

Smanik PA, Ryu K, Theil KS, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology*. 1997; 138: 3555-3558.

Senou M, Khalifa C, Thimmesch M, Jouret F, Devuyst O, Col V, Audinot JN, Lipnik P, Moreno JC, Sande JV, Dumont JE, Many MC, Colin IM, Ge´rard AC. A Coherent Organization of Differentiation Proteins Is Required to Maintain an Appropriate Thyroid Function in the Pendred Thyroid. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95(8):4021–4030.

Shore A, Karamitri A, Kemp P, Speakman JR, Lomax MA. Role of Ucp1 enhancer methylation and chromatin remodelling in the control of Ucp1 expression in murine adipose tissue. *Diabetologia*. 2010; 53(6):1164-73.

Smith J, Fan C, Zou C, Bodenner D, Kokoska M. Methylation status of gene in papilar thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head neck surg*. 2007; 133(10):1006-1011.

Smith VE, Read ML, Turnell AS, Watkins RJ, Watkinson JC, Lewy GD, Fong JCW, James SR, Eggo MC, Boelaert K, Franklyn JA, McCabe CJ. A novel

mechanism of sodium iodide symporter repression in differentiated thyroid cancer. *Journal of Cell Science*. 2009; 122, 3393-3402.

Sodré A.K, Rubio IGS, Galvão AL, Knobel M, Tomimori. E, Alves VAF, Kanamura C, Buchpiguel CA, Watanabe T, Friguglietti CUM, Kulcsar MAV, Medeiros-Neto G, Camargo RY. Association of Low Sodium-Iodide Symporter mRNA Expression in Malignant Thyroid Nodules with Increased Intracellular Protein Staining. *J Clinical Endocrinol. & metabolism*. 2008; 93(10): 4141-4145.

Spitzweg C and Morris JC,. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to *NIS* mutations. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 322(1-2):56-63.

Stephen JK, Chitale D, Narra V, Chen KM, Sawhney R, Worsham MJ. DNA methylation in thyroid tumorigenesis. *Cancers (Basel)*. 2011; 3(2):1732-1743.

Suzuki K, Mori A, Saito J, Moriyama E, Ulianich L & Kohn LD. Follicular thyroglobulin suppresses iodide uptake by suppressing expression of the sodium/iodide symporter gene. *Endocrinology*. 1999; 140:5422–5430.

Suzuki K, Kohn LD. Differential regulation of apical and basal iodide transporters in the thyroid by thyroglobulin. *J Endocrinol*. 2006; 189(2):247-55.

Szinnai G, Kosugi S, Derrien C, Lucidarme N, David V, Czernichow P, Polak M. Extending the Clinical Heterogeneity of Iodide Transport Defect (ITD): A Novel Mutation R124H of the Sodium/Iodide Symporter Gene and Review of Genotype-Phenotype Correlations in ITD. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006; 91(4): 1199-1204.

Trouttet-Masson S, Selmi-Ruby S, Bernier-Valentin F, Porra V, Berger-Dutrieux N, Decaussin M, Peix JL, Perrin A, Bournaud C, Orgiazzi J, Borson-Chazot F, Franc B, Rousset B. Evidence for transcriptional and posttranscriptional alterations of the sodium/iodide symporter expression in hypofunctioning benign and malignant thyroid tumors. *Am J Pathol*. 2004; 165: 25-34.

Turk E, Wright EM. Membrane topology motifs in SGLT cotransporter family. *J Membr Bio*. 1997;159:1-20.

Van den Hove MF, Croizet-Berger K, Jouret F, Guggino SE, Guggino WB, Devuyst O, Courtoy PJ. The loss of the chloride channel, ClC-5, delays apical iodide efflux and induces a euthyroid goiter in the mouse thyroid gland. *Endocrinology*. 2006; 147(3):1287-1296.

Venkataraman GM, Yatin M, Marcinek R, Ain KB. Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na⁺/I symporter gene methylation status. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2449-2457.

Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 1999; 23: 62-66.

Wiench M, John S, Baek S, Johnson TA, Sung MH, Escobar T, Simmons CA, Pearce KH, Biddie SC, Sabo PJ, Thurman RE, Stamatoyannopoulos JA, Hager GL. DNA methylation status predicts cell type-specific enhancer activity. *EMBO J*. 2011; 30(15):3028-39.

Woodson K, Hayes R, Wideroff L, Villaruz L, Tangrea J. Hypermethylation of GSTP1, CD44 and E-Cadherin genes in prostate cancer among US blacks and whites. *The Prostate*. 2003; 55: 199-205.

Xing M, Usadel H, Cohen Y, Tokumaru Y, Guo Z, Westra WB, Tong BC, Tallini G, Udelsman R, Califano J, Ladenson PW, Sidransky D. Methylation of the Thyroid-stimulating Hormone Receptor Gene in Epithelial Thyroid Tumors: A Marker of Malignancy and a Cause of Gene Silencing. *Cancer research*. 2003; 63: 2316–2321.

Xing M. Minireview: Gene methylation in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology*. 2007; 148(3):948-953.

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