



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

TESE DE DOUTORADO

DEBORAH LAREDO JEZINI

**MAPA DE ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS
DO BÓCIO COLOIDE**

**Manaus
2017**

DEBORAH LAREDO JEZINI

**MAPA DE ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS
DO BÓCIO COLOIDE**

Tese apresentada a Banca de Defesa como requisito do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia na área de concentração em Saúde.

Orientador:

Prof. Dr. H.C. João Bosco L. Botelho

Co-orientadores:

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

Profa. Dra. Janice Barros Monteiro

**Manaus, AM
2017**

Ficha Catalográfica elaborada pela bibliotecária Marilene de Sena e Silva-CRB-11-AM 561

J43_m JEZINI, Deborah Laredo.

Mapa de alterações epigenéticas do bócio coloide. Deborah Laredo Jezini. Manaus: UFAM, 2017.

123 p. il.

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Programa de Pós-Graduação Multiinstitucional em Biotecnologia.

Orientador: João Bosco Lopes Botelho

Co-Orientador: Spartaco Astolfi Filho

Título em Inglês: Map of epigenetic changes in colloid goiter.

1. Biotecnologia. 2. Bócio coloide. 3. Alterações epigenéticas. I. Botelho, João Bosco Lopes (Orient.) II. Astolfi Filho, Spartaco (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título.

CDD: 611.4



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

DEBORAH LAREDO JEZINI

MAPA DE ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS DO BÓCIO COLOIDE

BANCA DE DEFESA - PORTARIA 08/2017

Realizada em 25/11/2017

Prof. Dr. HC João Bosco Botelho

Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

PRESIDENTE

TITULARES:

Prof. Dr. Arteiro, de Queiroz Menezes

Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof. Dr. Lesemky Calile H. Cattebeke

Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof. Dra. Enedina Nogueira de Assunção

Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade

Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

SUPLENTE

Prof. Dr. Jacob Moyses Cohen

Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof. Dr. Luiz Fernando Passos

Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Dedicatória

Aos meus pais Sarah e Salomão Laredo (*in memoriam*), pelo legado deixado a mim e aos meus irmãos do caminho da educação, por entenderem ser a melhor forma de alcançar grandes objetivos, e de maneira admirável, souberam nos mostrar que o aprendizado ideal se faz pelo exemplo, por atitudes positivas, e com valores éticos, dignidade, solidariedade e perseverança.

Ao meu marido Rochester e meus filhos Anne, Lia e Salomão, por serem simplesmente o melhor da minha vida e estarem sempre ao meu lado no apoio incondicional. Com estímulo e paciência, compreenderam o meu momento e a necessidade da dedicação à Ciência. Sem vocês, nenhuma conquista valeria realmente a pena.

Agradecimentos

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus por estar sempre ao meu lado, me guiando em todos os momentos, colocando as melhores pessoas no meu caminho, e me fazendo acreditar cada vez mais que podemos construir um mundo melhor.

Meus sinceros agradecimentos a Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade do Doutorado, e aos professores e demais funcionários pela construção do que sou, pois fazem parte da minha formação acadêmica desde o início.

Na UFAM, agradeço em especial ao Departamento de Clínica Médica (DCM) da Faculdade de Medicina ao qual faço parte, ao Programa Multi-institucional em Biotecnologia, ao Laboratório de Tecnologia de DNA, onde conclui parte da pesquisa de bancada, e ao Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM).

À *Ponce Health Sciences University/School of Medicine and Ponce Research Institute*, Ponce, PR, USA pelo acolhimento e parceria científica, na figura da Prof. Dra. Janice Monteiro.

Agradeço imensamente o amor e a disponibilidade de várias pessoas, as quais manifesto os meus sinceros reconhecimento e agradecimento, pois a realização de um projeto de pesquisa como este só seria possível com o apoio delas:

Em particular, agradeço ao meu professor e orientador Dr. João Bosco Botelho, meu querido mestre. Ele quem me incentivou a encarar todo o processo do doutoramento de maneira desafiadora, por ser incansável no estímulo do crescimento intelectual, sem deixar de citar que o faz de forma sábia, com maestria, gentileza e ética. Guardarei para sempre seus ensinamentos e sua preciosa orientação, e nunca esquecerei do “*Tubarão*” e do “*Cocheiro*”. Um grande e afetuoso muito obrigada, professor. Obrigada pela oportunidade.

Ao Dr. Spartaco Astolfi Filho, outro emblema que a UFAM tem a honra de contar, um dos nossos maiores cientistas, sempre ousado e dedicado, uma força insuperável na expansão da Biotecnologia no Amazonas. Apesar da grandeza que representa, tem a simplicidade e a doçura de quem verdadeiramente ama o que faz. A Ciência e o ensino agradecem sua dedicação, muito obrigada!

À querida Dra. Janice Monteiro, uma grande amiga e irmã que encontrei na trajetória da pesquisa, dinâmica e apaixonada pelo que faz. Abriu as portas do seu laboratório e compartilhou sua experiência internacional, trazendo o fascinante mundo da Epigenética para a minha vida.

Grande incentivadora do raciocínio científico. Realmente, uma pessoa fundamental para o sucesso deste trabalho, pois sua motivação foi tudo. A ela, devo este caminho. Obrigada Jan!

Ao amigo e professor Joaquim Loureiro, que me apoia em projetos desde o início da faculdade de medicina. Sempre gentil e solidário, é um médico com percepção especial do mundo, que abriu as portas do Laboratório Reunidos, e juntamente com o Professor. Dr. Luís Carlos Ferreira, foi o responsável pelos laudos histopatológicos dos bócio.

Aos dedicados Professores Dr. Edmar Vaz de Andrade, coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas (CAM/UFAM) e ao Professor Dr. Carlos Gustavo Nunes, que acompanharam minha trajetória na BIOTEC, incentivando todas as etapas da minha formação como pesquisadora.

Ao amigo Dr. Adolfo Mota, pela gentileza em abrir seu laboratório, me deixando sob o comando técnico do seu aluno e meu colega de doutorado Francisco Neto, uma grande figura, a quem devo muito, pois não mediu esforços. Obrigada de coração, Mota e Neto!

Às minhas amadas irmãs Simy Laredo, pela impagável contribuição na orientação metodológica, correções, observações e sugestões sempre relevantes, e Nina Laredo Pinto, outra irmã muito especial, que me ajudou com os ajustes da língua inglesa. Valeu meninas!

À minha querida Dina ou Dra. Enedina Nogueira de Assunção, que teve participação crucial na orientação da execução dos experimentos de bancada e no Banco de tecidos. Sem ela, eu nada seria, pois com atitude, dinamismo e simplicidade, estava sempre presente.

Aos meus colegas de doutorado, em especial ao Diego Carvalho, por partilhar angustias e gargalhadas, e por estarmos sempre contando um com outro nessa árdua etapa das nossas vidas, meu obrigada Dieguito!

Aos queridos e dedicados alunos, Andrey Maia e Paulo Rodrigues, por toda ajuda que dispensaram aos experimentos do laboratório, e sempre quando precisamos. Sem a participação e o companheirismo de vocês, este trabalho não seria tão especial. Muito obrigada meninos!

À Fundação Hospital Adriano Jorge e aos cirurgiões e médicos residentes que operaram as pacientes, ao Professor Dr. Arteiro de Queiroz Menezes e a professora Marilene Sena, uma grande amiga ao qual tenho muito apreço. Obrigada Mari!

À Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPEAM) por dar apoio à Iniciação Científica dos alunos Andrey e Paulo que acompanharam o projeto.

E, finalmente e com muito respeito, agradecer aos verdadeiros incentivadores do progresso científico, as pacientes que doaram os tecidos do bócio para a pesquisa.

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

(Marie Curie)

Dedicatória	
Agradecimentos	
Epígrafe	
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas e Gráficos	
Resumo	
Abstract	
INTRODUÇÃO	24
REFERENCIAL TEÓRICO	26
A GLÂNDULA TIREOIDE	26
<i>Regulação e função da tireoide</i>	28
BÓCIO COLOIDE	31
<i>Definição e Epidemiologia</i>	31
<i>Patogenia e Achados Clínicos</i>	31
<i>Fatores Etiológicos</i>	32
<i>Deficiência nutricional de iodo</i>	32
<i>Outros fatores</i>	34
<i>Mutações genéticas descritas no Bócio Coloide</i>	36
<i>Hipótese de transformação nodular do BC</i>	36
EPIGENÉTICA E MECANISMOS EPIGENÉTICOS	38
<i>Epigenética</i>	38
<i>Regulação genética e epigenética</i>	39
<i>Mecanismos Epigenéticos</i>	42
<i>Epigenoma</i>	43
<i>Modificações Epigenéticas</i>	44
Metilação do DNA	44
Modificações de histonas	47
Relação da metilação do DNA e das histonas	49
RNA não codificadores (ncRNA)	50

EPIGENÉTICA E AS DOENÇAS HUMANAS	51
<i>Epigenética nas doenças humanas não oncológicas</i>	51
<i>Epigenética nas doenças humanas oncológicas</i>	52
<i>Epigenética no câncer de tireoide</i>	54
<i>Epigenética no Bócio Coloide</i>	55
HIPÓTESE	57
OBJETIVOS	58
<i>Geral</i>	58
<i>Específicos</i>	58
MATERIAL E MÉTODOS	59
<i>Fluxograma da Pesquisa</i>	59
<i>Procedimentos Éticos</i>	59
<i>Termo de Consentimento Livre Esclarecido</i>	59
<i>Comitê de Ética em Pesquisa</i>	59
<i>Detalhes do Estudo</i>	60
<i>Tipo de Estudo</i>	60
<i>Locais do Estudo</i>	60
<i>Amostragem</i>	60
<i>Critérios de Inclusão e Exclusão</i>	60
<i>Critérios de Inclusão</i>	60
<i>Critérios de exclusão</i>	60
<i>Análise Estatística dos Dados</i>	61
<i>Seleção dos Tecidos de Bócio Coloide</i>	61
<i>Detalhamento do BTTNB/UFAM</i>	61
<i>Resultado dos Exames Histopatológica das peças cirúrgicas</i>	61
<i>Dados dos pacientes junto ao BTTNB/UFAM</i>	62
<i>Detalhamento das Amostras</i>	62
<i>Quantitativo de amostras (fragmentos)</i>	62
<i>Volume e peso das amostras</i>	62
<i>Regiões do bócio utilizadas no mapeamento epigenético</i>	63
<i>Análise Molecular</i>	63

<i>Preparo do ambiente de bancada, acondicionamento das amostras e manuseio</i>	63
HISTONAS	64
<i>Extração de Histonas</i>	64
<i>Método empregado</i>	64
<i>Procedimento</i>	64
<i>Análise Quantitativa da Metilação Das Histonas H3k4, H3k9 E H3k27</i>	64
<i>Protocolo empregado</i>	64
<i>Procedimento</i>	64
DNA	65
<i>Extração de DNA</i>	65
<i>Método empregado e técnica</i>	66
<i>Procedimento</i>	66
<i>Avaliação da qualidade do DNA genômico</i>	66
<i>Quantificação do DNA genômico</i>	66
<i>Método empregado</i>	66
<i>Liofilização das amostras</i>	66
<i>Análise Quantitativa da Metilação Global do DNA</i>	66
<i>Método empregado</i>	66
<i>Procedimento</i>	67
RESULTADOS	68
<i>Os resultados das análises</i>	68
<i>Resultado da Metilação do DNA</i>	68
<i>Resultado da Metilação das Histonas</i>	71
<i>Painel ilustrativo do resultado da metilação das histonas</i>	74
<i>Metilação global do DNA x descrições histopatológicas</i>	75
ANÁLISE DE DADOS ESTATÍSTICOS	80
<i>Metilação do DNA</i>	80
<i>Metilação Histonas</i>	82
DISCUSSÃO	91
CONCLUSÃO	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	97
ANEXOS	107

Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE)	107
Anexo 2 - <i>Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa</i>	108
Anexo 3 - <i>Detalhamento do Banco de Tecidos de Tireoides Normais e com Bócio</i>	109
Anexo 4 - <i>Análise Histopatológica das peças cirúrgicas</i>	110
Anexo 5 - <i>Tabela Complementar de Dados Clínicos e de Exames</i>	112
Anexo 6 - <i>Procedimento e as soluções empregadas no protocolo para extração de histonas</i>	113
Anexo 7 - <i>Fluxograma do método de quantificação de Histonas</i>	115
Anexo 8 - <i>Procedimento de Extração do DNA/Preparo das Amostras</i>	116
Anexo 9 - <i>Quantificação do DNA genômico</i>	118
Anexo 10 - <i>Procedimento da Análise Quantitativa da Metilação Global do DNA</i>	119
Anexo 11 - <i>Fluxograma da metodologia colorimétrica de ELISA</i>	121
Anexo 12 - <i>Resultado da Quantificação de DNA genômico utilizando Nanodrop®</i>	122
Anexo 13 - <i>Resultado da leitura da absorbância (pan-metilação da 5-mC DNA)</i>	123

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AID/APOBEC - família de desaminases (sem tradução)

atm – medida de pressão atmosférica

°C – graus Célsius

AM - Amazonas

AMPc - AMP cíclico

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agencia de Vigilância Sanitária

BC - bócio coloide

BMN - bócio multinodular

BN - bócio Uninodular

BNT - bócio nodular tóxico

BNA - bócio nodular atóxico

BTTNB - Banco de Tecidos Tireoidianos Normais e com Bócio

BRAF (*B-raf-protooncogen-serin /threonine kinase*)

BER – glicosilases de BER (sem tradução)

CAM/UFAM - Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas

C5 – quinta vertebra cervical

C₃₄H₆₂H₁₁ - TRITON X100

CH₃ - radical metil

CTD – domínio carboxi-terminal

ChIP - imunoprecipitação da cromatina

CpGs - dinucleotídeo citosina-guanina

cRNA - RNA codificador

COSMIC - *curates comprehensive information on somatic mutations in human cancer*

5caC - 5-carboxilcitosina

DIT - diiodotirosina

Dio - Iodotironinas deiodinases ou 5'-deiodinases

Dio1 5'-deiodinases 1

Dio2 - 5'-deiodinases 2

Dio3 - 5'-deiodinases 3

DNA - ácido desoxirribonucleico

DNMT - DNA-metiltransferase

DNMT1 - DNA-metiltransferase um

DNMT2 - DNA-metiltransferase dois

DNMT3 - DNA-metiltransferase três

DUOX 1- tireoide oxidase um

DUOX 2 - tireoide oxidase dois

Dp- desvio-padrão

E2 - 17- β -estradiol

ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay* 5-mC DNA - 5-metilcitosina DNA

et al. - e outros/colaboradores

FAD- flavina dinucleotídeo

FACT - *Facilitates Chromatin Transcription* (Chaperona)

FHAJ - Fundação Hospital Adriano Jorge

FOXO2- fator de transcrição (sem tradução)

5fC - 5-formilcitosina

5caC - 5-carboxilcitosina

g - gravidade (força de centrifugação)

GPxs - glutathionas peroxidases

GPx3- glutathiona peroxidase tipo 3

HDACS - histonas desacetilases

HIRA - *histone-associated regulatory*.

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

H₂O milli-Q – água deionizada purificada no sistema Milli-Q (*Millipore Corporation*)

HBV - vírus da hepatite B

HCV- vírus da hepatite C

H3K4 - histonas H3 na lisina 4

H3K9 - histona H3 na lisina 9

H3K27 - histona H3 na lisina 27

H3K14ac - histona 3 na lisina 14 acetilada

H3K9me3 - histona 3 na lisina 9 tri-metilada

HE: *histone extraction solution* – solução de extração de histonas

HCl - ácido clorídrico
H - proteínas histonas
Hox - genes homeóticos
HOMA-IR - *homeostatic model assessment – insulin resistance*
HMT – histona metiltransferases
INO80 - *inositol-requiring protein 80*
IMC - índice de massa corpórea
I – Ístmo
ICGC – *International Cancer Genome Consortium*
JAK/STAT - *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*
KDa – quilo-Daltons
KCl - cloreto de potássio
KH₂PO₄ - fosfato de potássio monobásico
LD - lobo direito
LE - lobo esquerdo
LSD - lobo superior direito
LSE - lobo superior esquerdo
LID - lobo inferior direito
LSD1/ LSD2 - demetilase específica de lisina 1 e 2
LIE - lobo inferior esquerdo
LMD - lobo médio direito
LME - lobo médio esquerdo
mL - mililitro
µg - micrograma
MAPK - *mitogen-activated protein kinase*
MIT - monoiodotirosina
MTC - carcinoma medular de tireoide
5-mC - 5-metilcitosine
miRNA - microRNAs
2-MEA - *2-mercaptoethylamine-HCl*
mM - milimolar
µL - microlitro

NIS - sodium/iodine symporter (simportador de sódio/iodo)

Np95 - proteína nuclear de 95 kDa

NaCl - cloreto de sódio

Na₂HPO₄ · 2 H₂O - fosfato de sódio dibásico dodeca-hidratado

NaOH- hidróxido de sódio

Na/K-ATPase – bomba de sódio/potássio ATP ase

ncRNA - RNA não codificador

OMS - Organização Mundial da Saúde

P - lobo piramidal

PI3K-AKT - *phosphoinositide-3-kinase /v-akt murine thymoma viral oncogene homologue*

PAAF - punção aspirativa por agulha fina

PAX-8 - fator de transcrição PAX-8 (sem tradução)

pb - pares de base

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PCR - reação em cadeia da polimerase

PDS - pendrina

PHD - homeodomínio de plantas

PKC - fosfoquinase C

Pol II - RNA Polimerase II

PSMF- fenilmetilsufonilfenoide

PTH - paratormônio

RI – resistencia à insulina

RING - Domínio dedo (really interesting new gen)

RNA - ácido ribonucleico

RNA_m - ácido ribonucleico mensageiro

ROS – *reactive oxygen species* - espécies reativas de oxigênio

RRBS – sequenciamento após tratamento com bissulfito de baixa representação

rT3 - T3 reverso

Spt6 - subunidades de histonas chaperonas

SAM - S-adenosilmetionina

SOP- síndrome dos ovários policísticos

SUS - Sistema Único de Saúde

TCLE - Termo de Consentimento Livre Esclarecido

T3 - triiodotironina

T4 - tiroxina

Tg - tireoglobulina

TET1-tet metilcitosina dioxigenase 1 ou 5mC hidroxilase

TTF-1, TIF-2 (FOXE1) –fatores de transcrição (sem tradução)

TPO - tireoperoxidase hemoproteína

TRH - hormônio liberador de tirotrófina

TRxs - tiorrexinas reductases

TR - receptor de hormônios tireoidianos

TR α - receptor de hormônios tireoidianos α

TR β - receptor de hormônios tireoidianos β

TSH - hormônio tireoestimulante

TSHR - receptor do hormônio estimulador da tiroide

TSS - início de transcrição

TTS - terminação da transcrição

ART1 - vertebra torácica 1

UHRF1 - *Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1*

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

USG - ultrassonografia

Lista de Figuras

Figura 1	Localização da tireoide e paratireoides.	26
Figura 2	2A Eixo de secreção endócrina dos hormônios tireoidianos hipotálamo-hipófise-tireoide. 2B. Corte histopatológico de tireoide normal e as unidades foliculares ricas em material colóide.	27
Figura 3	Representação esquemática da via biossintética dos hormônios T3 e T4 nos folículos tireoidianos.	29
Figura 4	Aspectos Clínicos do Bócio Colóide, com variáveis de bócio nodular (A, B, C e D). Volumoso bócio multinodular (E e F). Incisão cirúrgica em “U de Botelho” para acesso a bócios de grande volume e resultado pós-operatório (H).	32
Figura 5	Distribuição geográfica do estado nutricional de iodo na população mundial, com base na excreção urinária média.	33
Figura 6	Representação esquemática da hipótese de transformação nodular tireoidiana.	37
Figura 7	Regulação genética (A) e epigenética (B).	40
Figura 8	Genoma e Epigenoma e seus mecanismos de regulação.	41
Figura 9	Formação do endofenótipo e consequente fenótipo externo.	44
Figura 10	Os tipos de DNA metiltransferases, divididas em <i>de novo</i> (A) e de manutenção (B).	45
Figura 11	O código das histonas com as principais histonas conhecidas e sua respectiva atividade na cromatina.	48
Figura 12	O fluxograma da pesquisa.	59
Figura 13	Desenho esquemático da tireoide com as regiões onde foram realizadas as coletas das amostras de tecido feita para cada um dos pacientes selecionados do BTTNB.	63
Figura 14	Fluxograma do método de quantificação de metilação <i>EpiQuik® Global Pan-Methyl histonas H3-K4/H3-K9/H3-K27</i> (Anexo 7).	115
Figura 15	Procedimento para extração de DNA genômico conforme o fabricante <i>PureLink® (Invitrogen, cat. no. K1820-02)</i> (Anexo 8).	117
Figura 16	Perfil eletroforético das amostras de DNA de bócio (Anexo 9).	118
Figura 17	Procedimento da análise da Metilação Global do DNA em placa/leitor de ELISA. Desenho representativo da configuração e fotos da placa da distribuição das amostras e dos controles nos poços da placa de ELISA (Anexo 10).	120

Figura 18	Fluxograma do método de quantificação do percentual de metilação do DNA genômico utilizando a técnica em ELISA no Kit de Quantificação de Metilação MetilFlash® (Anexo 11).	121
Figura 19	Conjunto dos gráficos representando a distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas diferentes regiões do bócio de todos os 05 pacientes (BTTNB 21,28,29,30 e 31).	70
Figura 20	Painel ilustrativo representando a diferença nos padrões das histonas H3K4me3, H3K9me3 e H3K27me3 considerando o fator região (A) e o fator paciente (B).	74
Figura 21	21A: Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 1 (21), de 54 anos de idade. 21B: Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 1 (21), comparando com o exame histopatológico.	75
Figura 22	22A: Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 2 (28), de 54 anos de idade. 22B: Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 2 (28), comparando com o exame histopatológico.	76
Figura 23	23A: Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 3 (29), de 54 anos de idade. 23B: Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 3 (29), comparando com o exame histopatológico.	77
Figura 24	24A: Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 4 (30), de 59 anos de idade. 24B: Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 4 (30), comparando com o exame histopatológico.	78
Figura 25	25A: Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 5 (31), de 33 anos de idade. 25B: Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 5(31), comparando com o exame histopatológico.	79
Figura 26	Desequilíbrio de metilação do DNA no Câncer.	93
Figura 27	Sugestão da rota de modificações epigenéticas que podem ocorrer no bócio colóide e a progressão a variáveis teciduais.	95

Tabelas

Tabela 1	Modificações na cromatina, leitura e funções atribuídas.	39
Tabela 2	Dados contidos no banco de dados COSMIC das mutações documentadas no câncer na versão de julho de 2010	51
Tabela 3	Descrição de dados dos pacientes cadastrados no BTTNB/UFAM.	62
Tabela 4	Dados complementares de achados clínicos e exames dos pacientes	112
Tabela 5	Distribuição do percentual de metilação global do 5-mC DNA entre as amostras, estratificado por região da tireoide.	69
Tabela 6	Resultado do percentual da pan-metilação da H3K4 por região de bócio.	71
Tabela 7	Resultado do percentual da pan-metilação da H3-K9 por região de bócio.	72
Tabela 8	Resultado do percentual da pan-metilação da H3-K27 por região de bócio.	73
Tabela 9	Análise descritiva e de variância da metilação global das 5-mC DNA das amostras.	80
Tabela 10	Análise descritiva e de variância da pan-metilação das histonas considerando o paciente como fator de variabilidade.	83
Tabela 11	Análise descritiva e de variância da pan-metilação das histonas considerando a região da tireoide como fator de variabilidade.	85
Tabela 12	Correlação entre a metilação do DNA com a metilação das Histonas H3K27, H3K4 e H3K9.	90

Gráficos

Gráfico 1	Resultado da leitura da absorbância em espectrofotômetro do percentual de pan-metilação da 5-mC DNA de amostras de bócio, estratificada por paciente e área de tireoide.	68
Gráfico 2	Pan metilação da histona H3K4 em amostras de bócio coloide dos 05 (cinco) pacientes [1 (21), 2 (28): 3 (29), 4 (30) e 5 (31)].	71
Gráfico 3	Pan metilação da histona H3K9 em amostras de bócio coloide dos pacientes:1 (21), 2 (28): 3 (29), 4 (30) e 5 (31).	72
Gráfico 4	Pan metilação da histona H3K27 em amostras de bócio coloide dos pacientes:1 (21), 2 (28): 3 (29), 4 (30) e 5 (31).	73
Gráfico 5	Metilação global média das 5-mC DNA das amostras por paciente.	81
Gráfico 6	Metilação global média das 5-mC DNA das amostras por região da tireoide.	81
Gráfico 7	Médias da metilação de DNA 5-mC de cada paciente em comparação com as regiões que apresentaram Metilação < 0,5 ng, Manaus - AM.	82
Gráfico 8	Pan-metilação média da histona H3K4 dos pacientes avaliados.	83
Gráfico 9	Pan-metilação média da histona H3K9 dos pacientes avaliados.	84
Gráfico 10	Pan-metilação média da histona H3K27 dos pacientes avaliados.	84
Gráfico 11	Pan-metilação média da histona H3K4 por região do bócio.	85
Gráfico 12	Pan-metilação média da histona H3K9 por região do bócio.	86
Gráfico 13	Pan-metilação média da histona H3K27 por região do bócio.	86
Gráfico 14	Região do lobo superior direito (LSD) por histona.	87
Gráfico 15	Região do lobo inferior direito (LID) por histona.	87
Gráfico 16	Região do lobo médio direito (LMD) por histona.	88
Gráfico 17	Região do istmo superior (IS) por histona.	88
Gráfico 18	Região do lobo superior esquerdo (LSE) por histona.	88
Gráfico 19	Região do lobo médio esquerdo (LME) por histona.	89
Gráfico 20	Região lobo inferior esquerdo (LIE) por histona.	89
Gráfico 21	Correlação entre a metilação do DNA com a metilação das Histonas H3K27, H3K4 e H3K9.	90

RESUMO

Introdução: O bócio coloide (BC) constitui numa desordem heterogênea e representa a principal causa de nódulo benigno da tireoide. Prevalente em áreas geográficas com deficiência de iodo, sendo, na maioria dos casos, conduzido de forma expectante ou cirúrgica. Classificado de acordo com as características morfológicas e funcionais, pode se apresentar difuso ou nodular, tóxico ou atóxico (com ou sem autonomia funcional), podendo alcançar grandes volumes e ocasionar compressão de estruturas do pescoço, ou, não muito raramente, sofrer transformação maligna. Dependente de fatores ambientais e genéticos, com a deficiência de iodo sendo o principal fator determinante para o impacto na incidência, outros fatores ambientais e hereditários são arrolados, porém pouco se conhece da patogênese molecular.

Objetivos: mapear as alterações epigenéticas de diferentes regiões de 05 espécies cirúrgicas de BC de pacientes submetidos a tireoidectomia total em Manaus, Amazonas, com o objetivo de analisar, comparar e descrever o padrão específico para esta população. **Metodologia:** Foram utilizados 05 espécimes de BC com confirmação histopatológica, provenientes do “Banco de Tecidos de Tireoide Normal e com Bócio” da UFAM, e para identificar os padrões de metilação global do DNA e da histona 3 na lisina trimetiladas 4, 9 e 27 (H3K4me3, H3K9me3 e H3K27me3) foram utilizados método de imunoenensaio específico do tipo ELISA, com os resultados comparados entre as pacientes, entre as diferentes regiões da glândula num mesmo indivíduo e entre os indivíduos. **Resultados:** não houveram evidências de que existam diferenças significativas (ao nível de 5%) dos padrões médios de metilação global do DNA entre os pacientes ($p = 0,114$), ou entre as regiões da tireoide ($p = 0,843$), sendo, portanto, consideradas similares. Os padrões médios de pan-metilação das histonas H3K4me3, H3K9me3 e H3K27me3 são significativamente diferentes entre os pacientes ($p < 1\%$), apesar de não apresentar diferenças significativas entre as regiões num mesmo indivíduo, ($p > 5\%$). **Conclusão:** Os resultados das análises deste estudo, revelou que os espécimes de BC obedeceram a um padrão de distribuição de hipermetilação do DNA significativa entre os pacientes e as regiões do BC, diferindo somente entre os pacientes o padrão de metilação das histonas. Como estes achados são mais comuns no câncer, podemos sugerir que em nível epigenético, o BC possa ter algum fator etiológico comum que leve a esta resposta tecidual ou que responda pelas expressões fenotípicas e transformação maligna. Como, até o momento, não existem marcadores eficientes que detecte com precisão a existência de risco de malignização do BC, muito menos a possibilidade de definir sua progressão tecidual, é muito provável que participem múltiplos genes neste processo. Portanto, os achados encontrados nestas pacientes podem abrir caminho na aplicação futura do estudo epigenético do BC, podendo implicar na viabilização de novas formas terapêuticas ou preventivas da progressão, uma vez que, o status de metilação pode ser revertido, porém outros estudos ampliados na população em questão são necessários para entender melhor estes achados.

Palavras-chave: Bócio. Doenças da tireóide. Epigenética. Metilação do DNA. Metilação de histonas.

ABSTRACT

Introduction: The colloid goiter (CG) is a heterogeneous disorder and represents the main cause of benign thyroid nodule. Prevalent in geographical areas with iodine deficiency, in most cases carried out expectant conduct or surgically. Classified according to the morphological and functional characteristics, it may present as diffuse or nodular, toxic or nontoxic (with or without functional autonomy). Can reach large volume and compression of neck structures or even turn into malignant disease. Dependent on environmental and genetic factors, with iodine deficiency being the main determinant for the impact on incidence, other environmental and hereditary factors are listed, but little is known about the molecular pathogenesis. **Objectives:** To map the Epigenetic alterations of the five different surgical parts of CG from patients submitted to total thyroidectomy in Manaus, Amazonas, to analyze, compare and describe the specific pattern for this population. **Methods:** Five specimens of CG with histopathological confirmation were obtained from the “Normal Thyroid Tissue Bank and with Goiter” from the UFAM. Were used to identify the global methylation patterns of DNA and histone 3 in trimethylated lysine 4, 9 and 27 (H3K4me3, H3K9me3 and H3K27me3). Was used an ELISA type specific immunoassay method, with the results compared between the patients, between the different region of the gland in the same individual and between the individuals. **Results:** there was no evidence there were significant differences (5%) in the mean global DNA methylation patterns between the patients ($p = 0.114$) or between the thyroid regions ($p = 0.843$) considered similar. The mean pan-methylation patterns of histones H3K4me3, H3K9me3 and H3K27me3 are significantly different among patients ($p < 1\%$), although there were no significant differences between parts in the same individual ($p > 5\%$). **Conclusion:** The results of the analyzes of this study revealed that CG parts obeyed a pattern of distribution of significant DNA hypermethylation between patients and parts of CG, differing only among patients the pattern of histone methylation. As these findings are more common in cancer, we may suggest that at the epigenetic level CG may have some common etiologic factor that leads to this tissue response or that responds by phenotypic expressions and malignant transformation. There are now no efficient markers that accurately detect the risk of CG malignancy, much less the possibility of defining its tissue progression, it is very likely that multiple genes will participate in this process. Therefore, the findings found in these patients may make way for the future application of the CG epigenetic study, which may imply the viability of new therapeutic or preventive forms of progression, since the methylation status can be reversed, but other studies in the population are needed to understand better those finding.

Keywords: Goiter. Thyroid disease. Epigenetic. DNA methylation. Histone methylation.

O bócio coloide (BC) é uma patologia hiperplásica benigna, causada pelo crescimento focal ou difuso da tireoide, importante glândula localizada na região cervical anterior, responsável pela regulação do metabolismo, crescimento e desenvolvimento humano.

A prevalência do BC é elevada, acometendo principalmente mulheres e idosos, podendo ser endêmico em áreas geográficas com deficiência de iodo, e atualmente, responde pela principal causa de nódulos benignos da tireoide no mundo.

De acordo com as características morfológicas e funcionais, o BC é classificado clinicamente em difuso ou nodular, tóxico ou atóxico (com ou sem capacidade autônoma de secretar hormônios tireoidianos), sendo geralmente de crescimento lento e progressivo. No entanto, em alguns indivíduos pode alcançar grandes volumes e/ou crescer até a região do mediastino (componente mergulhante), e com isso, causar compressão de estruturas anatômicas do pescoço, ou em alguns casos podem sofrer transformação maligna.

A etiologia do BC é variada, dependente de fatores ambientais e genéticos, sendo a deficiência de iodo o principal fator determinante, possivelmente pelo fato do iodo ser o substrato necessário à síntese dos hormônios tireoidianos, que em condições de escassez, induzir à oscilação dos níveis de hormônio tireoestimulante, levando conseqüentemente, ao crescimento hiperplásico das células foliculares de forma compensatória. Quanto aos fatores genéticos, algumas mutações específicas foram descritas somente em grupos familiares isolados, não evidenciadas em todos os pacientes.

Inicialmente o crescimento do BC é difuso, constituindo-se em condição reversível com a suplementação do iodo. Persistindo a carência do mineral associada a outros fatores menos esclarecidos, o BC passa a sofrer mudanças na arquitetura tecidual, tornando-se heterogêneo.

Na região Amazônica, o BC é considerado endêmico (>5%), no entanto, de forma controversa, levantamentos epidemiológicos utilizando os níveis de iodonúria em escolares, apontam o Brasil como um dos países que apresenta excesso de iodo, sendo evidente que outros fatores necessitem ser pesquisados.

A Epigenética é uma área da ciência que foi descrita pela primeira vez há mais de 70 anos, e refere-se a mudanças reversíveis e herdáveis no genoma que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA, ou seja, apenas modificam a transcrição gênica. Nos vertebrados, as

modificações epigenéticas fazem parte de eventos fisiológicos ou patológicos, respondendo por expressões gênicas de caráter adaptativo ou de defesa a estímulos ambientais, e até mesmo como forma de sobrevivência das espécies.

As modificações epigenéticas são chamadas de “marcas epigenéticas”, que por sua vez, formam o chamado “epigenoma” a partir das agressões ambientais ocorridas durante toda a vida de um indivíduo, que pode ser transmitido às novas gerações de forma permanente ou transitória, permitindo que a prole tenha melhor resposta aos mesmos eventos quando deparados no futuro.

Com o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas, ocorreram avanços na identificação de estruturas e vias moleculares do processo de transcrição, tornando viável o estudo dos principais mecanismos epigenéticos conhecidos, como a metilação do DNA, as modificações pós-traducionais de histonas e os ncRNAs, que juntos ou isolados, são os principais moduladores da dinâmica da cromatina, responsáveis pela ativação ou silenciamento dos genes.

Como o fator ambiental parece ser preponderante, e por não dispomos na literatura de informações relativas à gênese molecular ou epigenética do BC na população dessa região, objetivamos neste trabalho, mapear duas principais modificações epigenéticas conhecidas, a metilação global do DNA e da pan-metilação da histona H3 nas lisinas 4 (H3K4), 9 (H3K9) e 27 (H3K27), nas diferentes regiões anatômica da tireoide de 05 peças cirúrgicas de BC conservadas a – 80 °C, de pacientes do sexo feminino, submetidas a tireoidectomia total em Manaus/AM, com idade entre 33 e 65 anos, função tireoidiana normal, diagnóstico confirmado por exame histopatológico, e que pertenciam ao Banco de Tecidos de Tireoide Normal e com Bócio da Universidade Federal do Amazonas (BTTNB/UFAM).

Utilizamos o método de imunoensaio específico do tipo ELISA, com o objetivo de demonstrar se o ambiente do bócio se comporta de forma semelhante ou diferente entre os indivíduos, e se há predileção por determinada região anatômica da tireoide. As histonas empregadas foram escolhidas por serem as mais amplamente estudadas na correlação com a metilação do DNA e pela disponibilidade dos imunoenaios comerciais.

Ao buscarmos esclarecer estes dados moleculares, objetivamos contribuir com o conhecimento de possíveis fatores subjacentes relevantes que possam integrar estudos futuros que auxiliem na compreensão do comportamento do BC na nossa região.

A GLÂNDULA TIREOIDE

A tireoide humana é uma das maiores e mais importantes glândulas do sistema endócrino, recebe este nome que deriva do grego “*thyreos*” por assemelhar-se a um escudo. Essencial na regulação do metabolismo e no processo de crescimento e desenvolvimento humano (CABRAL, 2009). É a primeira estrutura endócrina a ser identificada, surgindo a partir do assoalho da faringe primitiva ou superior, entre o 20º e 22º dias de vida do embrião, com posterior migração para a base do pescoço entre o 40º e 50º dia, onde permanece até o final da embriogênese (MCINNES; MICHAUD, 2003).

No adulto, a glândula tireoide se localiza na face anterior do pescoço, região posterior aos músculos esternocleidomastoideo e esternohioideo (Figura 1), e fica ao nível das vértebras cervical C5 e torácica T1, pesa em torno de 15-25g, sendo didaticamente subdividida em dois lóbulos ou lobos: direito e esquerdo e região do istmo. Na visão posterior da tireoide, se localizam quatro glândulas paratireoides, responsáveis pela produção de paratormônio (PTH), hormônio que regula os níveis de cálcio no organismo.

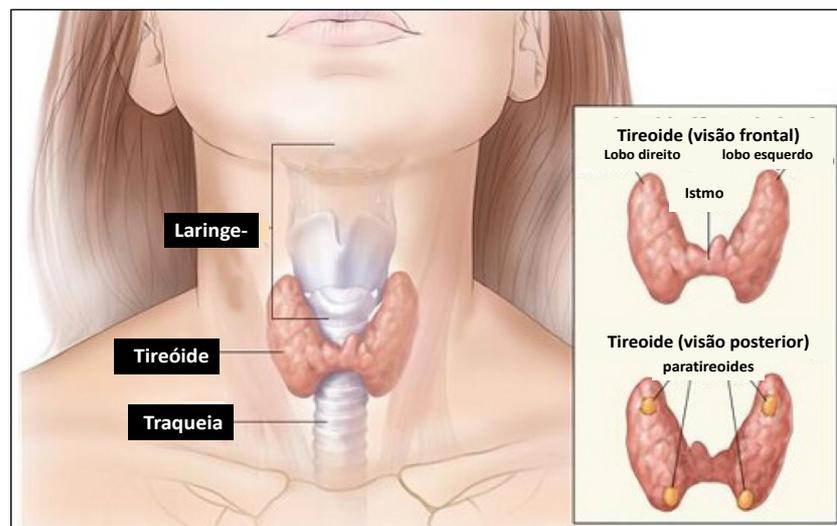


Figura 1. Localização da tireoide e paratireoides, vista cervical anterior e posterior.

Fonte: adaptado de <https://steptohealth.com/detect-thyroid-problems-time> (Acesso em 08/2017).

A tireoide é responsável pela síntese, armazenamento e secreção dos hormônios tireoidianos tri-iodotironina (T3) e Tiroxina (T4), regulados pelo hormônio tireoestimulante (TSH), secretado pelo lóbulo anterior da hipófise, que por sua vez é controlado diretamente pelo hormônio liberador de tirotrófina (TRH), produzido e liberado pelos núcleos supraópticos do hipotálamo. Ambos, TRH e TSH, são regulados pelos níveis circulantes de T3 e T4, formando um circuito de secreção hormonal, chamado de eixo hipotalâmico-hipofisário ou de *feedback* negativo (Figura 2A) (KRONENBERG *et al.*, 2010).

Histologicamente, o epitélio da tireoide é constituído em maior parte pelas células foliculares cubóides, chamadas de tireócitos, que formam as unidades foliculares (Figura 2B), que são arranjos circulares organizados, cujo lúmen é preenchido por material gelatinoso ou coloidal, onde os hormônios tireoidianos sintetizados são armazenados em conjunto com a proteína tireoglobulina (Tg), formando complexos de reserva de T3 e T4 dentro dos folículos. Outros três tipos de células também compõem o parênquima da tireoide: as células endoteliais, os fibroblastos e as parafoliculares ou “células C”, sendo estas últimas derivadas da crista neural responsáveis pela secreção de calcitonina ou tireocalcitonina, hormônio que participa no equilíbrio do cálcio sanguíneo e na reabsorção óssea (WARD, 2012).

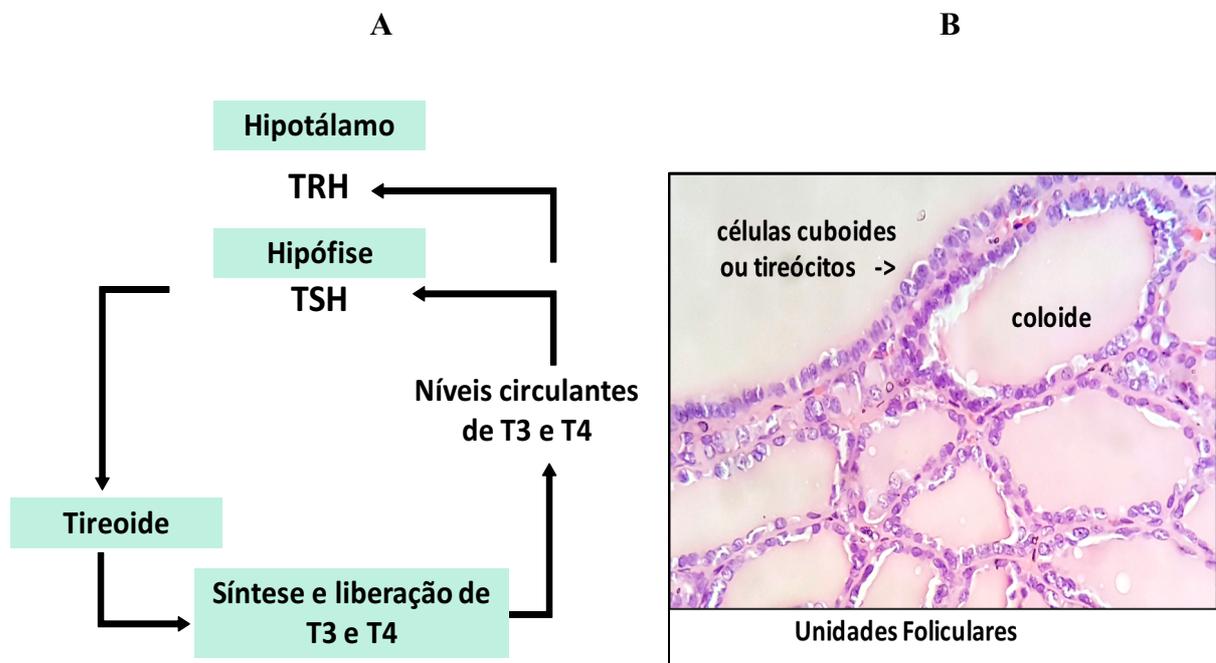


Figura 2A. Eixo de secreção endócrina dos hormônios tireoidianos hipotálamo-hipófise-tireoide. Fonte: Jezini, DL, 2017. **2B.** Corte histopatológico de tireoide normal exibindo as unidades foliculares ricas em material coloidal. Fonte: Laboratório Reunidos, Manaus/AM (2017).

Regulação e função da tireoide

Em mamíferos, o TSH e o iodo são os principais reguladores fisiológicos do crescimento e atividade funcional da tireoide, ou seja, regulam a síntese dos hormônios tireoidianos, responsáveis por atividades metabólicas essenciais como a síntese proteica, formação de ácidos nucleares e lipídios, como também das funções de controle da termogênese, maturação celular, transporte e outras atividades como a fagocitose, o movimento lisossomal, entre outras (DUMONT, 2011). Os hormônios tireoidianos são essenciais não somente ao homem, mas também ao crescimento, desenvolvimento, diferenciação neural, metamorfose e regulação metabólica dos vertebrados (FURLOW; NEFF, 2006).

O TSH é um hormônio proteico, constituído por duas subunidades: alfa e beta, ligadas entre si de forma não covalente, que atua através da ligação em receptor específico (TSHR), localizado nas células foliculares tireoidianas. Interage com a proteína “G” e estimula a síntese das proteínas transportadoras de iodo, tiroglobulina (Tg) e tireoperoxidase (TPO), essenciais à síntese e secreção dos hormônios tireoidianos, por meio de duas vias distintas: a via adenilato ciclase e proteína fosfoquinase C (PKC). O TSH atua no crescimento compensatório da tireoide e possivelmente ocasiona a heterogeneidade no parênquima, quando em ausência ou carência ambiental de iodo é persistente (GOEL *et al.*, 2013).

A atividade funcional da tireoide depende diretamente do estado nutricional do iodo, que é oriundo exclusivamente da dieta, devendo ser em torno de 150µg diários. Absorvido pelo trato gastrointestinal em forma de iodeto, o iodo é transportado ativamente na corrente sanguínea e captado pelo tireócitos por gradiente de concentração, via transportador NIS (*simporter sódio/potássio*), localizado na membrana basolateral. Posteriormente, na membrana apical do tireócito ocorre o efluxo do iodo para o coloide sobre ação da *Pendrina*, onde é oxidado pela tireoperoxidase hemoproteína (TPO), que utiliza como co-substrato o peróxido de hidrogênio, cuja expressão é controlada por fatores de transcrição específicos: TTF-1, TIF-2 (FOX E1), FOX E2 e PAX-8 (Figura 3, p. 29) (DOHAN *et al.*, 2003).

O iodo depois de oxidado é organificado, ou seja, incorporado aos resíduos de tirosil da molécula de Tg para gerar as monoiodotironinas (MIT), e sofre uma segunda oxidação pela TPO, passando a apresentar duas moléculas de iodo, e a ser chamada de diiodotironina (DIT),

que em forma de arranjo farão o acoplamento entre si para a composição de T3 = 01 DIT + 01 MIT e de T4 = 01 DIT + 01 DIT (SONG *et al.*, 2007).

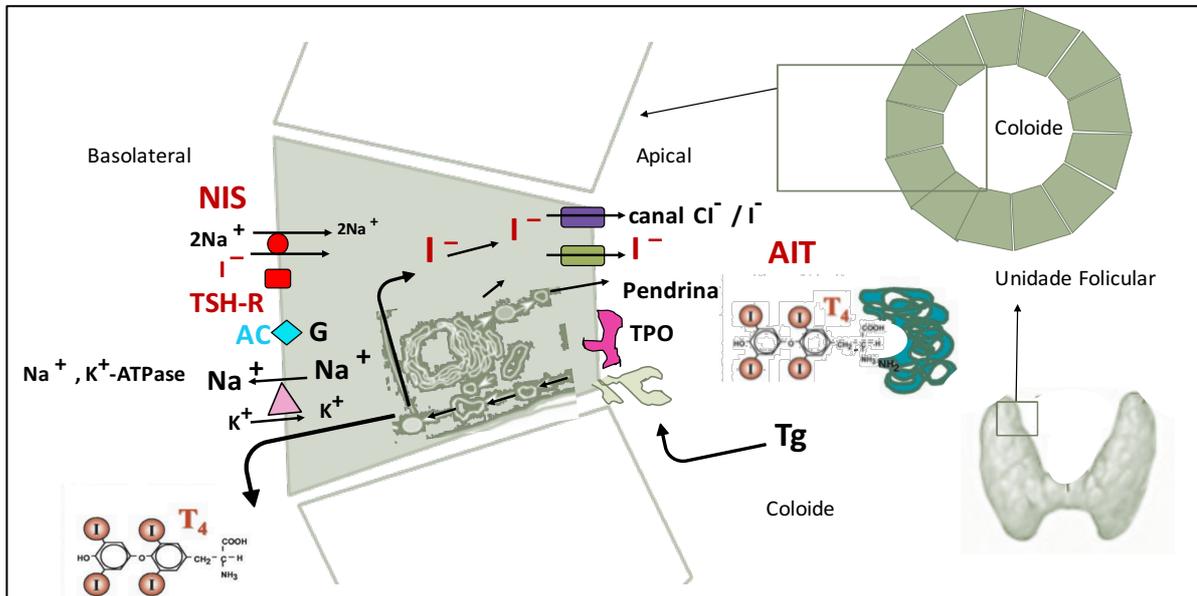


Figura 3: Representação esquemática da via biossintética dos hormônios T3 e T4 nos folículos tireoidianos, unidades compostas por uma camada de células epiteliais que cercam o coloide. A superfície basolateral da célula é mostrada no lado esquerdo da figura e a superfície apical à direita. Círculo: acumulação ativa de I⁻, mediada pelo NIS; Triângulo: bomba de Na/KATPase; Quadrado: receptor de TSH; Diamante: adenilato-ciclase (AC); Elipse: proteína G; Cilindro: Efluxo do Iodo em direção ao coloide; TPO: catalisação da organificação do Iodeto pela TPO; Setas apontando da região apical para o lado basolateral indicam endocitose de Tg iodada, seguida de hidrólise fagolisossômica de Tg iodada endocitada e secreção de ambos hormônios tireoidianos; AIT, Transportador apical de iodo (Modificado de DOHAN et al, 2003).

Outro elemento químico não menos importante que o iodo no equilíbrio funcional da tireoide e abundantemente presente na glândula é o selênio (Se), micronutriente da dieta que compõe as *selenocisteínas*: *Glutathionas peroxidases* (GPxs) e *Tiorredoxinas redutases* (TRxs), responsáveis pelo controle do estresse oxidativo gerado no processo de biossíntese hormonal, ou seja, regulam o excesso de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e espécies reativas de oxigênio (ROS), tóxicos à integridade genômica, e as *Iodotironinas deiodinases* ou *5'-deiodinases* (Dios), que atuam na remoção de uma das moléculas de iodo do T₄, convertendo-o a T₃ ativo e T₃ reverso inativo (rT₃). São três tipos: a *5'-deiodinase* tipo 1 (Dio1), que converte T₄ para T₃ no sangue, a Dio2, expressa nos tecidos, e a Dio3, que inativa tanto T₄ quanto do T₃ residuais (KOHRLER; GARTNER, 2009; DUNTAS, 2010).

Vale ressaltar que, para a devida absorção dos elementos iodo e selênio no trato gastrointestinal, é necessária a presença do simportador NIS ou do transportador

Na+/multivitaminas, além da composição da microbiota intestinal, que também parece interferir na absorção destes micronutrientes (VIRILI; CENTANNI, 2016).

O ponto de equilíbrio ou relação entre o nível de T4 sérico e de TSH varia significativamente entre indivíduos, sugerindo que exista susceptibilidade genética na resposta dos receptores teciduais. Estados de polimorfismos no gene da Dio2 foram descritos em referência à baixa capacidade de conversão de T4 em T3, que corresponde a inadequada resposta tecidual e do controle no ponto de ajuste (BRENT, 2012).

BÓCIO COLOIDE

Definição e Epidemiologia:

O Bócio colóide (BC), também chamado de bócio nodular (BN), bócio multinodular (BMN) ou bócio adenomatoso (BA) é uma das patologias mais antigas da humanidade, com vários relatos ao longo da história em diversas civilizações, podendo ser endêmico ou esporádico, e se apresentar de tamanho e forma variadas, e, ao longo dos anos, pode chegar a grandes volumes, levando a sintomas cérvico-torácicos compressivos, sendo prioritariamente de tratamento cirúrgico (tireoidectomia parcial ou total) (BOTELHO, 2012).

Na prática clínica, o BC é importante por estar incluso na investigação de nódulos da tireoide, cuja prevalência na população geral vem crescendo nos últimos anos, em torno de 5% em mulheres e 1% em homens, quando se utiliza o parâmetro clínico de palpação, e 19 a 68%, à ultrassonografia de tireoide (USG), com 10% deles ocorrendo aos 20 anos de idade, e 50% nos maiores de 60 anos. Nas áreas com carência de iodo, a prevalência se amplia para 30% e 75% respectivamente, notando que o volume do bócio está diretamente relacionado à idade. A predileção pelo sexo feminino se confirma em achados de autópsias, revelando incidência de 50-90% em mulheres e 50-60% em homens. A USG e a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) são os procedimentos mais importantes no diagnóstico diferencial dos nódulos benignos e malignos (HAUGEN *et al.*, 2016).

Patogenia e Achados Clínicos

Na etiopatogenia do BC, apesar de não se conhecer a sequência de eventos, o processo começa com a proliferação hiperplásica folicular multifocal, seguida pelo surgimento de nódulos que podem ser encapsulados (adenomas) ou não (adenomatoso). Com os anos, o crescimento policlonal hiperplásico pode se associar a áreas de proliferação monoclonal neoplásicas, apresentando ambos padrões de crescimento. O BC ainda pode abrigar formações císticas, sólidas, áreas de fibrose, calcificação e hemorragia intranodular. (KONDO; EZZAT; ASA, 2006).

Na grande maioria dos casos, os portadores de BC inicialmente são assintomáticos, sendo diagnosticados por meio da palpação do pescoço ou da USG. Se apresentam clinicamente como

bócio difuso ou nodular (uni ou multinodular) (Figura 4, A-F), e com o passar dos anos podem alcançar grandes volumes. Em 10-15% dos casos, o BC pode crescer para a região do mediastino, sendo chamado de componente mergulhante. Nos mais volumosos, para melhorar o acesso cirúrgico foi desenvolvida a incisão em “*U de Botelho*” (Figura 4, G e H). Os bócios nodulares podem adquirir autonomia funcional, passando a sintetizar T3 e T4, causando o hipertireoidismo ou ainda podem sofrer transformação maligna anaplásica (3 a 5% dos casos), tornando-se extremamente agressivo e de prognóstico sombrio (PACINI, 2016; BOTELHO; JEZINI; CARVALHO, 2013; VAIMAN; BEKERMAN, 2017).

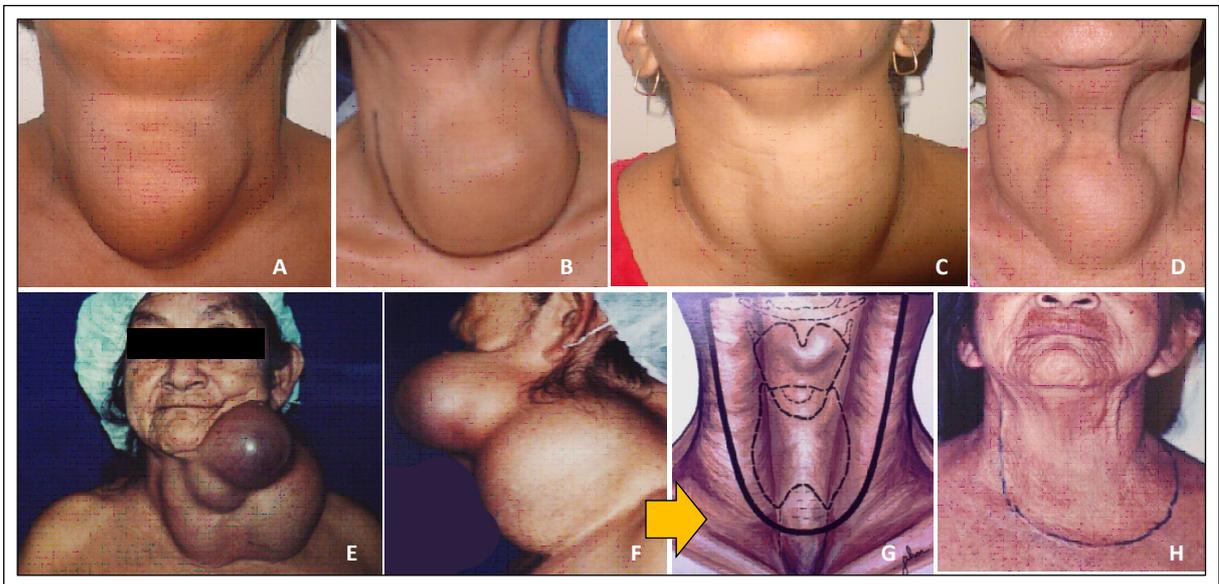


Figura 4. Aspectos Clínicos do Bócio Coloide, com variáveis de bócio nodular (A, B, C e D). Volumoso bócio multinodular (E e F). Incisão cirúrgica em “U de Botelho” para acesso a bócios de grande volume e resultado pós-operatório (H). Fonte: Fotos cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. João Bosco Botelho de acervo pessoal em 2017.

Fatores Etiológicos

Deficiência nutricional de iodo:

A deficiência nutricional de iodo continua a ser o principal fator de risco ambiental para o BC, sendo considerado o principal facilitador da patologia, cujo papel foi bem definido com a redução dramática na incidência do bócio endêmico após a suplementação de iodo no sal em diversos países, inclusive no Brasil (FOUNTOULAKIS; PHILIPPOU; TSATSOULIS, 2007; HOCHMAN, 2010; FIORE; TONACCHERA; VITTI, 2014). Esta medida foi reconhecida como uma das mais relevantes medidas de saúde pública tomadas até hoje.

Conforme a lei, o iodo deve ser suplementado de forma universal, ou seja, em todo sal utilizado na cozinha, agricultura, no manejo de animais e processamento dos alimentos industrializados (DELANGÉ, DE BENOIST, PRETELL, 2004). No entanto, apesar da redução na incidência em muitos países nos últimos 15 anos, o BC ainda é considerado um problema de saúde pública a despeito da suplementação de iodo (ANDERSSON; BENOIST; ROGERS, 2010).

A última avaliação do programa de iodização do sal da Organização Mundial da Saúde (OMS), que incluiu 130 países, em 2006-2007, por meio da excreção urinária (iodonúria) de iodo em escolares, encontrou 266 milhões de indivíduos com deficiência alimentar de iodo distribuídas em 47 países. Entre os suplementados, 49 foram considerados adequados, 27 acima do adequado, e 7 países com valores muito acima do ideal, dentre eles o Brasil (Figura 5) (BENOIST *et al.*, 2008).

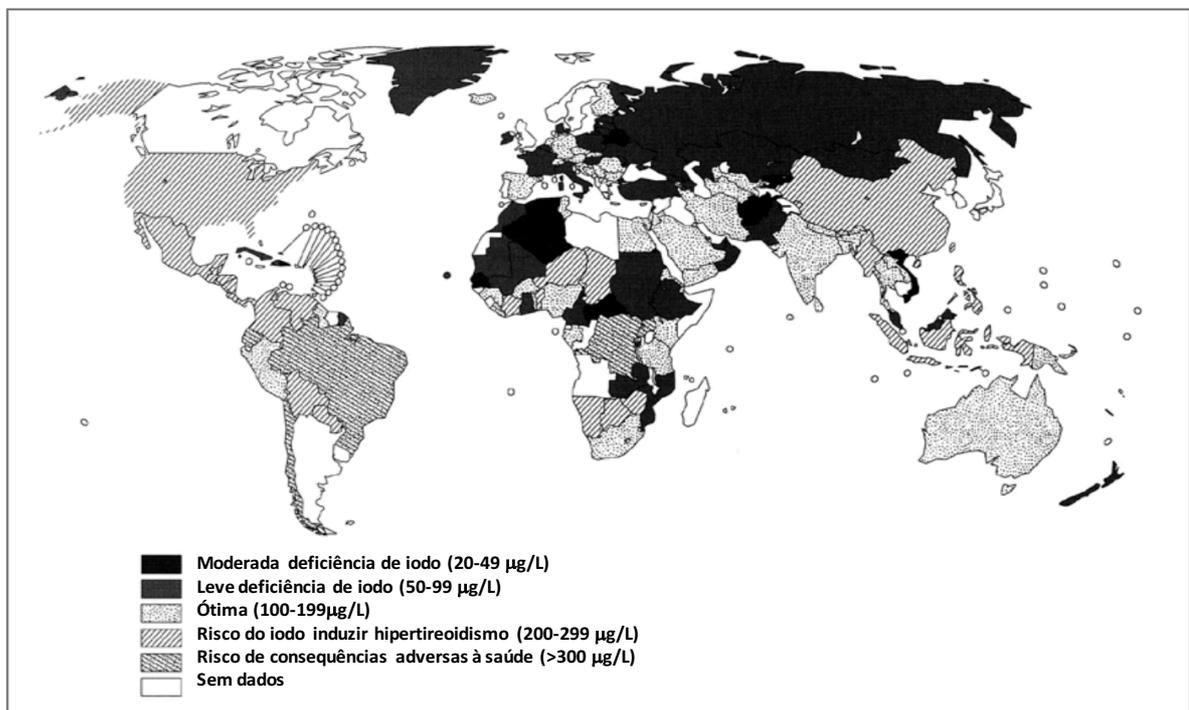


Figura 5: Distribuição geográfica do estado nutricional de iodo na população mundial, com base na excreção urinária média (Adaptado de De Benoist, McLean, Andersson; Rogers, 2008)

Mesmo com todos os esforços para monitorar a magnitude da deficiência de iodo em todo o mundo, os dados de não abrangência ainda são alarmantes, indicando necessidade constante de verificações e estratégias de abordagem, pois a deficiência vem ressurgindo em

alguns países desenvolvidos, e o excesso surgindo em locais em desenvolvimento, colocando em dúvida as propostas de verificação atual da iodo suficiência (LI; EASTMAN, 2012).

Apera do iodo ser 90% excretado pelos rins, existem variabilidades interindividuais, sendo interessante o desenvolvimento de marcadores mais precisos, como a medida da Tg sérica, que pode representar melhor a capacidade de incorporação do iodo, porém necessita ter maior consistência e melhora na padronização metodológica, para que seja utilizada em maior escala (ZHENG; SKEAFF, 2014). Alguns autores ainda consideram a iodonúria um parâmetro falho e pouco específico para a detecção do estado nutricional do iodo, pois a capacidade de excreção do mineral pode ser variável em populações específicas, e com isso, ocasionar dificuldades na precisa definição dos níveis necessários de iodo (SELAMAT *et al.*, 2010).

No Brasil, apesar do programa de iodação universal do sal existir desde 1953, somente 21 anos depois foi definido o primeiro parâmetro para o consumo humano em 10 miligramas (mg) de iodo por quilo (kg) de sal, e mais tarde, baseados no projeto *Thyromobil* desenvolvido na América Latina, o parâmetro foi ajustado para 20 a 60 mg/kg de sal (MEDEIROS-NETO, 2009). Em 2014, evidências do excesso de iodo em escolares brasileiros foi cada vez maior, sendo novamente reduzido para 15 a 45 mg/kg, através de aprovação de consulta pública pela Agencia de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Outros fatores

Na gênese do BC existem vários fatores ambientais e genéticos arrolados, como idade, (maior prevalente em indivíduos mais velhos) e sexo (ocorrência de 5 vezes ou mais em mulheres). Apesar desta disparidade não ter explicação definida, estudos utilizando dosagens de 17β -estradiol (E2) demonstraram ter interferência direta, via amplificação de fatores de sinalização do crescimento da tireoide normal, como também com a participação na gênese de nódulos benignos e malignos da tireoide (MANOLE *et al.*, 2001).

Mais recentemente, autores documentaram em linhagens de células da tireoide normais e com câncer expostas ao E2 “*in vitro*”, aumentam a propriedade de desenvolver metástases, adesão celular, migração e invasividade. No entanto, curiosamente “*in vivo*”, o uso de contraceptivos orais a base de E2, pareceu ter efeito contrário ou protetor, por estar associado à diminuição na incidência de BC. Já a gravidez e parto são implicados na elevação do risco, provavelmente devido a fatores placentários (MOLETI *et al.*, 2017).

Na menopausa, período em que ocorre a redução brusca dos hormônios sexuais (estradiol e progesterona), aumenta consideravelmente a incidência da maioria das doenças tireoidianas, incluindo o BC e o câncer (GIETKA-CZERNEL, 2017).

Alguns alimentos têm participação em potencial na gênese do BC, dentre estes, se destacam os alimentos ricos em flavonoides que atuam inibindo a TPO, como exemplo está o tiocianato, substância proveniente da fermentação da *cassava*, uma espécie de mandioca utilizada como farinha de mesa em diversas regiões da África e, de forma semelhante na Amazônia, e outro alimento muito citado é o óleo de babaçu, amplamente usado na culinária do nordeste brasileiro (MEDEIROS-NETO, 1998).

O tabagismo é outro fator ambiental que pode acentuar a prevalência do BC em áreas carentes de iodo, sem significância nas regiões não carentes (ITTERMANN *et al.*, 2008).

Outro fator implicado é o índice de massa corpórea (IMC), que parece ser mais um dos fatores geradores de bócio ou bociogênicos, sendo observado um aparente decréscimo no volume da tireoide após perda de 10% do peso em mulheres (SARI *et al.*, 2003).

A resistência à insulina (RI) e a síndrome dos ovários policísticos (SOP) decorrentes da obesidade e do sedentarismo, vêm sendo consideradas como fatores de risco ligados tanto ao surgimento de nódulos, como ao aumento no volume da tireoide, mas são dependentes da idade, do IMC, da glicemia, insulina de jejum, e do HOMA-IR (*homeostatic model assessment*), por possível efeito mitogênico exercido pela insulina sobre os tireócitos, observado em pesquisa “*in vitro*” (KARAKÖSE *et al.*, 2017).

A susceptibilidade genética parece estar envolvida na gênese do BC, com mutações pontuais sendo descritas em grupos familiares isolados, provavelmente influenciando na variação interindividual de volume e heterogeneidade do parênquima. Contudo, a interação de genes e fatores ambientais, genes e genes, e das mudanças no efeito ambiente e o ambiente, ainda não estão totalmente elucidados (KNUDSEN; BRIX, 2014).

Os fatores locais podem contribuir com o crescimento e modificação tecidual do BC, muitas vezes formados por proteínas que já fazem parte de sinalizações celulares necessárias ao crescimento, sobrevivência, migração, diferenciação e apoptose, que por motivos ainda pouco esclarecidos, sofrem modificações e perdem a capacidade de regulação (WARD, 2012).

Mutações genéticas descritas no Bócio Coloide

A tireoide é uma glândula exposta dez vezes mais a mutações espontâneas que qualquer outra região do corpo. As mutações constitutivas em genes que intermediam o processo de sinalização mediada por AMP cíclico (AMPC), que estão relacionadas ao crescimento, nodularidade e autonomia funcional tireoidiana, como as mutações somáticas ativadoras em códons da proteína $G_s\alpha$, no receptor de TSH (TSHR), e em oncogenes como o *RAS* já foram descritas no BC de regiões endêmicas, provavelmente resultantes do processo de oxidação tecidual por radicais livres, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de espécies reativas de oxigênio (ROS), que possivelmente induzem à heterogeneidade do parênquima (KROHN *et al.*, 2005).

Estudos experimentais em camundongos geneticamente modificados com deficiência da *Conexina 32* (Cx32), proteína responsável pela comunicação direta entre as células e que regula negativamente o crescimento e diferenciação do tecido através da via do AMPC, mostrou que a ausência de Cx32 exerce influência negativa na resposta das células da tireoide na presença de dois oncogenes indutores de hipertrofia e transformação tecidual presentes em 20 a 40% dos cânceres papilíferos da tireoide esporádicos e 70% dos induzidos por radiação, o oncogene *E7* (oncoproteína viral derivada do papilomavírus humano) e o *RP3* (rearranjo *RET/PTC*), cujo oncogene *E7* perdeu parte da capacidade de induzir hipertrofia e o *RP3* de induzir transformação tecidual nos deficientes de Cx32 (BURNIAT *et al.*, 2008; PROST *et al.*, 2009).

Mutação de linhagem germinativa R483H no gene da proteína associada ao *KEAP1*, relacionada ao risco do aparecimento de múltiplos nódulos não tóxicos da tireoide foram documentadas em casos de BC familiar (NISHIHARA *et al.*, 2016).

Na síndrome do DICER1, desordem hereditária que aumenta o risco de desenvolver neoplasias malignas ou benignas, principalmente de pulmão, rins, ovários e tireoide, cuja origem está na mutação no gene de processamento de miRNA, que apresenta mutação sequencial na RNase IIIb no outro alelo *DICER1*, leva à proliferação monoclonal, e pode aumentar a formação de nódulos tireoidianos (DE KOCK *et al.*, 2016).

Hipótese de transformação nodular do BC

Hipoteticamente, o BC inicia-se pela hiperplasia da glândula tireoide causada pelo estímulo gerado pela deficiência de iodo. Em seguida, devido à variação na resposta dos receptores de TSH dos tireócitos ou sensibilidade ao TSH das células, que ocorre com a

persistência da carência iódica ao longo do tempo, o crescimento passa a ser heterogêneo, com propensão às irregularidades nodulares, passando o crescimento a ser independente da ação do TSH. O tecido passa então a apresentar maior produção de radicais livres e produtos da oxidação tecidual via peróxido de hidrogênio (H_2O_2 /radicais livres) que associado ao avanço das replicações celulares, ampliam os riscos de mutações somáticas no receptor do TSH (TSHR), como também a divisão e proliferação de clones celulares heterogêneos pode gerar nódulos com autonomia funcional ou aumentar a capacidade da célula de se desdiferenciar para malignidade (Figura 6) (KNOBEL, 2016).

Hipótese de Transformação Nodular Tireoidiana

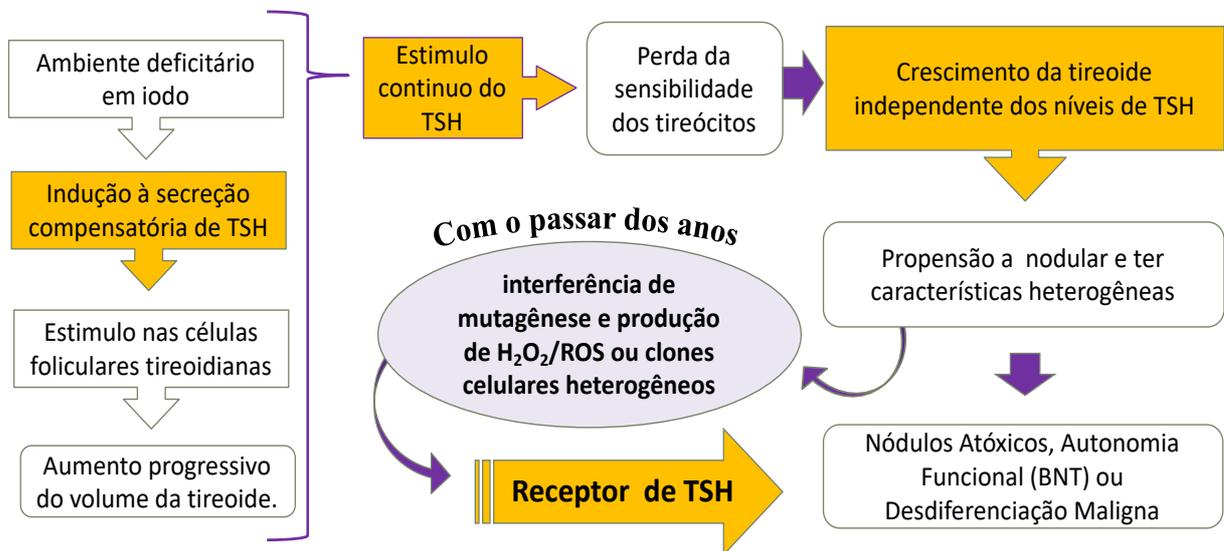


Figura 6: Representação esquemática da hipótese de transformação nodular tireoidiana, sendo o ponto de partida a deficiência do iodo, com conseguinte hiperplasia e posterior formação de nódulos decorrentes da exposição ao aumento no número de replicações e mutagênese direta (por produção de H_2O_2 /ROS) ou indireta (proliferação e aumento do número de clones heterogêneos). Os clones celulares quando perdem a sensibilidade ao TSH por mutações somáticas no receptor de TSH (TSHR), fazem surgir nódulos atóxicos, com autonomia funcional (adenoma tóxicos) ou se desdiferenciam para malignidade – Adaptado com modificações de knobel, 2016.

Epigenética

O termo epigenética, originalmente introduzido em 1942, quando Conrad Waddington verificou que mudanças fenotípicas aparentemente adaptativas ocorriam na prole de drosófilas expostas à luz continuamente, sendo estes traços não mais herdados após cessação do referido estímulo, ou seja, as mudanças na expressão de genes induzidas pelo ambiente aparentavam ser de forma reversível e herdável, sem contudo representar mutação genética. Desde então, a epigenética foi anunciada como a nova forma de herança do DNA, pelo fato da regulação da atividade e expressão gênica do indivíduo não depender somente da sequência herdada pelo DNA (JABLONKA; LAMM, 2012).

No contexto fisiológico das células somáticas, uma das mais relevantes participações da epigenética é a organização da cromatina e repressão de elementos transponíveis, cujo reflexo é direto no estímulo ou na inibição da atividade gênica. Na cromatina ativa ou Eucromatina, o gene está acessível à atividade transcricional, e na cromatina reprimida ou Heterocromatina, a que impede a acessibilidade aos nucleossomos e induz a repressão gênica (ALLIS; JENUWEIN, 2016).

Ao longo dos tempos, a epigenética vem contribuindo na elucidação de complexos mecanismos integrados do equilíbrio genético, revelados em várias condições e na relação direta entre a ocorrência e a expressão gênica, reafirmando a possibilidade da reprogramação do genoma em condições fisiológicas ou patológicas (HOLLIDAY, 2006; BOHACEK; MANSUY, 2013).

As modificações epigenéticas podem ser decorrentes da exposição ambiental direta ou provenientes do estresse físico ou psicológico (SECCO *et al.*, 2015), variar conforme a ingestão de nutrientes, capazes de modificar a expressão gênica órgão dependente, levando à proteção ou aumento no risco de desenvolver doenças (ERICKSON; MOREAU, 2016; BISHOP; FERGUSON, 2015).

A herança da expressão gênica influenciada pela epigenética gera o chamado epigenoma, ou seja, o conjunto de mudanças epigenéticas que ocorre num genoma, que tem como objetivo tornar o genoma mais eficiente para os descendentes, como descrito na transmissão do traço da resistência insulínica herdado por três gerações seguidas de mulheres

subnutridas, sobreviventes da fome do inverno holandês durante a Segunda Guerra Mundial, aparentemente para melhorar a eficiência na utilização de nutrientes e preservar a espécie (SCHULZ, 2010). Além disso, existem interferências indiretas geradas pela qualidade da alimentação de animais que contribuem para a formação ou colonização da microbiota intestinal, corresponsáveis pela saúde do hospedeiro (KRAUTKRAMER *et al.*, 2016).

O consumo do álcool, tabaco ou de drogas ilícitas é descrito como causadores de modificações epigenéticas e responsáveis por vários tipos de câncer (pulmão, esôfago, estômago e laringe) (WANG *et al.*, 2017). Embora não se conheça totalmente como as modificações epigenéticas são induzidas pelo tabaco no câncer de pulmão, as variáveis de gravidade e invasão metastática são diretamente relacionadas (LIN *et al.*, 2011).

Estudos experimentais realizados no início da formação fetal e período neonatal de ratos revelaram a existência de modificações epigenéticas diretamente nos tecidos metabólicos da prole, relacionadas ao comportamento e qualidade de nutrientes ingeridos pela mãe, que favoreceram o surgimento de doenças metabólicas crônicas (Diabetes e doença cardiovascular) na vida adulta, sendo promissora a possibilidade da intervenção precoce, por meio de mudanças no epigenoma materno, e no consequente fenótipo de risco no futuro (GODFREY; COSTELLO; LILLYCROP, 2015).

Regulação genética e epigenética

A transcrição gênica é regulada a partir da sequência genômica da cromatina, complexo macromolecular de DNA e histonas. O DNA é dobrado sobre as proteínas histonas e não-histonas, formando os nucleossomos (massa molecular de 206K) ou a base para o genoma, sujeito a vários processos integrados que podem ou não permitir o acesso ao DNA, seja por meio da ativação da região promotora e atuação da RNA Polimerase II (Pol II), dos mediadores dos fatores de transcrição ou via micro RNAs (mRNA), que se reorganizando de maneira contínua (RICHMOND *et al.*, 1997; JERONIMO; ROBERT, 2017).

O nucleossomo ou unidade da cromatina é composto por 147 pares de bases (pb) de DNA, enrolado em torno de um octâmero, compostos por duas moléculas de proteínas histonas denominadas H2A, H2B, H3 e H4, que compartilham um domínio estrutural comum, a chamada dobra da histona com 3 hélices: α_1 , α_2 e α_3 separadas por dois laços: L1 e L2, que facilitam a heterodimerização de H2A com H2B e H3 com H4, além de 2 domínios (domínio

globular e domínio N na cauda terminal), sendo interligadas pela histona H1 (VENKATESH; WORKMAN, 2015).

A cromatina, com base na compactação, pode ser subdividida em heterocromatina ou eucromatina, sendo a eucromatina menos condensada, mais acessível e facilmente transcrita, enquanto que a heterocromatina é altamente condensada e inacessível. Ambas dependem de fatores que se integram, como a localização cromossômica ou nuclear, presença e densidade de elementos repetitivos de DNA (clusters de sequências de satélite e elementos transponíveis), controlando os elementos repetitivos do DNA, e com isso, protegem a integridade do genoma (GREWAL; JIA, 2007).

Os fatores de transcrição envolvidos na genética e epigenética, que basicamente dependem da sequência genômica, podem ser regulados de forma reversível ou irreversível. As modificações definitivas ou irreversíveis sofridas por um gene são chamadas mutações genéticas (Figura 7A), e as mudanças reversíveis na expressão da cromatina, de modificações epigenéticas, sendo que em ambas interagem e podem ser herdáveis por gerações (Figura 7) (ESPADA; ESTELLER, 2013).

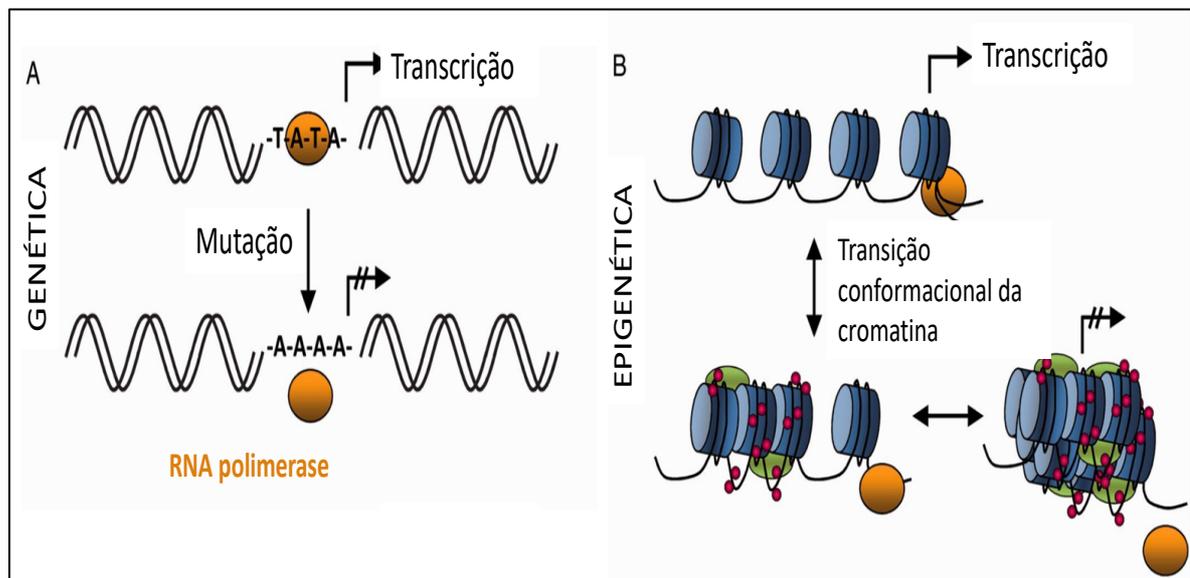


Figura 7. Regulação genética (A) e epigenética (B). Fonte: Adaptado de Espada & Esteller, 2013

Na regulação epigenética, as mudanças na transcrição gênica podem ocorrer em qualquer estágio da vida, de maneira reversível ou não, através de diversas vias moleculares e

interfaces com outros níveis regulatórios, incluindo as modificações de DNA e de histonas, os RNAs não codificadores (ncRNA), e nos complexos de Polycomb e Trithorax, que são proteínas regulatórias da programação e diferenciação genômica, que atuam de maneira oposta e sincrônica, como um “interruptor epigenético binário”, nos genes homeóticos (Hox), desempenhando papel central no controle do desenvolvimento e diferenciação de tecidos embrionários (SCHWARTZ; PIRROTTA, 2008; RODRÍGUEZ-RODERO *et al.*, 2014).

Interações são constantes entre o genoma e o epigenoma, definidas por reações químicas complexas, que modificam a expressão da cromatina, a partir da informação genética e da percepção dos estímulos externos provenientes do ambiente (agressão), gerando mudança no fenótipo. Estas mudanças ocorrem por meio de mecanismos epigenéticos (metilação de DNA, modificações de histonas, posicionamento dos nucleossomos e interação entre eles), mediadas por “sensores” que correspondem as enzimas metiltransferases de DNA (DNMT), Acetiltransferases de histonas (HATs) e as desacetilases de histona (HDACs) (Figura 8) (PORTELA; ESTELLER, 2010).

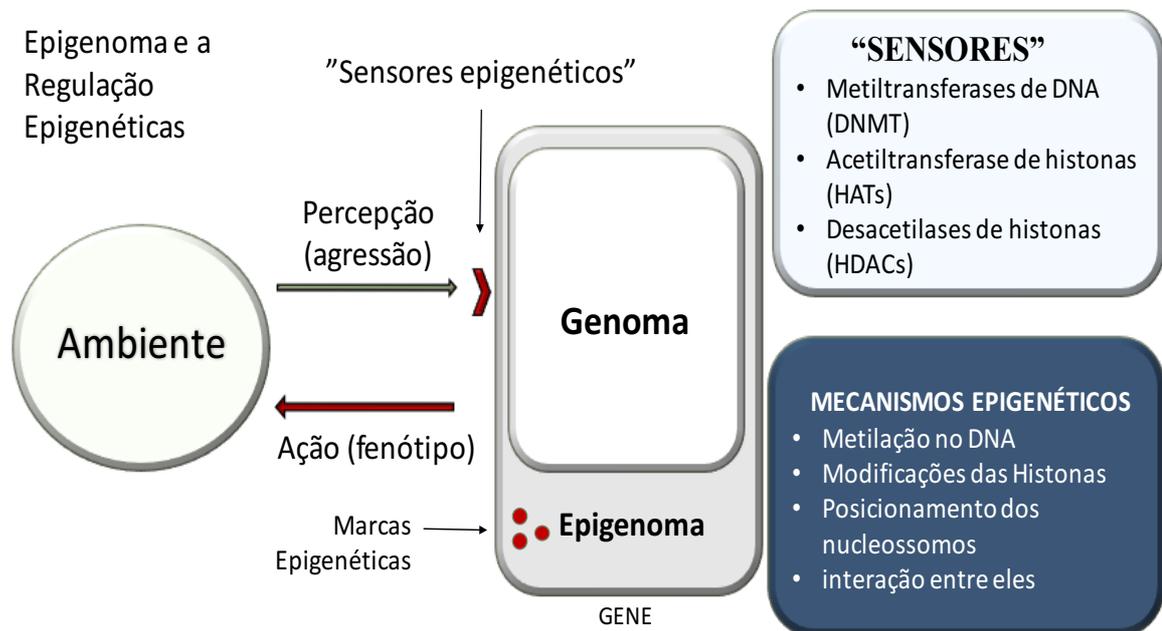


Figura 8: Genoma e epigenoma e seus mecanismos de regulação. Fonte: Jezini, DL baseado em informações obtidas de Esteller, 2010.

O silenciamento de um gene pode ser revertido de duas formas, ativa, através da desmetilação da DNA, com a substituição enzimática da 5-metilcitosina (5mC) pela C, através da catalisação pela TET1-tet metilcitosina dioxigenase 1 ou 5mC hidroxilase, com capacidade para converter 5mC num processo de oxidação, reação que gera outros intermediários (5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxilcitosina (5caC), ou de forma passiva, por reação oxidativa e inibição da DNMT1, metiltransferase de manutenção, que impede determinada marca epigenética de ser transmitida (ALLIS; JENUWEIN, 2016).

Atualmente, evidências sugerem que a regulação genética e epigenética atuam em parceria e de forma integrada, necessárias ao desenvolvimento e evolução das espécies, sendo a regulação genética controlada finamente pela epigenética, justificada pelo fato de que a hipermetilação das ilhas CpG geram compactação da cromatina e a desmetilação retorna ao estado de eucromatina. Portanto, enquanto a via genética determina a supressão de um gene de forma irreversível, a epigenética se manifesta como uma forma mais sutil, gradual e progressiva de inativação de genes, e que pode ser revertida (MOCHIZUKI *et al.*, 2017)

Mecanismos epigenéticos

Os mecanismos mais comumente estudados na epigenética ocorrem principalmente por meio das modificações no DNA e nas histonas, que constituem alterações bioquímicas complexas, relativas ao controle molecular da expressão gênica, de forma transitória ou permanente, isolada ou simultânea. Atualmente, são descritas quatro modificações do DNA (BAYLIN; JONES, 2011; WU; ZHANG, 2011) e 16 classes de modificações de histonas (TAN *et al.*, 2011).

Os domínios que ambas modificações epigenéticas utilizam, podem ser únicos e específicos ou bivalentes, chamados de leitores de cromatina, que por sua vez, podem recrutar outros modificadores de cromatina e estruturas de remodelação, para que sirvam de efetores da modificação, alguns ainda sem definição funcional esclarecida (Tabela 1, p. 43) (DAWSON; KOUZARIDES, 2012).

Tabela1. Tabela das modificações na cromatina, leitura e funções atribuídas.

Modificação da cromatina	Nomenclatura	Motif leitor da cromatina	Função atribuída
Modificação do DNA			
5-metilcitosina	5mC	domínio MBD	transcrição
5-hidroximetilcitosina	5hmC	desconhecido	transcrição
5-formilcitosina	5fC	desconhecido	desconhecido
5-carboxilcitosina	5caC	desconhecido	desconhecido
Modificação das histonas			
Acetilação	K-ac	Bromo domínio <i>Tandem, PHD fingers</i>	transcrição, reparo, replicação e condensação.
Metilação (lisina)	K-me1, K-me2, K-me3	Cromo domínio, domínio <i>Tudor</i> , MBT, PWWP, <i>PHD fingers</i> , WD40/□□hélice	transcrição e reparo
Metilação (arginina)	R-me1, R-me2s, R-me2a	Domínio <i>Tudor</i>	transcrição
Fosforilação (serina e treonina)	S-ph; T-ph	14-3-3, BRCT	transcrição, reparo e condensação
Fosforilação (tirosina)	Y-ph	SH2 ^a	transcrição e reparo
Ubiquitilação	K-ub	UIM; IUIM	transcrição e reparo
Sumoilação	K-su	SIM ^a	transcrição e reparo
ADP-ribosilação	E-ar	Macrodomínio; domínio PBZ	transcrição e reparo
Deaminação	R-> Cit	desconhecido	transcrição e descondensação
Isomerização em prolina	P-cis <-> P-trans	desconhecido	transcrição
Crotonilação	K-cr	desconhecido	transcrição
Propionilação	K-pr	desconhecido	desconhecido
Butirilação	K-bu	desconhecido	desconhecido
Formilação	K-fo	desconhecido	desconhecido
Hiroxilação	Y-oh	desconhecido	desconhecido
O-GlcNAcilação (serina e treonina)	S-GlcNAc; T-GlcNAc	desconhecido	transcrição

Modificações: me1, monometilação; me2, di-metilação; me3, trimetilação; me2s, di-metilação simétrica; me2a, di-metilação assimétrica; e Cit, citrulina. Domínios leitores: MBD, domínio metil-CpG de ligação; PHD, homeodomínio de plantas; MBT, domínio tumor cerebral maligno; PWWP, domínio prolina-triptofano-triptofano-prolina; BRCT, domínio BRCA1 de término; UIM, motif ubiquitina de interação; IUIM, motif ubiquitina de interação invertido. Fonte: adaptado de Dawson e Kouzarides, 2012.

Epigenoma

O epigenoma é a interface entre o genoma e o ambiente, refletindo diretamente as marcas epigenéticas adquiridas no decorrer da vida de um indivíduo, de forma dinâmica e

ajustável e podendo ser herdável. Dentre as modificações presentes no epigenoma estão a metilação do DNA e as modificações da cromatina, ambas oriundas das respostas às agressões ambientais, que podem ficar como marcas que perduram por períodos curtos ou longos, ou seja silenciamento ou ativação gênica de caráter permanente ou transitório (WU; ZHANG, 2013).

A interação do indivíduo com o ambiente deve sempre ser levada em consideração, pois o fenótipo de determinado traço pode ser moldado a partir de demandas externas, ou seja, induzidos por fortes interferências ambientais e pela ação de genes que cooperam entre si num processo fisiológico para expressar um fenótipo específico, demonstrando a inter-relação entre o genótipo e o fenótipo, sendo possível a leitura molecular de um determinado indivíduo a partir do ambiente onde se encontra, representando o “endofenótipo”, que pode ainda ser modificado a partir de outros fatores ambientais de interferência, como demonstrado em pesquisa em mamíferos de grande porte (Figura 9) (TE PAS *et al.*, 2017).

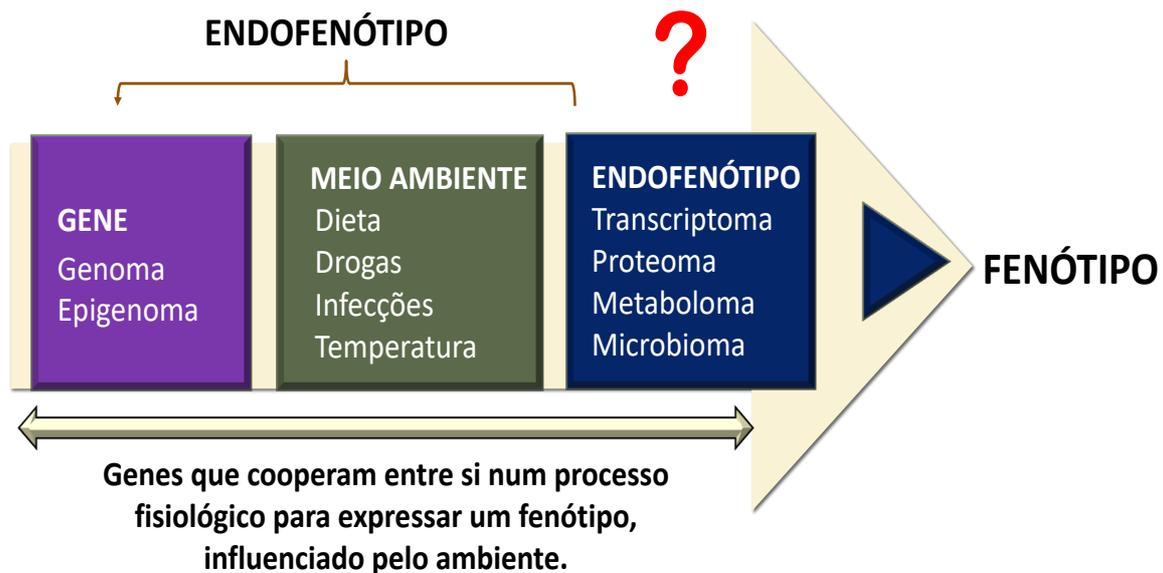


Figura 9: Formação do endofenótipo e consequente fenótipo externo.
Fonte: Modificado e adaptado de Te Pas *et al.*, 2017

Modificações Epigenéticas

Metilação do DNA

A metilação do DNA é a alteração epigenética mais bem descrita em eucariotos de grandes genomas (vertebrados, plantas e alguns fungos). Nas células somáticas dos mamífero, a metilação do DNA ocorre geralmente na região promotora do gene, onde a citosina está

imediatamente na posição 5' para a guanina, ligada por um grupo fosfato, distribuída em cluster no final do gene, conhecidas como ilhas CpG, onde causa nesta o silenciamento da transcrição gênica (hipermetilação) ou ativação gênica (hipometilação), independente da sequência genômica, presente fisiologicamente no *imprinting* genômico, na inativação do cromossoma X paterno e no silenciamento de transposons (GOLL; BESTOR, 2005; GODFREY; COSTELLO; LILLYCROP, 2015; GALUPA; HEARD, 2015).

A metilação do DNA é um processo químico reversível que envolve a adição covalente e simétrica do grupo metilo ($-CH_3$), proveniente da S-adenosilmetionina (SAM), à cadeia lateral do carbono da citosina da posição 5 do DNA, gerando a 5-metilcitosina (5-mC). No entanto, como nem toda zona CpG permite ser metilada, em cada tecido existem padrões próprios de metilação, preservados durante a replicação do DNA, num elegante mecanismo de herança do silenciamento transcricional catalisado pelas enzimas metiltransferases de DNA (DNMTs), conhecidas como DNMT1, DNMT2, DNMT3L, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3C (somente em roedores) (RAVICHANDRAN; JURKOWSKA; JURKOWSKI, 2018).

As DNMTs têm participação direta em cada ciclo de replicação do DNA, a DNMT1 catalisando a re-metilação do DNA ou a manutenção da metilação, e as DNMT3A e DNMT3B definindo o padrão original da metilação do DNA, sendo consideradas *de novo* MTases, pois metilam o DNA, independente da metilação da outra cadeia de DNA, consideradas marcas da atividade das enzimas DNMT3 (Figura 10) (TUREK-PLEWA; JAGODZIŃSKI, 2005).

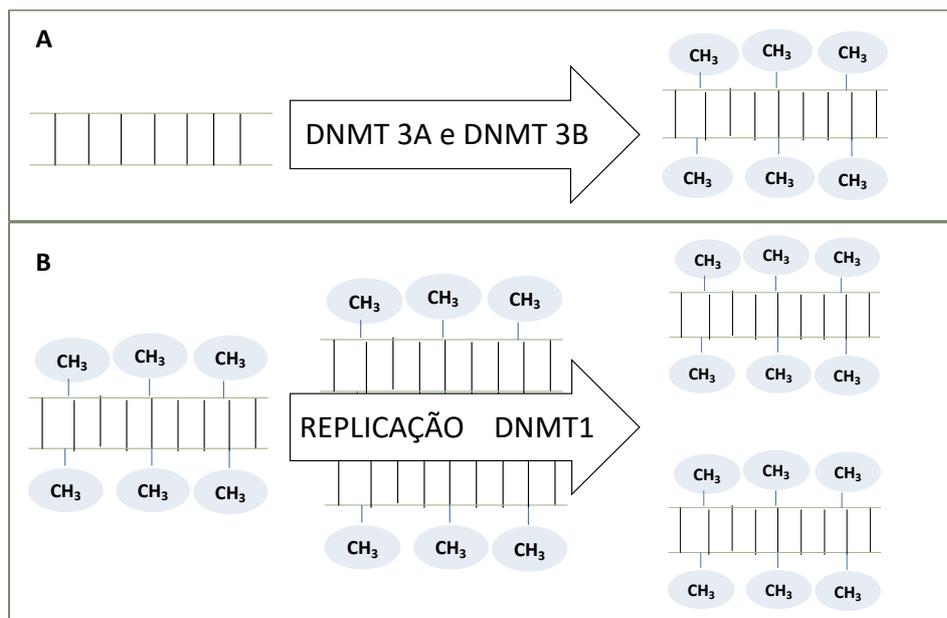


Figura 10: Os tipos de DNA metiltransferases, divididas em *de novo* (A) e de manutenção (B). Fonte: Modificado e adaptado de Turek-Plewa; Jagodziński, 2005.

Em humanos, a metilação do DNA é responsável pela diferenciação das células tronco embrionárias ou estaminais e defesa contra as células modificadas pelo câncer, sendo importante na expressão de genes e inativação transcricional de elementos transponíveis (transposons) (JAENISCH; BIRD, 2003), além do propósito de melhorar a estabilização e proteção do genoma (LEVIN; MORAN, 2011).

A metilação e a metilação *de novo* podem ser geradas para prevenir danos permanentes no DNA ou reduzir o “ruído transcricional” de transposons que podem carrear promotores funcionais (BIRD, 2002), ou manter inativos os retrotransposons de origem viral, presentes em 40% do genoma humano, e participa ativamente da vigilância imunológica e detecção de patógenos não metilados, por ativação da resposta das células imunes aos DNA virais, mais suscetíveis à metilação e ao reconhecimento imunológico (HOELZER; SHACKELTON; PARRISH, 2008).

A metilação do DNA é evidenciada logo após a fecundação e antes do implante do blastocisto, quando as principais marcas do genoma herdadas dos pais, com algumas exceções, são eliminadas, seguidas por atividades de metilação *de novo* dentro da massa celular interna, independentes da sequência genômica, controladas por sequências repetidas, interação de RNA e DNA ou metilação de histonas (DHE-PAGANON; SYEDA; PARK, 2011). No entanto, os mecanismos moleculares da dosagem e compensação entre os cromossomas X e os autossomos, bem como a diferença entre os sexos, ainda permanecem desconhecidos (SCHULZ; HEARD, 2013).

Como a metilação do DNA é reversível, a dinâmica de metilação e desmetilação que funcionam em equilíbrio de modo bidirecional durante a diferenciação celular é regulada ao longo do desenvolvimento de certos tecidos adultos, seja precoce ou tardio, pelos “editores de metilação do DNA”, que atuam na inativação das metiltransferases de DNA (DNMTs), na família TET de três hidroxilases de 5mC, que geram 5hmC (e outros intermediários oxidados), a partir de 5mC da família de desaminases AID / APOBEC, onde iniciam o processo ativo de desmetilação por desaminação de 5mC ou 5hmC, gerados também pela TET e pela família das glicosilases de BER, responsáveis pelo início do reparo do DNA, e culminam com a substituição de citosinas metiladas por não metiladas (BHUTANI; BURNS; BLAU, 2011).

Alguns genes supressores de tumores podem sofrer metilações aberrantes (hipermetilação) ou hipometilação nas ilhas CpG do DNA genômico, e consequente ativação

ou silenciamento do potencial mitótico e da apoptose celular, descontrole no crescimento e proliferação tecidual, como também progressão, agressividade e capacidade de invasão local e à distância, correspondendo provavelmente às variáveis de metilação ocorridas nas sequências repetitivas do DNA, que geraram a instabilidade genômica e o comportamento celular modificado comumente encontrados no câncer (ESTELLER, 2008).

Modificações de histonas

Nos processos biológicos, as histonas participam diretamente da estrutura geral da cromatina, onde são responsáveis pela remontagem do nucleossomo na região promotora interrompida na ocasião da transcrição, e na regulação da expressão do DNA, de forma positiva ou negativa, atuando por meio de remodeladores e modificadores de cromatina (acetilação, metilação e ubiquitilação), das histonas chaperonas Asf1 e HIRA e pelos fatores de transcrição, Pol II e basal. Na região codificadora ou co-transcricional, o remodelador de cromatina é o complexo INO80 ou *inositol-requiring protein 80* e os modificadores são a metilação e ubiquitilação das histonas, as histonas chaperonas são as Spt6, FACT e HIRA, o elongador Pol II e as modificações CDT (*carboxy-terminal domain*) (VENKATESH; WORKMAN, 2015).

Metilação e acetilação são as modificações das histonas mais amplamente estudadas por terem correlação expressiva com a transcrição gênica. A metilação, referida pela adição do grupo metilo ($-CH_3$) ao grupo amino dos resíduos específicos de lisina (K) ou arginina (R) da cauda da histona, mediada pelas enzimas metiltransferases de histona (HMT) é associada principalmente ao silenciamento gênico. Além disso, a quantidade de grupos metil adicionados (mono-, di- ou trimetil) é que define a atividade do processo, como na trimetilação da histona 3 na lisina 4 (H3K4me3), que é ligada à zona promotora ou eucromatina, e na trimetilação da mesma histona, mas nas lisinas 9 e 27 (H3K9me3, H3K27me3) contribui para a supressão ou heterocromatina, podendo ser reversível através da ação de desmetilases (CHEN et al., 2015).

A acetilação das histonas ou adição do grupo acetil ($-COCH_3$) na cauda da histona, está relacionada a descompactação da cromatina ou acessibilidade a remodeladores e fatores de transcrição, sendo catalisada pela acetiltransferases de histonas HATs, e equilibrada pelas desacetilases de histonas (HDACs) que removem o grupo acetil da histona. As HDACs são classificadas em quatro classes, a I, II e IV zinco-dependente e a classe III NAD-dependente. A HDAC I é nuclear e amplamente expressa, e a II (núcleo e citoplasma) e a IV (nuclear)

apresentam relação tecido dependente, ressaltando que pesquisas estão cada vez mais voltadas na busca de inibidores das HDACs com o propósito do tratamento de doenças, principalmente do câncer (MINUCCI; PELICCI, 2006)

A metilação da H3 ocorre em quatro resíduos de lisina (K) N-terminal, K4, K9, K27 e K36, e em dois estruturais K56 e K79, sendo as metilações das histonas H3K4, H3K36 e H3K79, na grande maioria, ligadas à genes ativados, e as da H3K9, H3K27 e H3K56 associadas ao silenciamento gênico, e remoção das marcas das lisinas é feita pelas desmetilases específicas LSD1 (ou KDM1A) e LSD2 (ou KDM1B), que consistem em cofatores de flavina adenina dinucleotídeo (FAD), que são fundamentais para reversibilidade e modulação, ou através da desmetilase de domínio JumonjiC (JmjC), que atua nas histonas com qualquer metilação, via oxigenase, depende do α -cetoglutarato (α -KG), Fe e oxigênio molecular como cofatores. Esta sintonia entre as diferentes modificações da histona 3 e 4 é referida como o “código das histonas” ou “*crosstalk*” (Figura 11) (LABBÉ; HOLOWATYJ; YANG, 2014).

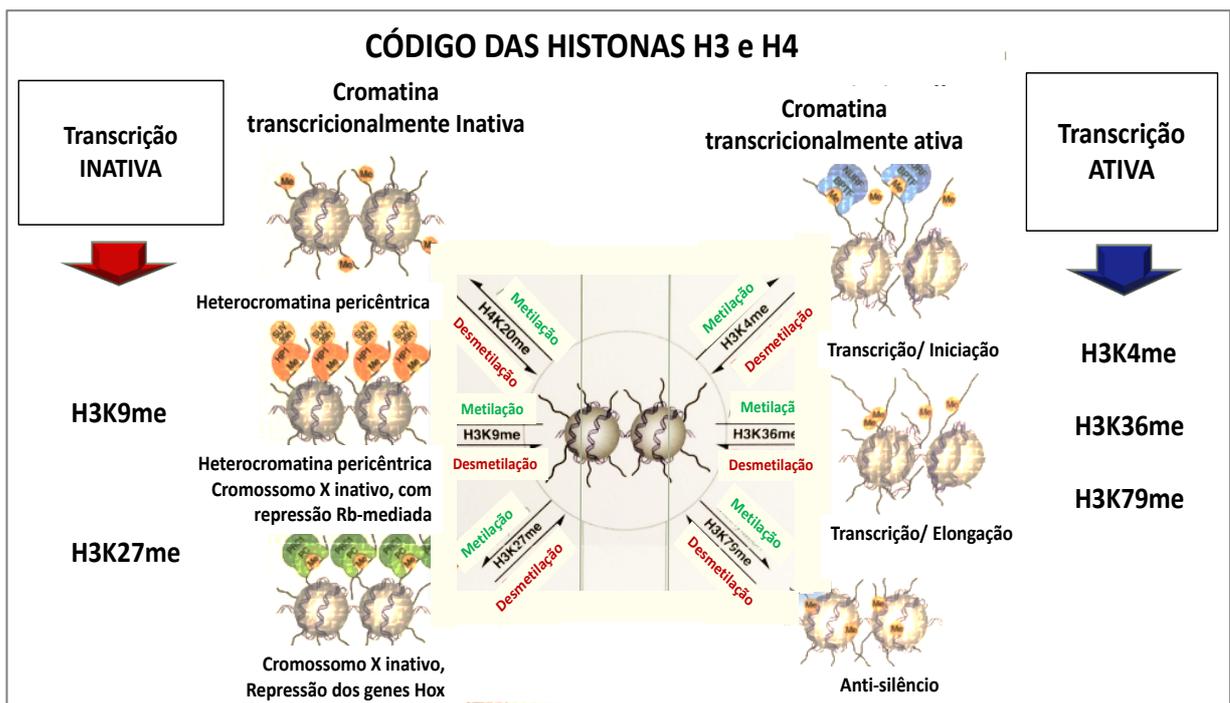


Figura 11. O código das histonas, com as principais histonas conhecidas e suas respectivas atividades na cromatina. Extraído e adaptado de *Cell Signaling Technology, 2002-2015*.

A quantidade de grupo metil agregado às histonas influencia grandemente na atividade que desempenha, podendo ser mono-, di- ou trimetilada, que na grande maioria está relacionado à supressão gênica, podendo coexistir ou não de forma interativa com outras modificações nas

histonas, podendo influenciar inúmeras atividades celulares num processo dinâmico e complexo (DAWSON; KOUZARIDES, 2012).

Nos diversos tecidos humanos e em todos os tipos de células, as modificações das histonas são altamente variáveis e de acordo com as mudanças na atividade transcricional, onde podem também diferir de acordo com as características do pico de início de transcrição (TSS) e do término da transcrição (TTS), como documentado nas histonas H3K9ac, H3K4me1, H3K27me3 e H3K36me3, principalmente quando agregadas ao sítio CpG TSSs (ENCODE CONSORTIUM, 2012).

Relação da metilação do DNA e das histonas

A interação entre os dois principais mecanismos epigenéticos, a metilação do DNA e as diferentes modificações das histonas é crucial no desempenho da expressão gênica. Os mecanismos exatos que norteiam esta comunicação ainda não são totalmente esclarecidos, parecendo ser independentes e decorrentes das condições envolvidas. O silenciamento gênico pode iniciar pela metilação do DNA ou pela desacetilação das histonas, observada claramente na tumorigênese ou gênese de tumores, cujas mutações podem ocorrer como efeito secundário devido à inativação de genes de reparo do DNA (VAISSIÈRE; SAWAN; HERCEG, 2008).

Na grande maioria, a metilação do DNA ocorre na zona promotora ou ilhas CpG, e das histonas nos resíduos de lisina, arginina e histidina, que pode estar relacionada à ativação da transcrição, dependendo da quantidade de grupo metil agregado nas lisinas e da simetria dos grupos nos resíduos de arginina, como exemplo a metilação das histonas H3K4, H3K36 e a H3K79 são relacionadas à ativação da transcrição, enquanto a metilação da H3K9 e H3K27 e histona 4 na lisina 20 (H4K20) estão associadas ao silenciamento gênico (ALBERTS, 2015).

A relação de interdependência da metilação do DNA e das modificações de histonas no processo da modulação da transcrição, manutenção e regulação do genoma em mamíferos é imprescindível, como também a participação das enzimas histona-desacetilases e histona lisina-metiltransferases. Com as atividades de desacetilação, metilação e consequente ativação ou compactação de genes, algumas modificações são necessárias para que outras se processem, como a trimetilação das histonas H3K4 e H3K27 e a exclusão da metilação da H3K36 para manter a não metilação da ilha CpG do DNA, como também, as modificações específicas nas

histonas H3K4, H3K9 trimetilada (H3K9me3) e H3K36me3 que direciona a metilação do DNA durante a replicação (ROSE; KLOSE, 2014).

Outros fatores como os multidomínios, podem influenciar na relação das modificações das histonas com a metilação do DNA, como o PHD (homo domínio de plantas), e a ubiquitina domínio dedo RING (*really interesting new gene*) que contém a proteína 1 (UHRF1), conhecida como Np95 (proteína nuclear de 95 kDa) que faz a ponte entre H3K9me e a hemi-metilação do DNA para estabilizar a DNMT1. Apesar de necessários, estes domínios não são suficiente para a manutenção adequada da metilação, entretanto é desconhecida a forma como estes domínios agem, se independente ou de modo cooperativo, e nem mesmo quais proteínas protegem o DNA da metilação *de novo* na ausência da transcrição (HASHIMOTO *et al.*, 2009).

As marcas epigenéticas geradas a partir das modificações das histonas, para que se mantenham no DNA e sejam transmitidas em divisão celular, é necessária a presença de proteínas “leitoras de metilação”, que têm capacidade de reconhecer o DNA e as histonas quando metiladas, algumas já citadas como a PHD, cromo-domínio, bromo-domínios e outros como a SRA (associando a SET e RING), domínio CXXC, que fica dentro da metade reguladora N-terminal da DNMTs, e domínio de ligação a metil-CpG (MBD), destacando que a metilação do DNA via DNMTs, pode ocorrer em sequências simétricas, como CG e CHG (onde H corresponde às bases A, T ou C) ou CHH como sequencias assimétricas, onde a metilação do DNA e da H3K9 estão diretamente ligadas à compactação da cromatina e silenciamento gênico e a metilação da H3K4 à ativação (DU *et al.*, 2015).

RNA não codificadores (ncRNA)

Nos eucariotos, apesar de se ter a ideia que todo genoma viável é transcrito, nem sempre isso ocorre, pois existem RNAs não codificantes (ncRNA) que não conseguem codificar proteínas de forma adequada, que, de acordo com o tamanho, podem ser curtos (<30 nucleotídeos) ou longos (> 200 nucleotídeos), com isso diferem na atividade desempenhada, sendo apontados como modificadores epigenéticos em nível transcricional ou pós-transcricional, exercendo funções de regulação da expressão gênica em vários níveis, interagindo com o DNA genômico, participando de atividades funcionais celulares cruciais ao desenvolvimento normal ou sendo alvo de modificações geradas a partir do ambiente, tornando-se um disruptor para inúmeras doenças (ESTELLER, 2011).

EPIGENÉTICA E AS DOENÇAS HUMANAS

Epigenética nas doenças humanas não oncológicas

Nas doenças humanas, cujo fatores ambientais são gatilhos ou iniciadores, as modificações epigenéticas estão cada vez mais implicadas na etiopatogenia da maioria delas, como a metilação do DNA documentada no Lúpus Eritematoso Sistêmico, Artrite Reumatoide, Esclerose Múltipla e Cirrose Biliar Primária. Estas patologias são de origem autoimunes, ou seja, ocorrem em indivíduos com susceptibilidade genética que se depararam com gatilhos ambientais, que induzem a perda de tolerância imunológica e formação de auto-antígenos, e portanto, a epigenética tem lugar na detecção de possíveis marcadores de diagnóstico precoce e de alvos terapêuticos (LONG *et al.*, 2016).

Distúrbios neurológicos raros também estão sendo descritos como tendo provável participação epigenética na sua gênese, a síndrome de *Rett* foi associada à metilação do DNA, a síndrome de *Rubinstein-Taybi*, autossômica dominante, foi associada a modificações pós-traducionais de histonas, as síndrome de *Coffin-Lowry* e de *ATRX*, associadas a metilação aberrante do DNA e a sequências nucleossômicas repetitivas, além de algumas referências a participação epigenética nas doenças neurológicas degenerativas (PORTELA; ESTELLER, 2010)

Na etiologia da Endometriose, doença benigna que acomete o útero, ovários, trompas e região pélvica, sendo causa importante de infertilidade, foram observados mecanismos epigenéticos diretamente envolvidos, com a observação de níveis aberrantes de metilação nas histonas H3K4, H3K9 e H3K27, e hipoacetilação global da H3K9ac e H4K16ac em endométrios comprometidos, que podem preceder a doença (MONTEIRO, 2014).

Além disso, outro estudo em Endometriose do mesmo grupo mostrou que na fase secretora, o endométrio comprometido apresentava maior expressão da H3K27me3, cuja atividade corresponde ao silenciamento da transcrição gênica, e desempenha um papel na diferenciação de células-tronco e na carcinogênese, podendo ser utilizada futuramente como marcador de prognóstico (CARABALLO; MONTEIRO; FLORES, 2015).

No envelhecimento humano, mudanças moleculares específicas aumentam a susceptibilidade às doenças neurodegenerativas ou neuropsiquiátricas, decorrentes de

diferentes vias funcionais envolvidas na neurocognição de idosos, inflamação e estresse oxidativo (MOHAN et al., 2016).

O ambiente também é responsável por condições patológicas ligadas ao estado emocional e comportamento, onde traumas emocionais sofridos são transmitidos às novas gerações, porém mais pesquisas são necessárias para entender o modo de transmissão de marcas epigenéticas ligadas ao comportamento entre gerações (BOHACEK; MANSUY, 2013). Além da genética, os aspectos epigenéticos podem explicar a natureza progressiva de algumas doenças que surgem na idade adulta, aos quais o ambientais tem forte participação (BELL; BECK, 2010).

Epigenética nas doenças humanas oncológicas

No câncer, uma das doenças mais complexas do ponto de vista molecular, onde ocorrem mudanças na dinâmica no genoma, várias modificações epigenéticas já foram descritas, dentre elas a mais frequente é a metilação aberrante de genes supressores de tumores, correlacionada diretamente ao silenciamento de genes que inibem o comportamento maligno das células. No entanto, pela condição de reversibilidade epigenética, a descoberta abre caminhos a melhoria do diagnóstico e tratamento do câncer (RODRÍGUEZ-RODERO *et al.*, 2014).

A metilação aberrante ou global do DNA é uma das principais modificações epigenéticas descritas no câncer, seguida da hipometilação do DNA, geralmente ligada às condições de perda de proteção de genes supressores de tumores envolvidos na regulação do ciclo celular, reparo do DNA, apoptose e a outros fatores ligados ao comportamento maligno (PARTHA; SINGAL, 2004).

Com as ferramentas atuais é possível descrever alterações moleculares precoces no câncer, sejam geradas por mutações genéticas ou modificações epigenéticas, e com isso definir limites mais precisos entre a região comprometida e a histologicamente normal, chamado de “campo do câncer”, ou seja, área que envolve os tecidos circundantes ao câncer primário, aparentemente normal que também sofreu modificações (YANG *et al.*, 2013). Nos tumores da região colorretal, o “campo do câncer” foi bem documentado, ocorrendo por aquisições cumulativas, pelas alterações sofridas nas sequenciais genéticas e/ou epigenéticas, e por fim, se incorporam ao fenótipo do câncer, com regulação própria e independência (SAMBUUDASH; KIM; CHO, 2017).

Estudos utilizando metodologia de representação semântica de alterações genômicas e modelagem molecular tópica, identificaram ligação entre padrões comuns de perturbações de

vias de sinalização celulares em diferentes tipos de câncer, observando subtipos para uma mesma categoria, por apresentar padrões de resposta de forma própria, definindo assim que as variáveis do comportamento clínico e de sobrevivência são características particulares de cada indivíduo e não somente do câncer (CHEN; PAISLEY; LU, 2017).

A toxicidade epigenética provocada por partículas poluentes, como os metais pesados cádmio, mercúrio, arsênico, níquel e cromo, pela radiação ionizante, gases tóxicos, alimentos, e pelo estresse oxidativo tecidual, via modulação das DNMTs ou competição pelo uso da SAM, respondem como fatores causal de diversas doenças oncológicas (HODJAT *et al.*, 2017).

Em alguns cânceres onde há participação conhecida de vírus, como no câncer de fígado ou hepatocarcinoma, onde o DNA se encontra diferencialmente mais metilado nas regiões infectadas que nas não infectadas pelos vírus B (HBV) e/ou C (HCV), bem como na maioria dos loci de regiões intensificadoras e na zona promotora de genes, sugerindo que a infecção viral tem papel na regulação da expressão gênica ou na influência da progressão do câncer (SONG *et al.*, 2016).

A ligação do câncer humano com as modificações epigenéticas é cada vez mais evidente, quando se observa que nem todo genoma de câncer se origina de mutações, documentado no ultimo catálogo de bases de pesquisa em câncer humano (Tabela 2), baseado em 2 760 220 experimentos sobre 541 928 tumores, 29 genomas completos de câncer, 136 326 mutações pontuais, e 4 946 fusões entre as mutações (FORBES *et al.*, 2011).

Tabela 2. Dados contidos no banco de dados COSMIC de mutações documentadas no câncer na versão de julho de 2010.

Tipos de dados curados	Contagem de dados curados
Experimentos	2 760 220
Tumores	541 928
Mutações	136 326
Referencias	10 383
Genes	18 490
Fusões	4946
Variantes estruturais	2307
Genomas completos de câncer	29

Fonte: Extraído e adaptado de Forbes *et al.*, 2011, disponibilizado na plataforma COSMIC (*curates comprehensive information on somatic mutations in human cancer*).

Ainda em destaque, estão as mutações encontradas no câncer que funcionam como indutores epigenéticos conhecidos como *drivers*, que coordenam o processo de oncogênese. No Consórcio Internacional do Genoma do Câncer (ICGC) há descrição de *drivers* localizados em reguladores epigenéticos, mutações recorrentes da HMT2 e na desmetilase histona, como também, hipermetilação global do DNA, sendo a trimetilação da H3K4 (H3K4me3) ligada à atividade gênica, e a H3K27me3 à repressão gênica em vários tipos de genoma de câncer (DAWSON; KOUZARIDES, 2012).

Avanços recentes mostram a rápida evolução da epigenética nos estudos sobre o início e progressão do câncer, onde o genoma é afetado em grande parte nas regiões intergênicas e intrônicas do DNA, particularmente nas sequências repetidas e nos elementos transponíveis, além de ser modificado pelo surgimento de múltiplas mutações nos genes *drivers*, que objetivam aumentar a aptidão das células cancerígenas em manter um novo ambiente (ZHANG; GAO; JIA, 2017).

A aberrações genéticas ou a remoção das marcas epigenéticas que ativam oncogenes e/ou desestabilizam o genoma variam entre os tipos de câncer e a repercussão molecular, que indiretamente podem ser empregadas para terapias personalizadas e mais precoces, como na “terapia de precisão”, onde pesquisas em genética e epigenética serão as chaves para a interrupção do processo de transformação maligna (COYLE; BOUDREAU; MARCATO, 2017).

A busca por marcadores moleculares de tumorigênese, relacionados diretamente ao genoma do câncer, permite o diagnóstico precoce em indivíduos de risco, e que o tratamento seja mais específico e menos deletério ao paciente (TOMCZAK; CZERWIŃSKA; WIZNEROWICZ, 2015).

Epigenética no câncer da tireoide

O câncer de tireoide, apesar da baixa mortalidade é um dos mais prevalentes, com 56.000 novos casos diagnosticados por ano nos Estados Unidos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017), e no Brasil, figura como a 6^a causa de câncer em mulheres e a 13^a em homens (INCA/BRASIL, 2016).

Carcinoma papilífero e carcinoma folicular são os tipos de câncer da linhagem folicular mais comumente encontrados na tireoide. Considerados bem diferenciados, o carcinoma

papilífero é o de maior prevalência (80% dos casos), e de comportamento indolente, sendo na maioria dos casos, de bom prognóstico; O carcinoma medular da tireoide é o terceiro tipo mais descrito, oriundo das células “C”, secretoras de calcitonina, de ocorrência esporádica ou associado a neoplasia endócrina múltipla. E, mais raramente, o carcinoma indiferenciado ou anaplásico, que apresenta arranjos celulares anárquicos, comportamento invasivo e extrema agressividade e prognóstico reservado (DOMENE *et al.*, 2002).

As principais mutações descritas no câncer de tireoide são relacionadas às variáveis de comportamento, como as documentadas no carcinoma papilífero que ocorrem em genes que regulam a via MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), que promovem o crescimento e a perda de diferenciação dos tecidos tumorais, assim como as mutações no gene *BRAF*, com a expressão da proteína modificada BRAFV600E e do oncogene *RAS*, e nos casos de carcinoma medular as mutações no oncogene *RET* (RIESCO-EIZAGUIRRE; SANTISTEBAN, 2016).

Das alterações epigenéticas relatadas no carcinoma papilífero e folicular, estão as metilações aberrantes dos genes supressores de tumores *RASSF1A*, *TIMP3*, *SLC5A8*, *DAPK*, *RAPβ2* e *RAP1GAP* e principalmente a presença de miRNAs, que podem ser expressos tanto em células normais como tumorais com propriedades biológicas distintas, porém o perfil de expressão ainda é pouco conhecido (FAAM *et al.*, 2014).

Ao analisar detalhes na metilação diferencial do carcinoma papilífero da tireoide, um estudo robusto ressaltou a importância da desregulação epigenética na progressão do tecido normal para o câncer, com evidências de hipermetilação da zona promotora, e consequente silenciamento do gene supressor de tumor *PTEN*, assim como, do comprometimento das vias *Wnt/b-catenina* e *p53*, além de outras regiões gênicas, sugerindo que análises epigenéticas complementares podem ser de grande importância em procedimentos de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) para o diagnóstico diferencial de nódulos malignos (WHITE *et al.*, 2016).

Epigenética do bócio coloide

Estudos epigenéticos sobre patologias tireoidianas são escassos na literatura, especialmente do BC. No entanto, poderiam desempenhar um papel importante no diagnóstico e tratamento, uma vez que o ambiente exerce forte influência na maioria das doenças da tireoide, como nas doenças autoimunes, doença de Graves e tireoidite de Hashimoto, que expressam micro RNAs (COPPEDÈ, 2017).

A metilação global do DNA foi estudada em três tipos de tecidos da tireoide: hiperplásico, benigno e maligno, onde o tecido maligno apresentou maior percentual de metilação que os demais, podendo se dever tanto pela desregulação da via de sinalização JAK-STAT, responsável pela diferenciação celular e homeostase, quanto pela via de sinalização da célula T, que tem um papel importante na proteção imune contra células neoplásicas, sugerindo a associação de metilação do DNA tecidual ao risco de transformação maligna (BIRD, 2003).

Outro trabalho de epigenética em doenças benignas da tireoide estudou metilações aberrantes nas ilhas CpG dos genes *CDKN2A*, *PTEN*, e *RASSF1A* e as mutações conhecidas do câncer de tireoide (*BRAFV600E*, *NRAS* no códon 61) em amostras de hiperplasia folicular, adenoma folicular, carcinoma folicular e tecido normal da tireoide. Na hiperplasia folicular foram excluídas mutações, porém foram encontradas metilações aberrantes no gene supressor de tumor *RASSF1A*, simultaneamente à ativação NF- κ B (fator nuclear κ B), sugerindo ser uma alteração epigenética comum a tumorigênese ou um dos primeiros eventos para a transformação maligna do BC (BROWN *et al.*, 2014).

HIPÓTESE

Como as modificações epigenéticas estão presentes em várias doenças humanas, principalmente naquelas em que o ambiente exerce forte influência, descrever o mapa das duas importantes marcas epigenéticas descritas em doenças neoplásicas, a metilação global do DNA e a pan-metilação da histona 3 na lisina 4, 9 e 27 (H3K4me3, H3K9me3 e H3K27me3) em diferentes regiões de 05 peças cirúrgicas de bócio colóide, comparando o resultado entre os indivíduos e as regiões anatômicas da glândula, define achados que poderão abrir caminhos no entendimento na gênese do BC, servindo de comparação e integração a estudos futuros.

Geral:

Mapear alterações epigenéticas nas diferentes regiões de 05 peças cirúrgicas de bócio colóide de pacientes submetidas a tireoidectomia total em Manaus/AM, oriundas do *Banco de Tecidos de Tireoide Normal e com Bócio (BTNB)*.

Específicos:

1. Analisar as variações do padrão de metilação global do DNA nas diferentes regiões da tireoide.
2. Analisar nas mesmas amostras as variações do padrão de metilação da histona 3 nas lisinas trimetiladas 4, 9 e 27 (H3K4me3, H3K9me3 e H3K27me3).
3. Comparar os resultados das modificações encontradas entre os indivíduos e entre as diferentes regiões da glândula.

Fluxograma da Pesquisa:

Na pesquisa, a metodologia empregada é descrita no seguinte fluxograma (Figura12).

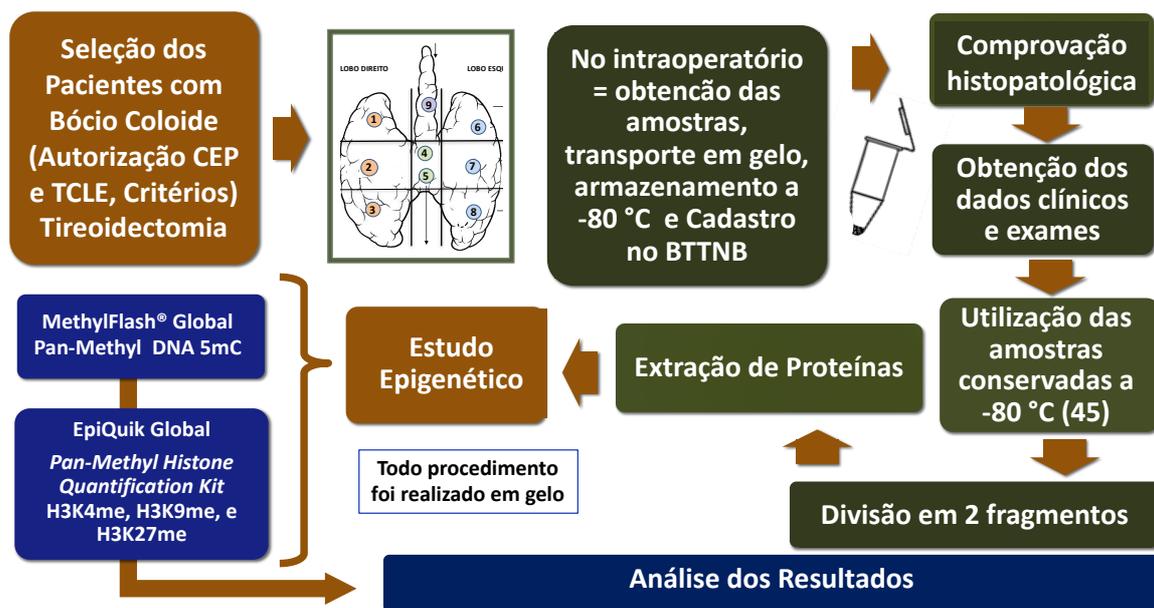


Figura 12: O fluxograma da pesquisa. (BTTNB- Banco de Tecidos de Tireoide normal e com bócio; DNA 5mC = DNA 5-metilcitosina; H3K4me = histona 3 na lisina 4 pan-metilada, H3K9me= histona 3 na lisina 9 pan-metilada; H3K27 = histona 3 na lisina 27 pan-metilada).

Procedimentos Éticos

Termo de Consentimento Livre Esclarecido:

O Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) de doação do tecido ao “Banco de Tecidos Tireoidianos Normais e com Bócio” (BTTNB/UFAM) foi assinado por todos os pacientes antes de se submeterem à tireoidectomia (Anexo 1, p. 107).

Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa:

O Projeto BTTNB/UFAM, que abriga amostras doadas por pacientes portadores de patologias cirúrgicas da tireoide foi apreciado e aprovado em 22/05/2013, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospital Adriano Jorge (FHAJ) com o parecer de nº 290.187, Plataforma Brasil, sob o CAAE: 16463813.9.0000.0007 (Anexo 2, p. 108).

Detalhes Do Estudo

Tipo de Estudo

Experimental com análise exploratória e ênfase descritiva do padrão de metilação global do DNA e das histonas H3K4me3, H3K9me3 e H3K27me3 de tecidos frescos de 05 peças de bócios coloides.

Locais do Estudo:

Laboratório de Tecnologia do DNA do Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas (CAM/UFAM), em Manaus/AM/Brasil e *Ponce Health Sciences University/School of Medicine and Ponce Research Institute*, em Ponce, Porto Rico (PR), Estados Unidos das Américas (EUA).

Amostragem:

Fragmentos de tecido fresco (n=45) retirados de nove regiões anatômicas da tireoide de cinco espécimes cirúrgicas de bócios coloides, com diagnóstico confirmado previamente por exame histopatológico.

Crítérios de Inclusão e Exclusão

Crítérios de Inclusão:

Bócios coloides pertencentes ao BTTNB/UFAM de mulheres adultas, que concordaram previamente com os termos descritos no TCLE, submetidas à tireoidectomia total na FHAI, que se associavam às patologias não autoimunes da tireoide no mesmo tecido, com diagnóstico confirmado por exame histopatológico, e que se encontravam armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ no Laboratório de Criopreservação do CAM/UFAM.

Crítérios de exclusão:

Bócios coloides pertencentes ao BTTNB de homens ou crianças, submetidos à tireoidectomia subtotal ou parcial, que se associavam às patologias autoimunes da tireoide no mesmo tecido (Tireoidite de *Hashimoto* ou Doença de *Basedow-Graves*) confirmados por exame histopatológico ou quando as amostras incluídas apresentaram insuficiência de material celular ou perda de tecido.

Análise Estatística dos Dados:

1. Na comparação das médias foi aplicado o teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA);
2. Nos gráficos foi calculado os respectivos Intervalos de Confiança (IC) ao nível de 95%.
3. Na comparação das diferenças entre a variabilidade das modificações epigenéticas dos cinco (05) indivíduos foi utilizado o Coeficiente de Correlação Intraclasse.
4. A confiabilidade dos dados foi verificada por meio da consistência interna do instrumento utilizado para coleta dos dados, por meio do coeficiente de alfa de *Cronbach*.
5. O nível de significância empregado em todas as análises de dados foi fixado em 5% para as tomadas de decisão.
6. Os dados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas, onde foram calculadas a média e o desvio-padrão (Dp)
7. Por ser aceita a hipótese de normalidade dos dados foi utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* ao nível de 5% de significância (VIEIRA, 2004).
8. O *software* utilizado nas análises foi o programa SPSS versão 21 para *Windows*.

Seleção de Tecidos de Bócio Coloide

Foram selecionados 05 (cinco) BCs de mulheres adultas, cadastradas no BTTNB/UFAM sob os números: 21, 28, 29, 30 e 31, enumeradas e dispostas por espécimes de BC, que passaram a ser denominados no estudo por *Paciente 1*, *Paciente 2*, *Paciente 3*, *Paciente 4* e *Paciente 5* respectivamente.

Detalhamento do BTTNB/UFAM (Anexo 3, p. 109)

Resultado dos Exames Histopatológica das peças cirúrgicas: (Anexo 4, p. 110)

Os exames histopatológicos foram realizados no Laboratório Reunidos em Manaus/AM, pelos patologista Dr. Joaquim Souto Loureiro e Dr. Luís Carlos Ferreira, ambos professores do Departamento de Patologia da UFAM, responsáveis técnicos pelos laudos histopatológicos.

Dados dos pacientes junto ao BTTNB/UFAM:

Os dados dos pacientes obtidos do BTTNB incluíam: nº do cadastro, registro hospitalar, iniciais do nome, idade, sexo, naturalidade e resultado histopatológico (Tabela 3). Os achados clínicos e descrição de exames complementares foram compilados e distribuídos na tabela 4 complementar (Tabela 4/Anexo 5, p. 111).

Tabela 3. Descrição dos dados das pacientes do BTTNB/UFAM.

N do Banco	Registro Hospitalar	Nome	Idade	Sexo	Naturalidade	Histopatológico
21	90028	M. J. O.B.	52anos	F	Manaus/AM	Hiperplasia Folicular Multinodular (LD e I) Adenoma Folicular (LE)
28	175736	E. S. S.	63 anos	F	Manaus/AM	Hiperplasia Multinodular (Bócio Adenomatoso) com área de Adenoma Folicular (LD)
29	177285	V. A.C.	54 anos	F	Manaus/AM	Hiperplasia Multinodular (Bócio Adenomatoso)
30	169386	M. E. L. M.	59 anos	F	Manaus/AM	Hiperplasia Multinodular (Bócio Adenomatoso)
31	181384	G. K. L. R.	33 anos	F	Coari/AM	Adenoma Folicular / Hiperplasia Multinodular (Bócio Adenomatoso) Carcinoma Folicular

Fonte: BTTNB/UFAM, 2014/2016 (LD: lobo direito; I: istmo; LE: lobo esquerdo; AM: Amazonas).

Detalhamento das Amostras*Quantitativo de amostras (fragmentos):*

Foram utilizadas quarenta e cinco amostras de tecido de BC (n=45).

Volume e peso das amostras:

As amostras coletadas no intraoperatório tinham aproximadamente 1,0 x1,0 cm de volume, pesavam entre 140 e 160 mg, sendo divididas em três fragmentos de 40 a 50 mg, colocadas em microtubos e conservadas a – 80 °C.

Regiões do bócio utilizadas no mapeamento epigenético:

A escolha das regiões da glândula da tireoide onde as amostras foram coletadas obedeceu a critérios anatômicos, abrangendo toda a glândula como um mapa. A divisão da glândula se fez por lobos: direito (LD) e esquerdo (LE) e polos: superior (S), médio (M) e inferior (I), didaticamente descrito no desenho abaixo (Figura 13).

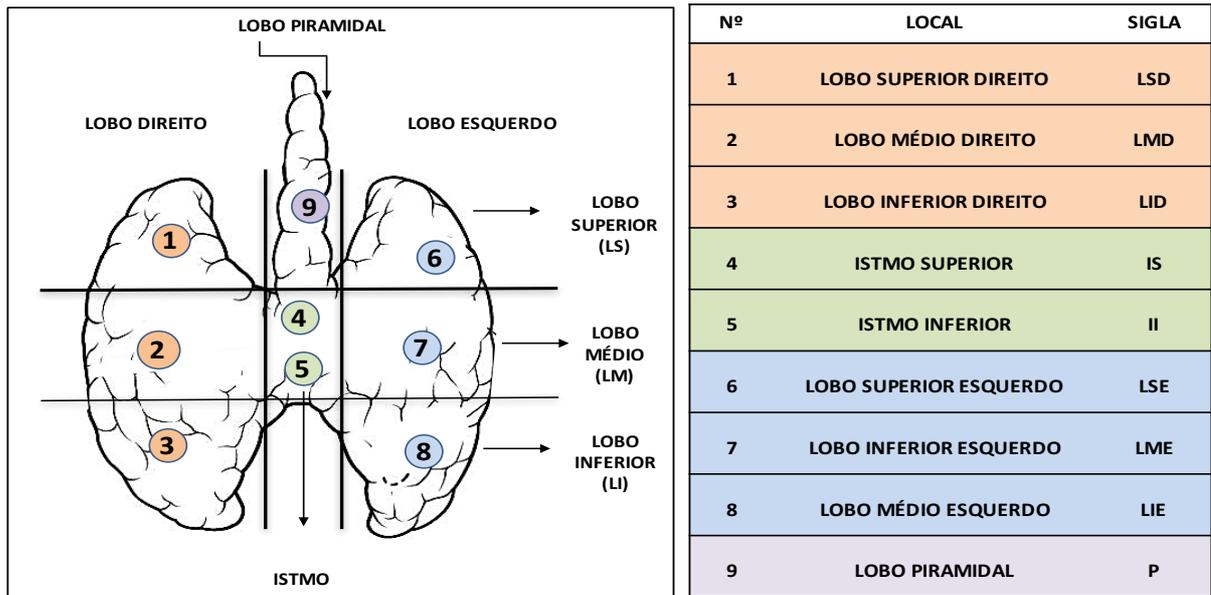


Figura 13. Desenho esquemático da tireoide com as regiões onde foram realizadas as coletas das amostras de tecido, feita para cada um dos pacientes selecionados do BTTNB, sendo representadas por cores, com a cor salmão para as amostras do lobo direito (LD), verde da região Ístmica (I), azul do lobo esquerdo (LE) e lilás do lobo piramidal (P). Fonte: Jezini, DL 2017.

Análise Molecular

Preparo do ambiente de bancada, acondicionamento das amostras e manuseio:

Todo procedimento de manuseio das amostras foi feito com luvas de proteção, e todos os tubos, pontas de pipeta que foram utilizadas estavam novos e estéreis.

As amostras que foram retiradas do freezer a -80 °C eram mantidas imediatamente em gelo durante todo o experimento.

HISTONAS

Extração de Histonas

Método empregado:

Protocolo de Extração de Histonas desenvolvido no Laboratório de Tecnologia do DNA da CAM/UFAM, pelos pesquisadores responsáveis: Professor Dr. Spartaco Astolfi Filho e Professora Dra. Enedina Assunção (2015).

Procedimento e as soluções empregadas no protocolo (Anexo 6, p. 113).

Análise Quantitativa da Metilação Das Histonas H3K4, H3K9 E H3K27:

Etapa realizada em colaboração com *Dra. Janice Barros Monteiro, PhD, Assistant Professor Biochemistry Department at Ponce Health Science University, Ponce/Porto Rico/EUA.*

Método empregado:

Kit de Quantificação Pan-Metil Histona EpiQuik® (Epigentek) gentilmente cedido pela Profa. Dra. Janice Barros Monteiro.

Método que quantifica simultaneamente a mono-, di- e a trimetilação global da histona 3 nas lisinas (K) escolhidas: H3K4, H3K9 e H3K27 no extrato de histonas, com limite mínimo de detecção de 2 ng por poço, e limite máximo de 20 ng a 5µg por poço de extratos de histonas, cujo controle é incluído na quantificação.

É um ensaio imunoenzimático, que constitui análise em espectrofotômetro da interação hierárquica de antígenos e anticorpos (Ag-Ac), cuja constante de afinidade (Kd) e especificidade são elevadas. O ensaio é realizado numa placa de suporte ou placa do tipo ELISA de matriz descartável, geralmente de poliestireno, que é ideal ligar o primeiro Ac. O leitor de ELISA quantifica a densidade óptica (OD) de cada poço da placa, executando a leitura comparando a curva padrão, ao controle negativo e ao teste branco da reação.

Procedimento:

1. Foram utilizados *kits* individuais para cada tipo de histona estudada (H3K4me3, H3K9me3 e H3K27me3), obedecendo as recomendações do fabricante (COLORIMETRIC; P, 2015).

2. Os ensaios foram feitos em duplicata, para o controle de erros de manuseio, e o cálculo do percentual de metilação, feito com as fórmulas inclusas no *kit*:

$$\text{Metilação (\%)} = \frac{\text{OD [tratado (testado) amostra - branco]}}{\text{OD [untreated (control) amostra - branco]}} \times 100\%$$

Para quantificação da mono-, di-, e trimetilação das histonas (H3K4/H3K9 e H3 K27): OD versus quantidade do Controle padrão, sendo determinada a inclinação da variável (delta) OD/ng, com a fórmula:

$$\text{Quantidade (ng/mg proteína)} = \frac{\text{OD (amostra - branco)} \times 1000}{\text{Proteína (\mu g)} * \times \text{inclinação}}$$

3. A curva padrão foi gerada com 8 pontos de concentração: branco, 1,5 ng/μL, 3 ng/μL, 6 ng/μL, 12 ng/μL, 25 ng/μL, 50 ng/μL e 100 ng/μL.
4. Em relação à distribuição das amostras nas placas de ELISA, as tiras de 1 a 3 foram reservadas para o controle padrão e as tiras de 4 a 12 para as amostras.
5. A distribuição das amostras nos poços das três placas obedeceu a seguinte sequência: as tiras de 4 a 6 foram para a monometilação, as de 7 a 9 para a dimetilação, e as de 10 a 12 para a trimetilação.

Os procedimentos foram seguidos conforme o fluxograma cedido pelo fabricante *EpiQuik™* contido no *Global Pan-Methyl histonas H3-K4 / H3-K9/ H3-K27 Quantification kit* (Colorimétrico) (Anexo 7, p. 115).

DNA

Extração de DNA

A técnica empregada consiste no isolamento do DNA em membranas de sílica, cujo DNA adsorve especificamente as membranas, superfícies e partículas de sílica, em presença de sais caotrópicos num determinado pH. Os contaminantes celulares são removidos por etapas de lavagens, e finalmente o DNA é eluído num tampão com baixa concentração de sal (tampão de eluição).

Método empregado e técnica:

Kit de extração de DNA genômico da *PureLink® Genomic DNA MiniKit* (Invitrogen, cat. no. K1820-02), obedecida as recomendações do fabricante (LIFE TECHNOLOGIES, 2013).

O kit e os equipamentos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Adolfo José da Mota, UFAM.

Procedimento:

Foram seguidas as recomendações do fabricante *PureLink®* na sequência das etapas do procedimento e no preparo das amostras de DNA (Anexo 8, p.116-117).

Avaliação da qualidade do DNA genômico:

A qualidade do DNA isolado foi analisada por Eletroforese em gel de agarose a 1 %.

O resultado da qualidade do perfil eletroforético digitalizado das amostras foi considerado satisfatório, apesar de apresentar algum grau de degradação, porém foi considerado não significativo (Anexo 9, p. 118).

Quantificação do DNA genômico

Método empregado:

Quantificação por espectrofotômetro *Nanodrop®* (*Thermo Scientific®*)

Etapa refeita no Laboratório de Tecnologia do DNA/CAM/UFAM e confirmada na *Biochemistry Department at Ponce Health Science University*, Ponce/Porto Rico, EUA.

Liofilização das amostras

As amostras foram liofilizadas no Laboratório de Tecnologia do DNA CAM/UFAM.

Análise Quantitativa da Metilação Global do DNA

Etapa realizada em colaboração com *Dra. Janice Barros Monteiro, PhD, Assistant Professor Biochemistry Department at Ponce Health Science University*, Ponce/Porto Rico, EUA.

Método empregado:

Kit de quantificação de metilação *MetilFlash®* (*Epigentek*), cujo método emprega a quantificação direta colorimétrica, do tipo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) do estado global de metilação do DNA, a 5-metilcitosina DNA (5-mC DNA).

Procedimento:

Procedimento da Análise Quantitativa da Metilação Global do DNA.

Desenho representativo da placa de ELISA, com a distribuição das amostras e controles nos poços e as fotos referentes ao experimento (Anexo 10 p. 119).

Fluxograma do método utilizado (Anexo 11, p. 121).

A sensibilidade limite de detecção de metilação (5-mC-DNA) é de 0,2 ng, com a fração metilada do DNA quantificada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro, onde a quantidade de DNA metilado é proporcional à intensidade OD medida.

Todo o ensaio foi feito em duplicata, e o cálculo com a fórmula inclusa no *kit*:

$$\text{Metilação (\%)} = \frac{\text{OD (tratado (testado) amostra - branco)}}{\text{OD (untreated (controle) amostra - branco)}} \times 100\%$$

Para quantificação da metilação global do DNA: OD versus quantidade do Controle padrão, sendo determinada a inclinação da variável (delta) OD/ng, com a formula:

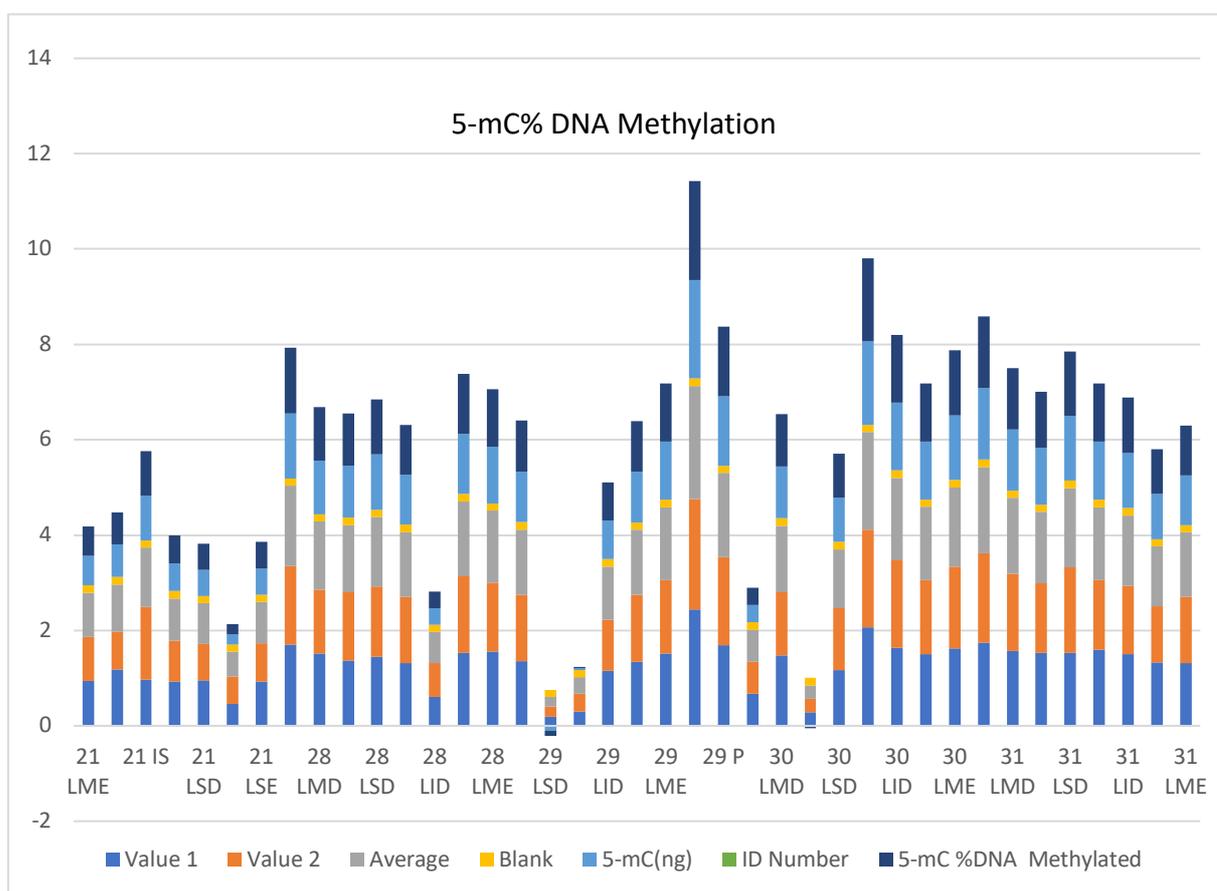
$$\text{Quantidade (ng/mg proteína)} = \frac{\text{OD (amostra - branco)} \times 1000}{\text{Proteína (\mu g)} * \times \text{inclinação}}$$

Os resultados das análises

Resultados da quantificação de DNA genômico por Nanodrop® (Anexo 12, p. 122).

Resultado da Metilação do DNA – o percentual de pan-metilação da DNA 5mC nas amostras de bócio por região da tireoide (Gráfico 1).

Gráfico 1: Resultado da leitura da absorvância em espectrofotômetro do percentual de pan-metilação do DNA 5-mC de amostras de bócio colóide, estratificada por paciente e área de tireoide.



Fonte: Jezini, D.L., *Biochemistry Department at Ponce Health Science University, Ponce/Porto Rico, 2016.*

Os resultados da distribuição do percentual médio de metilação global do 5-mC DNA por região foram distribuídos (Tabela 5):

Tabela 5. Distribuição do percentual de metilação global do DNA 5-mC nas amostras, por região da tireoide.

REGIÃO da tireoide	METILAÇÃO GLOBAL DA 5-mC (ng) DNA DAS AMOSTRAS POR REGIAO DE BÓCIO				
	Paciente 1(21)	Paciente 2 (28)	Paciente 3 (29)	Paciente 4 (30)	Paciente 5 (31)
LSD	0,547409091	1,151909091	-0,108090909	0,925409091	1,352909091
LMD	-----	1,119909091	2,068909091	1,090409091	1,283909091
LID	0,679909091	0,347409091	0,803909091	1,424409091	1,161909091
IS	0,937409091	1,094409091	-----	-0,025590909	1,186409091
II	0,581409091	1,045909091	0,030409091	1,745409091	1,219409091
LSE	0,555909091	1,369409091	1,064409091	0,361909091	1,500409091
LME	0,620909091	1,194909091	1,219409091	1,358909091	1,043409091
LIE	0,209909091	1,259409091	1,062409091	1,221409091	0,945409091
P	-----	-----	1,457409091	-----	-----

LSD- lobo superior direito; LMD- lobo médio direito; LID- lobo inferior direito; IS – istmo superior; II- istmo inferior;
LSE- lobo superior esquerdo; LME: lobo médio esquerdo; LIE: lobo inferior esquerdo; P- lobo piramidal

Fonte: Jezini, D.L., leitura da absorbância em espectrofotômetro. *Biochemistry Department at Ponce Health Science University, Ponce/Porto Rico/EUA, 2016.*

Quando distribuídos em conjunto, os gráficos do percentual de metilação global do DNA das amostras distribuída por região anatômica da tireoide das cinco pacientes, todas as pacientes apresentaram uma região de menor metilação, exceto a paciente 5 (31) (Figura 19).

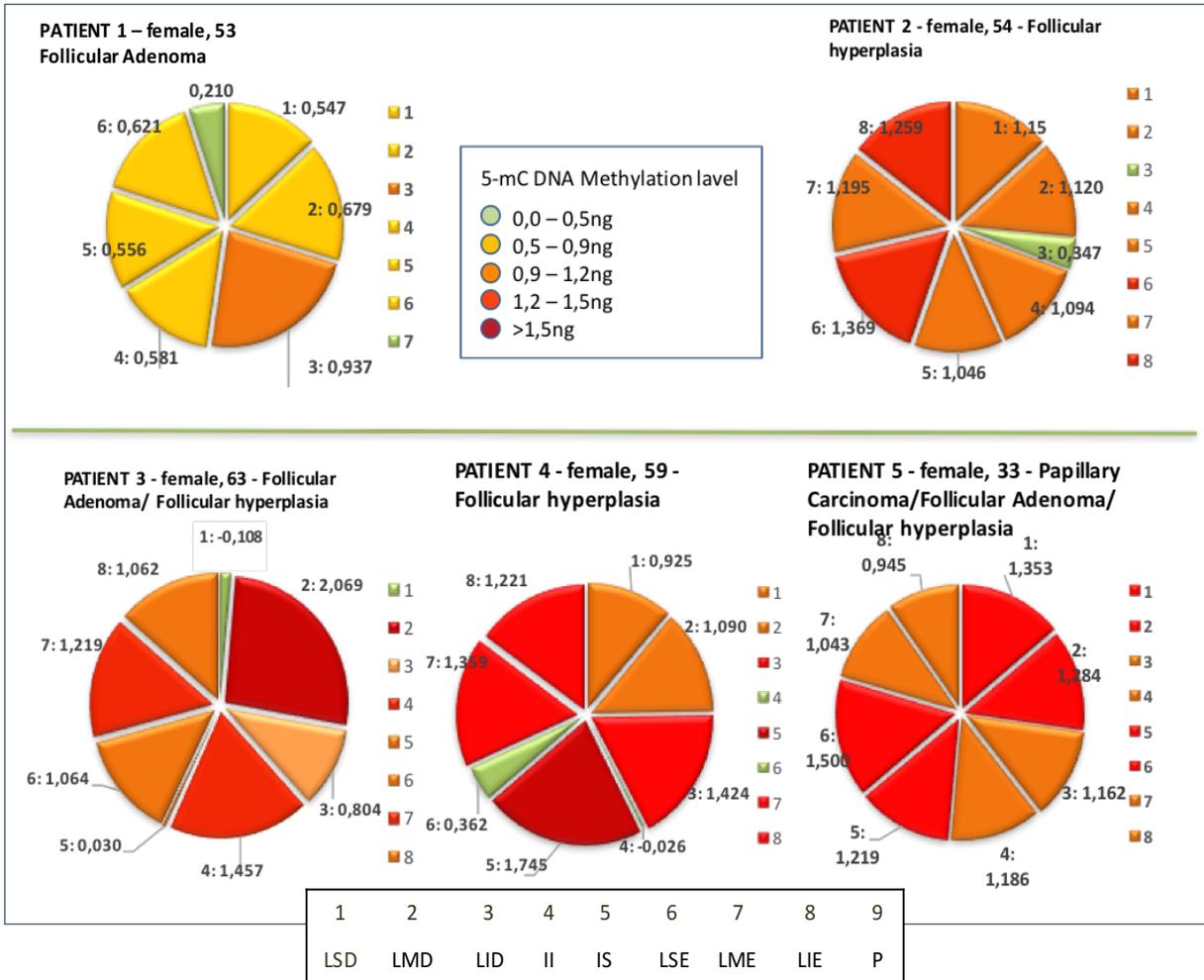


Figura 19: Conjunto de gráficos representando a distribuição do percentual de metilação global de DNA 5-mC nas diferentes regiões do bócio de todos os 05 pacientes (BTTNB 21, 28, 29, 30 e 31). (As cores representam o nível de metilação global, sendo o verde variando de 0,0 a 0,5 ng, laranja claro de 0,5 a 0,9 ng, laranja escuro de 0,9 a 1,2 ng, vermelho claro de 1,2 a 1,5 ng e o vermelho escuro >1,5 ng).

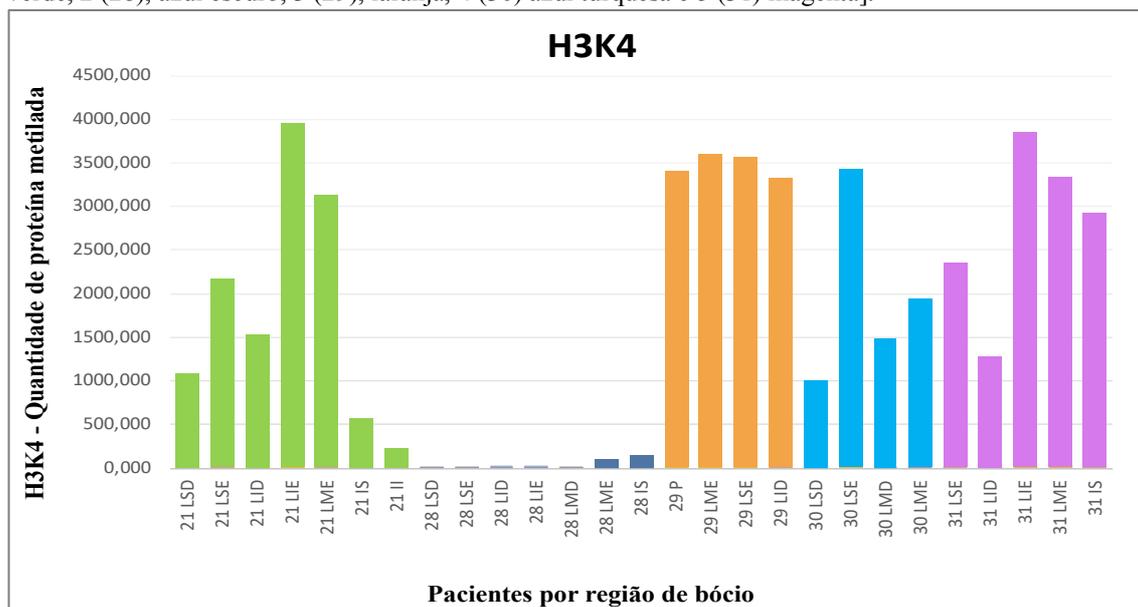
Resultado da Metilação das Histonas – resultado da leitura de absorbância em espectrofotômetro da H3K4me3 foram distribuídos (Tabela 6/gráfico 2), da H3K9me3 (Tabela 7/gráfico 3, p. 72) e da H3K27me3 (Tabela 8/gráfico 4, p. 73).

Tabela 6 . Resultado do percentual da pan-metilação da H3K4 por região de bório.

Numero ID	Valor 1	Valor 2	Média	Placa No.	OD-Branco	Quantidade de proteína metilada
21 LSD	1,116	1,089	1,103	3	0,999	1085,326087
21 LSE	2,233	1,951	2,092	3	1,988	2160,869565
21 LID	1,550	1,457	1,504	3	1,400	1521,195652
21 LIE	3,673	3,788	3,731	3	3,627	3941,847826
21 LME	2,933	3,016	2,975	3	2,871	3120,108696
21 IS	0,913	0,339	0,626	3	0,522	567,3913043
21 II	0,458	0,151	0,305	3	0,201	217,9347826
28 LSD	0,128	0,109	0,119	3	0,015	15,76086957
28 LSE	0,124	0,117	0,121	3	0,017	17,93478261
28 LID	0,144	0,122	0,133	3	0,029	31,52173913
28 LIE	0,132	0,117	0,125	3	0,021	22,2826087
28 LMD	0,112	0,109	0,111	3	0,007	7,065217391
28 LME	0,231	0,166	0,199	3	0,095	102,7173913
28 IS	0,283	0,194	0,239	3	0,135	146,1956522
29 P	3,236	3,198	3,217	3	3,113	3383,695652
29 LME	3,820	2,985	3,403	3	3,299	3585,326087
29 LSE	3,296	3,453	3,375	3	3,271	3554,891304
29 LID		3,157	3,157	3	3,053	3318,478261
30 LSD	1,058	1,001	1,030	3	0,926	1005,978261
30 LSE	3,129	3,373	3,251	3	3,147	3420,652174
30 LMD	1,614	1,322	1,468	3	1,364	1482,608696
30 LME	2,080	1,671	1,876	3	1,772	1925,543478
31 LSE	2,465	2,036	2,251	3	2,147	2333,152174
31 LID	1,523	1,028	1,276	3	1,172	1273,369565
31 LIE	3,543	3,737	3,640	3	3,536	3843,478261
31 LME	3,246	3,075	3,161	3	3,057	3322,282609
31 IS	3,299	2,271	2,785	3	2,681	2914,130435

Fonte: Jezini, D.L., leitura da absorbância em espectrofotômetro. *Biochemistry Department at Ponce Health Science University*, Ponce/Porto Rico, 2016.

Gráfico 2: Pan metilação da histona H3K4 em amostras de bório coloide dos 05 (cinco) pacientes [1 (21), verde, 2 (28), azul escuro, 3 (29), laranja, 4 (30) azul turquesa e 5 (31) magenta].

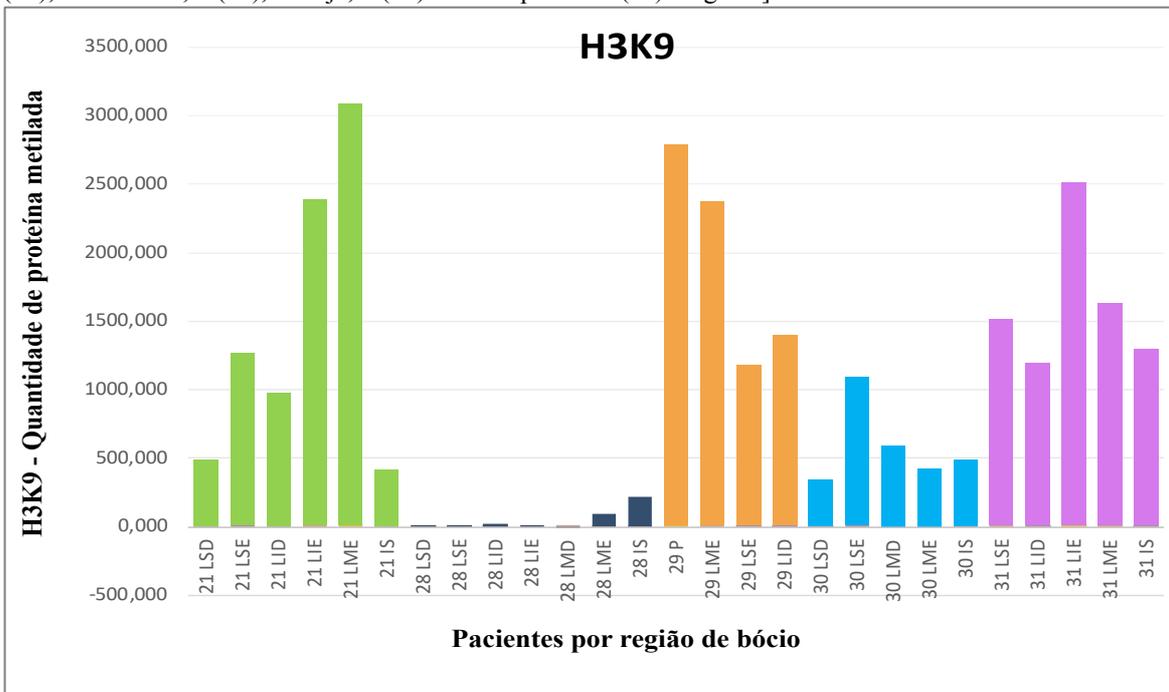


Fonte: Jezini, D.L., *Biochemistry Department at Ponce Health Science University*, Ponce/Porto Rico, 2016.

Tabela 7. Resultado do percentual da pan-metilação da H3-K9 por região de bócio.

Numero ID	Valor 1	Valor 2	Média	Placa No.	OD-Branco	Quantidade de proteína metilada
21 LSD	0,806	0,329	0,568	3	0,465	483,8541667
21 LSE	1,498	1,126	1,312	3	1,209	1259,375
21 LID	1,038	1,021	1,030	3	0,927	965,1041667
21 LIE	2,449	2,308	2,379	3	2,276	2370,3125
21 LME	3,131	2,972	3,052	3	2,949	3071,354167
21 IS	0,745	0,260	0,503	3	0,400	416,1458333
28 LSD	0,098	0,110	0,104	3	0,001	1,041666667
28 LSE	0,114	0,117	0,116	3	0,013	13,02083333
28 LID	0,121	0,131	0,126	3	0,023	23,95833333
28 LIE	0,120	0,110	0,115	3	0,012	12,5
28 LMD	0,095	0,098	0,097	3	-0,006	-6,770833333
28 LME	0,165	0,216	0,191	3	0,088	91,14583333
28 IS	0,347	0,278	0,313	3	0,210	218,2291667
29 P	2,903	2,630	2,767	3	2,664	2774,479167
29 LME	3,030	1,718	2,374	3	2,271	2365,625
29 LSE	1,198	1,254	1,226	3	1,123	1169,791667
29 LID	1,563	1,316	1,440	3	1,337	1392,1875
30 LSD	0,519	0,344	0,432	3	0,329	342,1875
30 LSE	1,050	1,238	1,144	3	1,041	1084,375
30 LMD	0,752	0,590	0,671	3	0,568	591,6666667
30 LME	0,561	0,456	0,509	3	0,406	422,3958333
30 IS	0,631	0,508	0,570	3	0,467	485,9375
31 LSE	1,576	1,511	1,544	3	1,441	1500,520833
31 LID	1,445	1,043	1,244	3	1,141	1188,541667
31 LIE	2,428	2,565	2,497	3	2,394	2493,229167
31 LME	1,571	1,738	1,655	3	1,552	1616,145833
31 IS	1,471	1,211	1,341	3	1,238	1289,583333

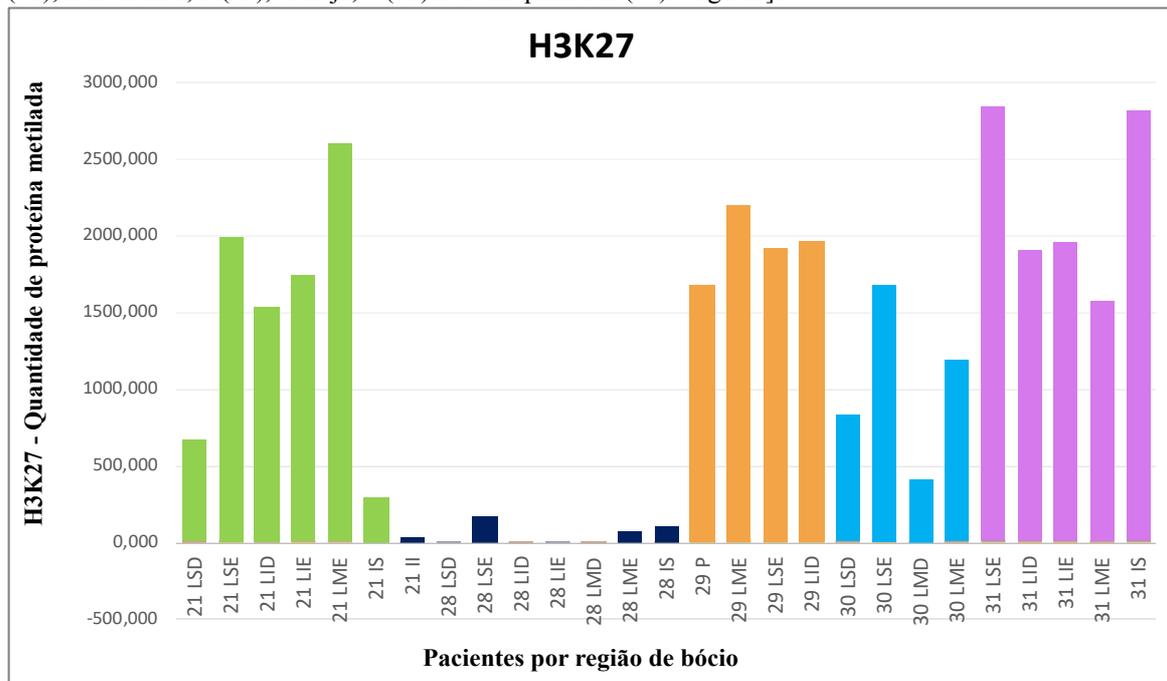
Fonte: Jezini, D.L., leitura da absorbância em espectrofotômetro. *Biochemistry Department at Ponce Health Science University, Ponce/Porto Rico, 2016.*

Gráfico 3: Pan metilação da histona H3K9 em amostras de bócio colóide dos pacientes: [1 (21), verde, 2 (28), azul escuro, 3 (29), laranja, 4 (30) azul turquesa e 5 (31) magenta].

Fonte: Jezini, D.L., *Biochemistry Department at Ponce Health Science University, Ponce/Porto Rico, 2016.*

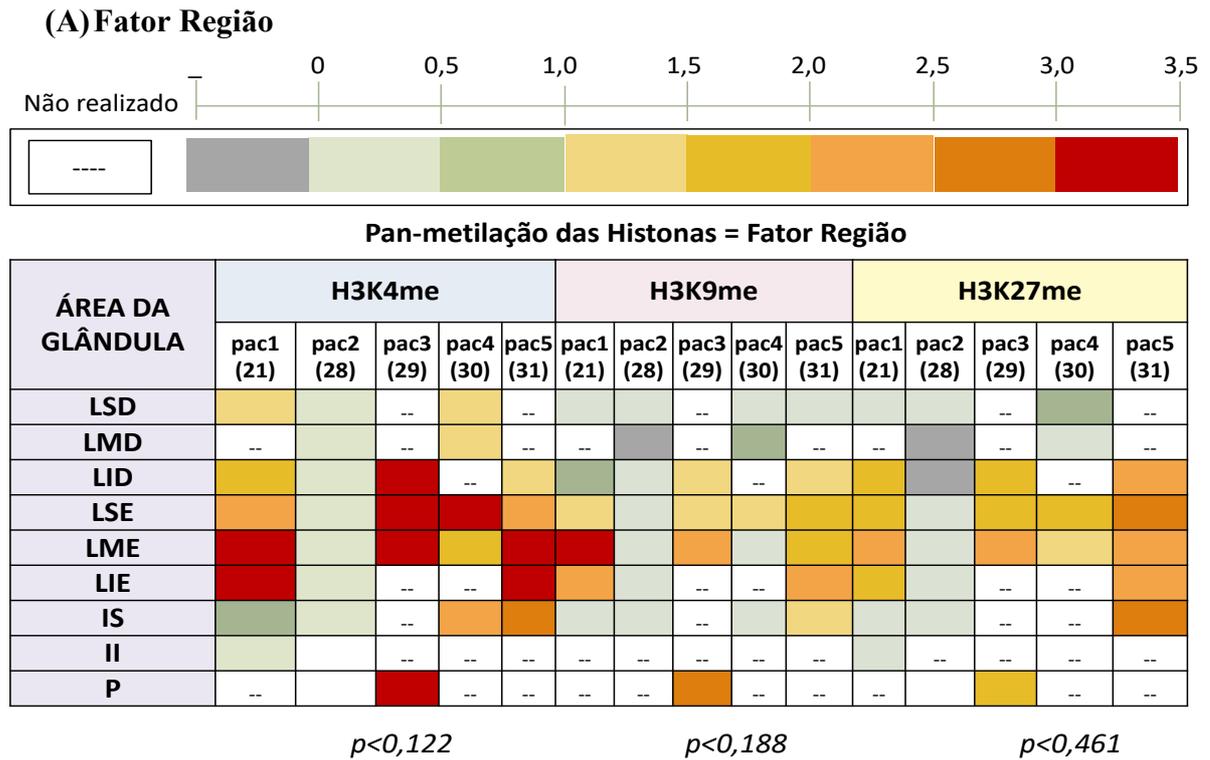
Tabela 8. Resultado do percentual da pan-metilação da H3-K27 por região de bócio.

Numero ID	Valor 1	Valor 2	Média	Placa No.	OD-Branco	Quantidade de proteína metilada
21 LSD	0,774	0,726	0,750	3	0,626	665,9574468
21 LSE	2,084	1,892	1,988	3	1,864	1982,978723
21 LID	1,698	1,424	1,561	3	1,437	1528,723404
21 LIE	1,793	1,715	1,754	3	1,630	1734,042553
21 LME	2,608	2,511	2,560	3	2,436	2590,957447
21 IS	0,554	0,239	0,397	3	0,273	289,893617
21 II	0,181	0,125	0,153	3	0,029	30,85106383
28 LSD	0,154	0,113	0,134	3	0,010	10,10638298
28 LSE	0,439	0,120	0,280	3	0,156	165,4255319
28 LID	0,113	0,122	0,118	3	-0,007	-6,914893617
28 LIE	0,130	0,125	0,128	3	0,004	3,723404255
28 LMD	0,111	0,113	0,112	3	-0,012	-12,76595745
28 LME	0,215	0,164	0,190	3	0,066	69,68085106
28 IS	0,192	0,258	0,225	3	0,101	107,4468085
29 P	1,743	1,650	1,697	3	1,573	1672,87234
29 LME	2,395	1,969	2,182	3	2,058	2189,361702
29 LSE	1,984	1,863	1,924	3	1,800	1914,361702
29 LID	2,216	1,712	1,964	3	1,840	1957,446809
30 LSD	1,156	0,637	0,897	3	0,773	821,8085106
30 LSE	1,596	1,801	1,699	3	1,575	1675
30 LMD	0,493	0,512	0,503	3	0,379	402,6595745
30 LME	1,182	1,289	1,236	3	1,112	1182,446809
31 LSE	2,805	2,759	2,782	3	2,658	2827,659574
31 LID	1,936	1,868	1,902	3	1,778	1891,489362
31 LIE	2,173	1,733	1,953	3	1,829	1945,744681
31 LME	1,641	1,547	1,594	3	1,470	1563,829787
31 IS	2,569	2,957	2,763	3	2,639	2807,446809

Gráfico 4: Pan metilação da histona H3K27 em amostras de bócio colóide dos pacientes: [1 (21), verde, 2 (28), azul escuro, 3 (29), laranja, 4 (30) azul turquesa e 5 (31) magenta].

Fonte: Jezini, D.L., *Biochemistry Department at Ponce Health Science University, Ponce/Porto Rico, 2016.*

Painel ilustrativo do resultado da metilação das histonas – um painel ilustrativo foi criado para melhor visualizar a distribuição das três histonas estudadas (H3K4me3, H3K9me3 e H3K27me3) nas amostras de bócio por região da glândula (fator região) e por paciente (fator paciente) (Figura 20) utilizando as cores com progressivas tonalidades correspondendo ao percentual de metilação.



(B) Fator paciente

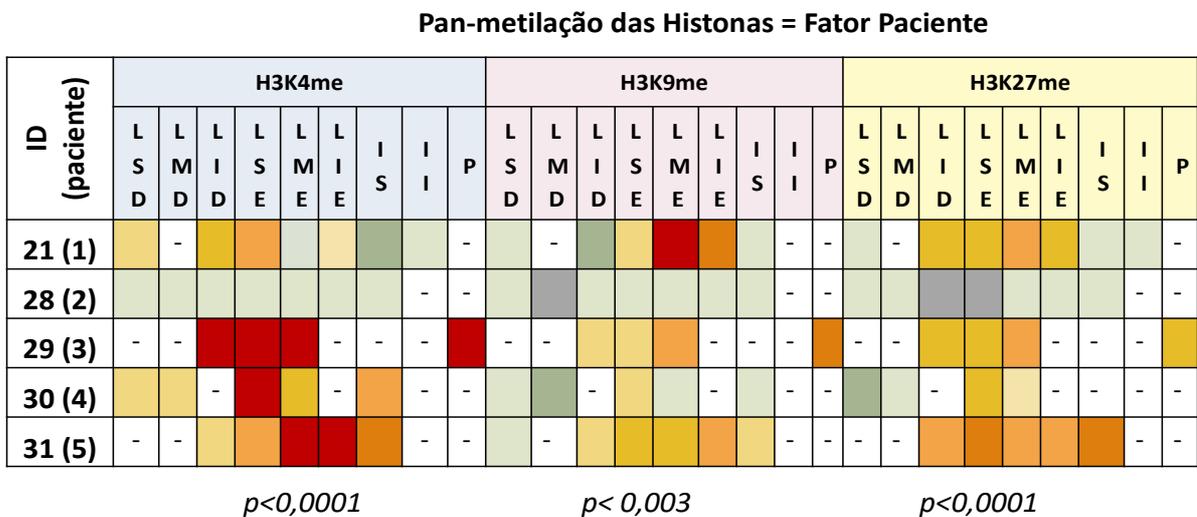
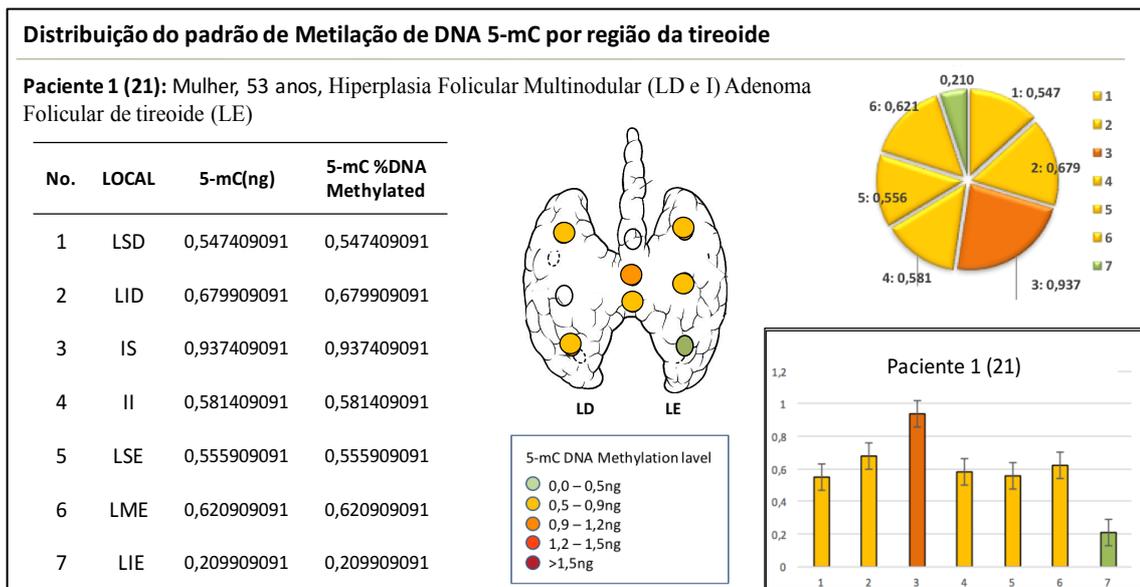


Figura 20: Painel ilustrativo representando a diferença nos padrões das histonas H3K4me3, H3K9me3 e H3K27me3 considerando o fator região (A) e o fator paciente (B). Fonte: Jezini, DL, 2017.

Metilação global do DNA x descrições histopatológicas - Os resultados da metilação global do DNA quando distribuídos conforme as descrições histopatológicas de cada bócio estudado na paciente 1 (Figura 21), paciente 2 (Figura 22, p.76), paciente 3 (Figura 23, p.77), paciente 4 (Figura 24, p. 78) e paciente 5 (Figura 25, p.79).

A)



B)

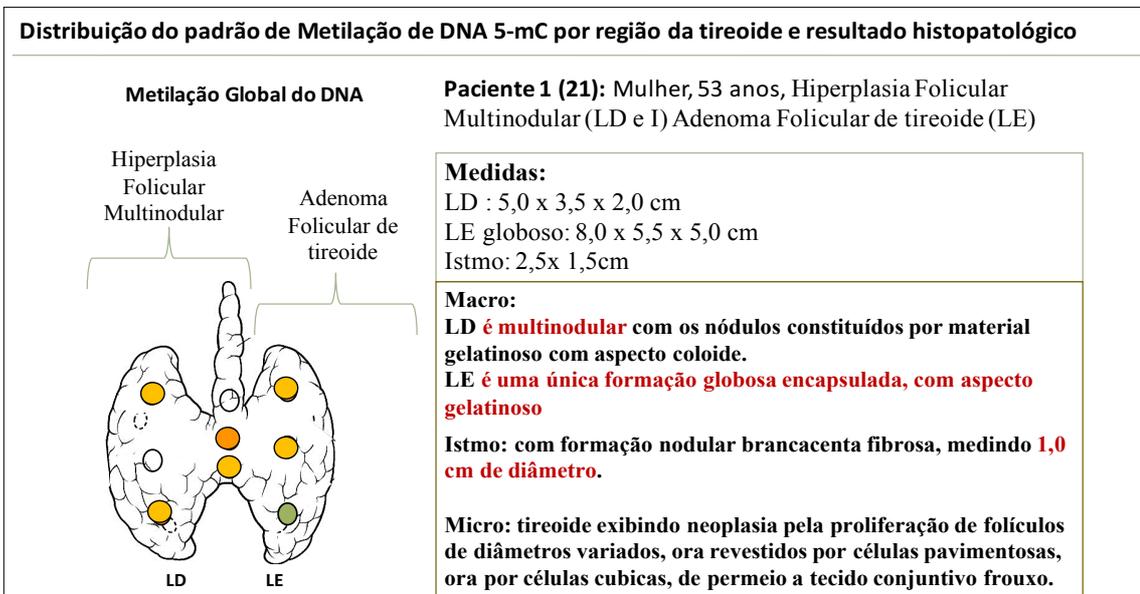
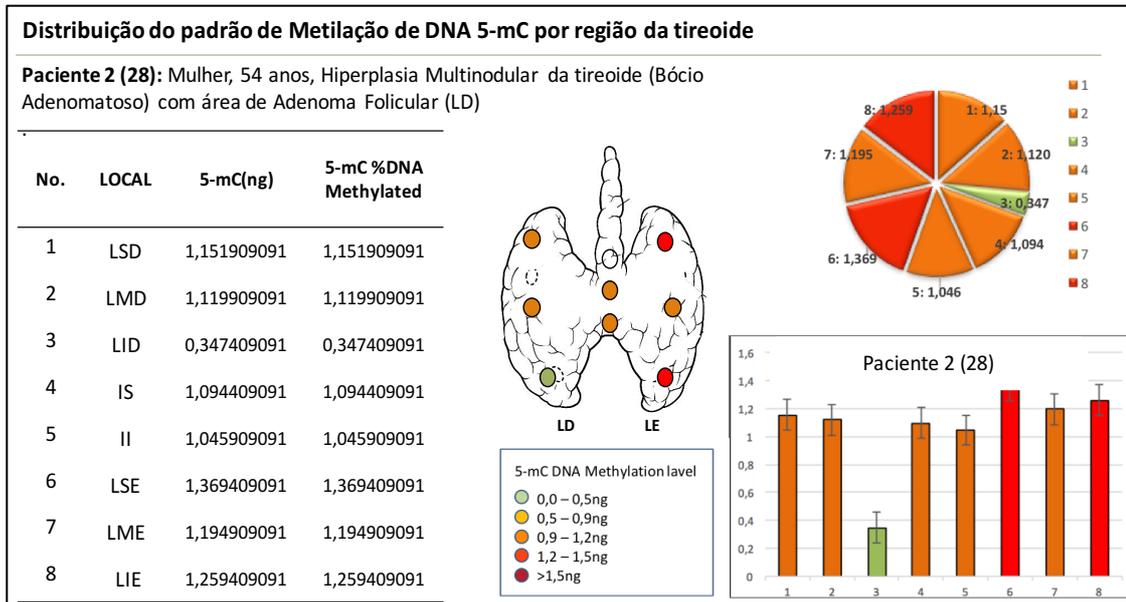


Figura 21A: Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 1 (21), de 54 anos de idade. As cores verdes, laranja claro, laranja escuro, vermelho claro e vermelho escuro representam o nível crescente de metilação respectivamente, e o branco, não realizado. **21B:** Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 1 (21), comparando com o exame histopatológico.

A)



B)

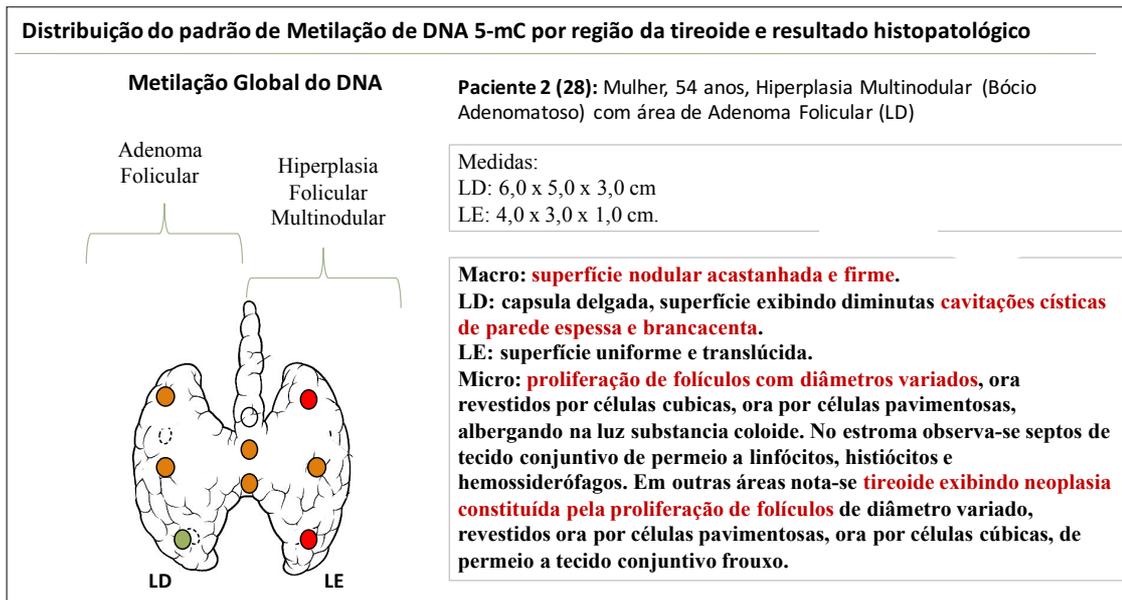
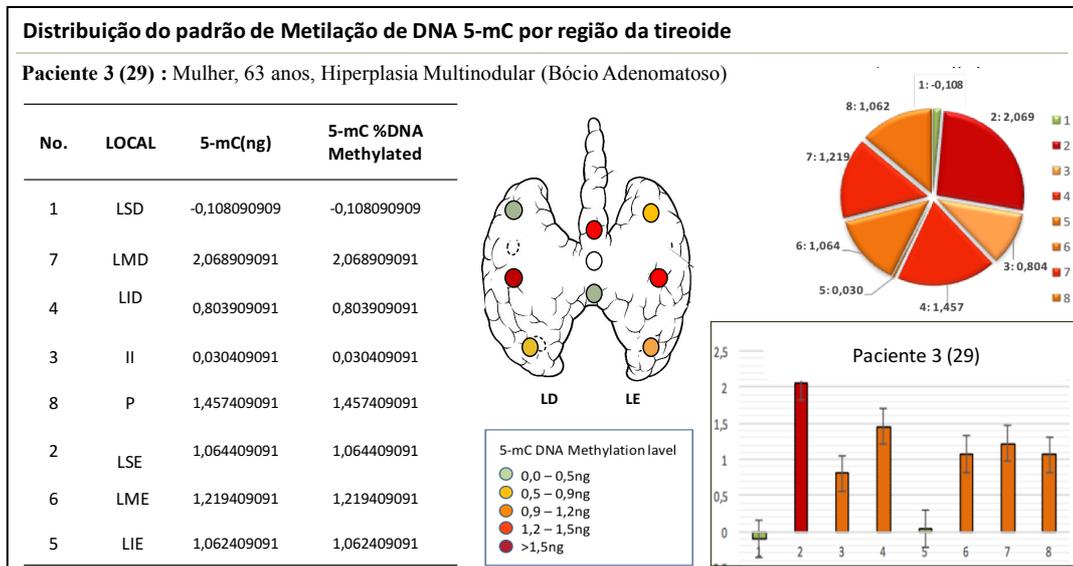


Figura 22A: Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 2 (28), de 54 anos de idade. As cores verdes, laranja claro, laranja escuro, vermelho claro e vermelho escuro representam o nível crescente de metilação respectivamente, e o branco, não realizado. **22B:** Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 2 (28), comparando com o exame histopatológico.

A)



B)

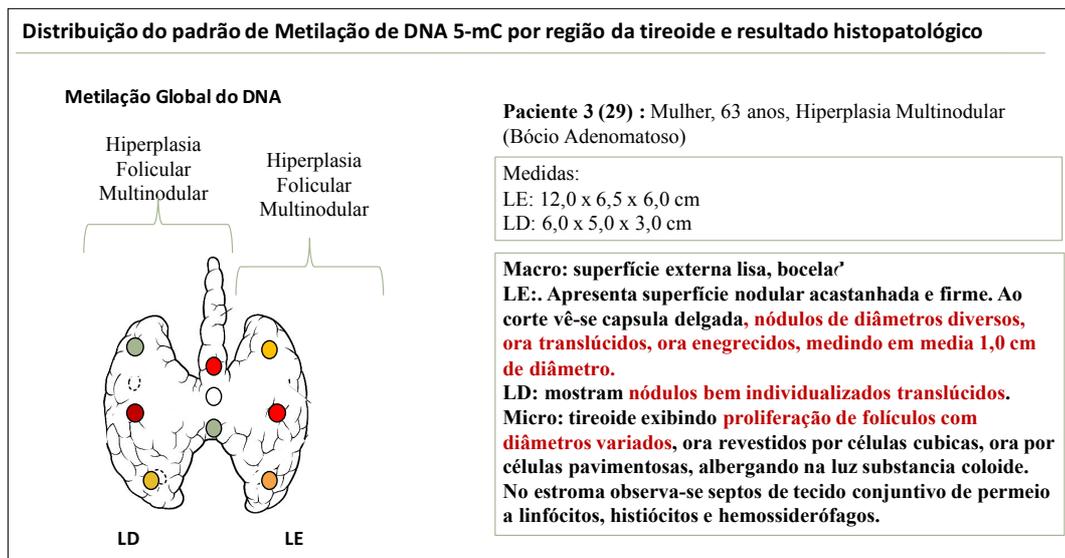
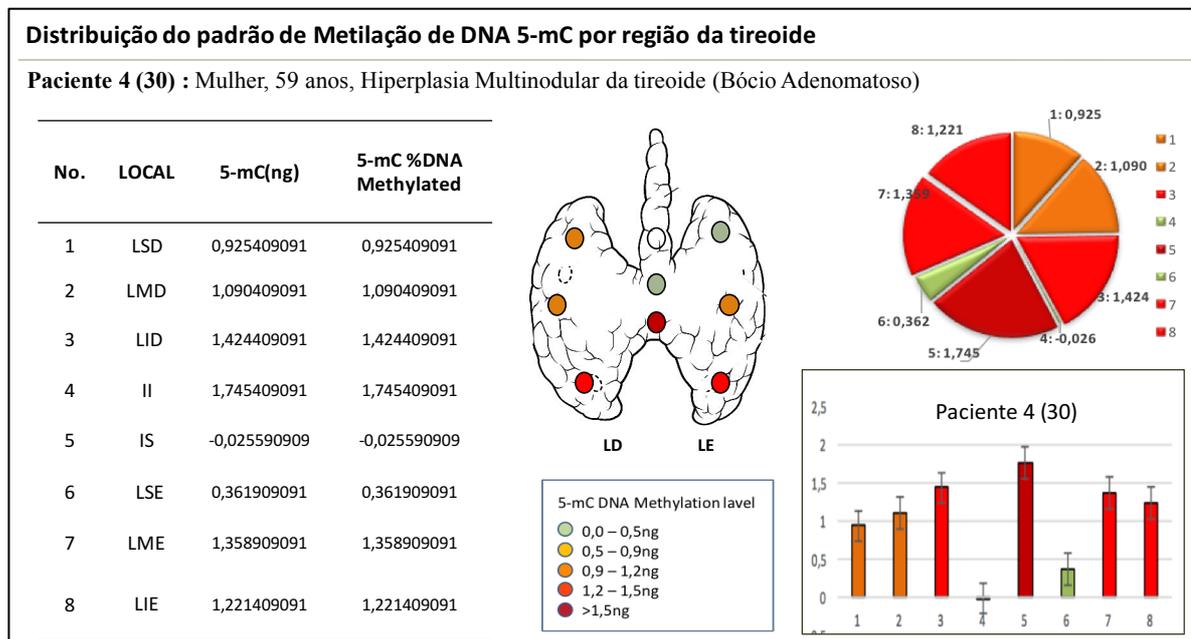


Figura 23A: Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 3 (29), de 54 anos de idade. As cores verdes, laranja claro, laranja escuro, vermelho claro e vermelho escuro representam o nível crescente de metilação respectivamente, e o branco, não realizado. **23B:** Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 3 (29), comparando com o exame histopatológico.

A)



B)

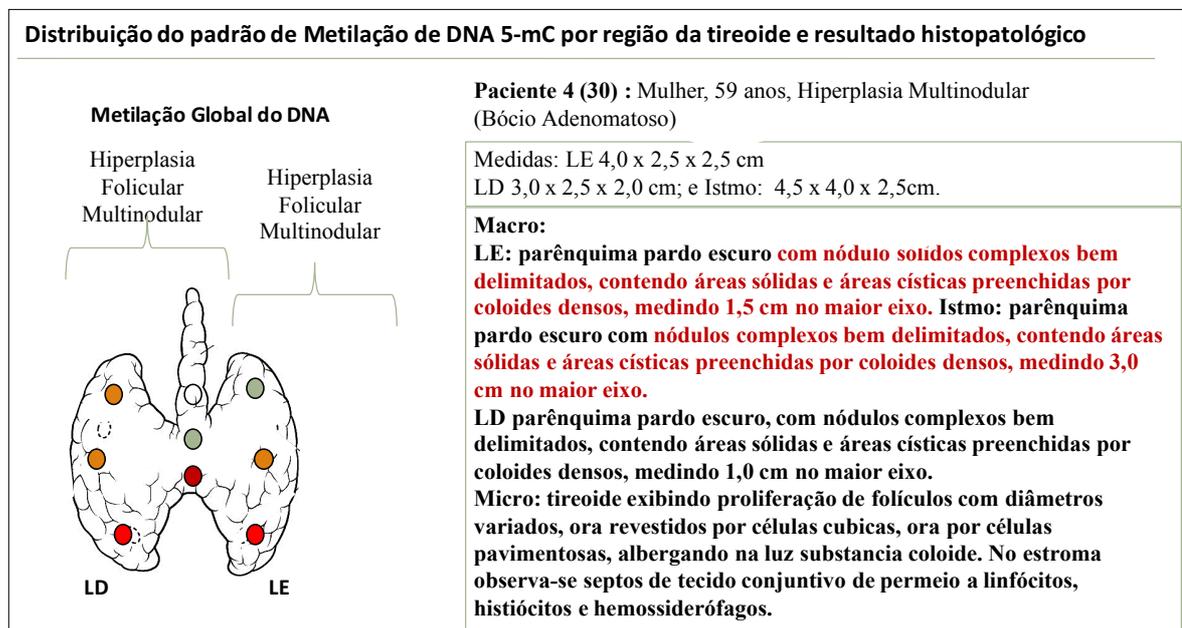
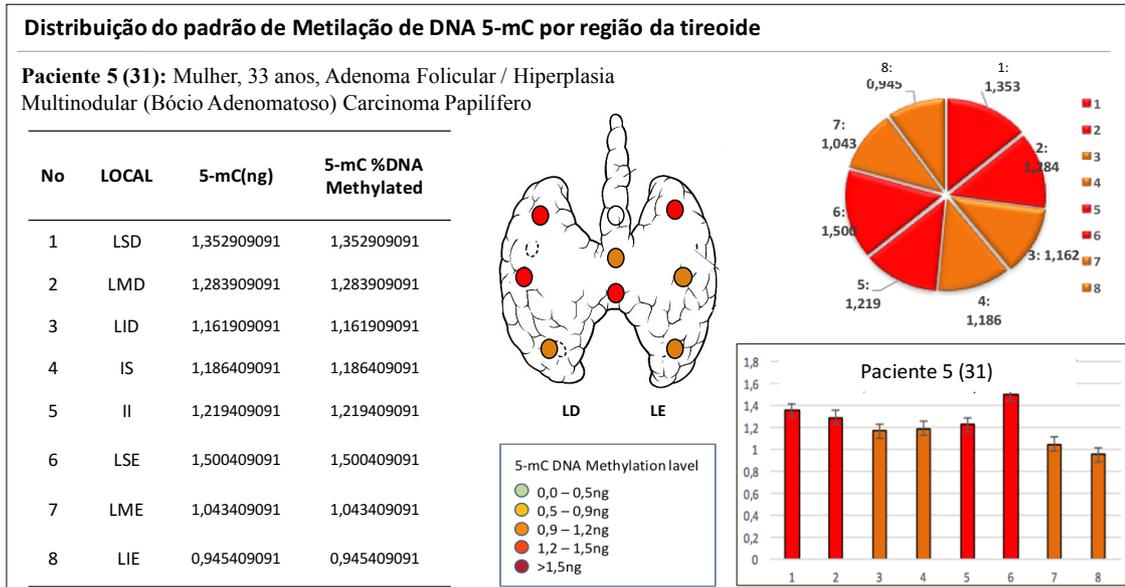


Figura 24A: Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 4 (30), de 59 anos de idade. As cores verdes, laranja claro, laranja escuro, vermelho claro e vermelho escuro representam o nível crescente de metilação respectivamente, e o branco, não realizado. **24B:** Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 4 (30), comparando com o exame histopatológico.

A)



B)

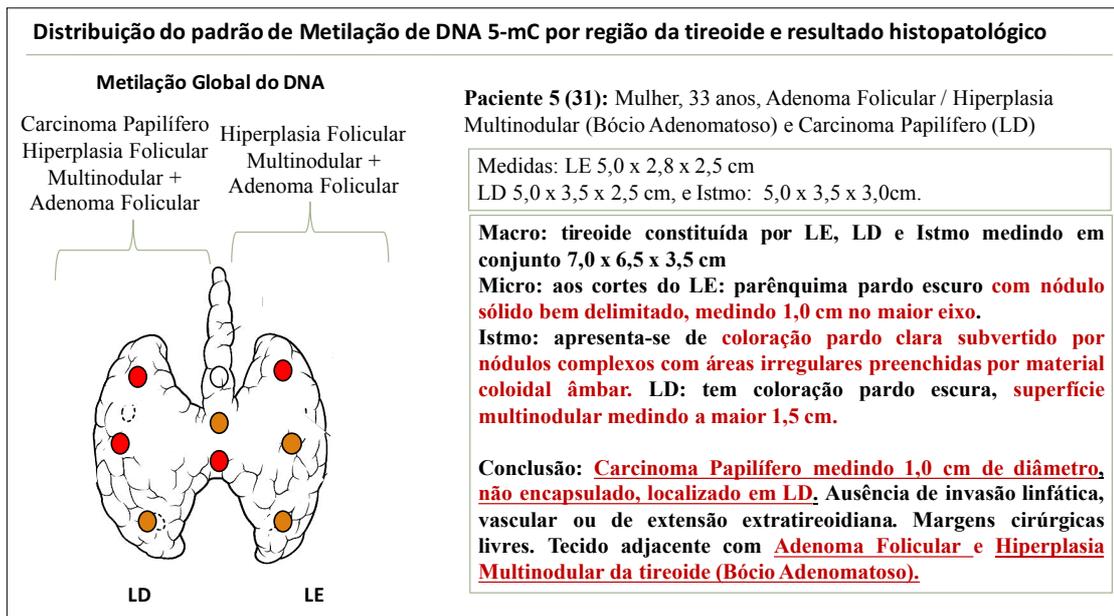


Figura 25A: Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 5 (31), de 33 anos de idade. As cores verdes, laranja claro, laranja escuro, vermelho claro e vermelho escuro representam o nível crescente de metilação respectivamente, e o branco, não realizado.

25B: Mapa de distribuição do percentual de metilação global de 5-mC DNA nas áreas de bócio da Paciente 5(31), comparando com o exame histopatológico.

Metilação do DNA

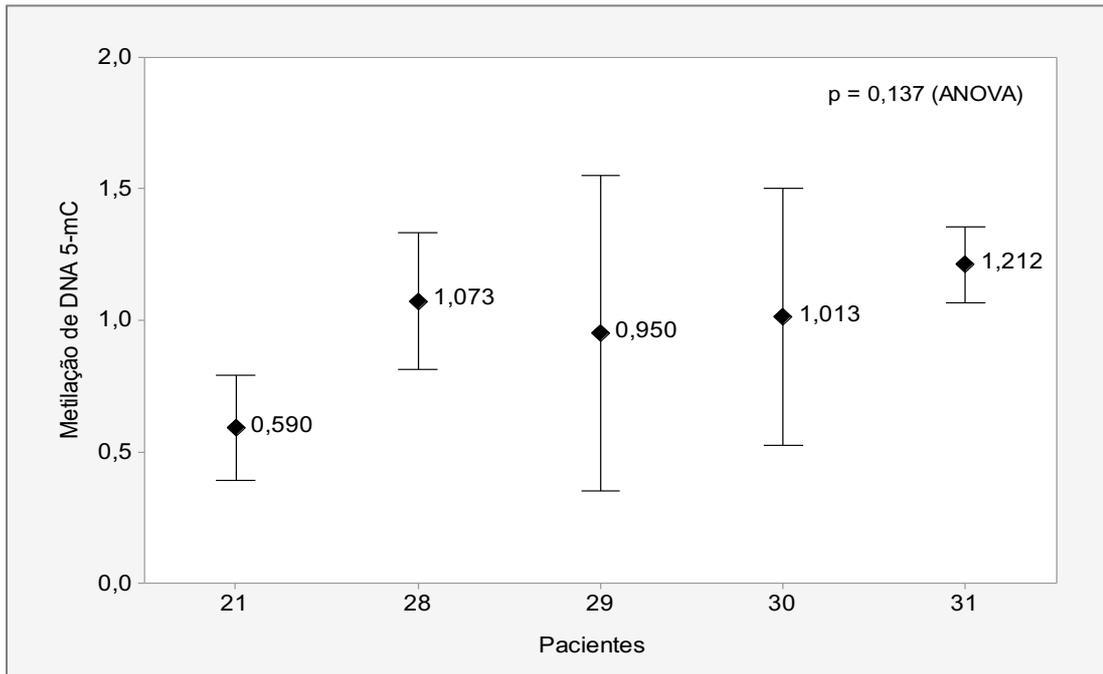
Considerando as pacientes, não houve evidências de que exista diferença significativa nos padrões de metilação de DNA entre as mesmas ($p = 0,114$), comparadas em nível de 5 % de significância (Tabela 9), ou seja, os padrões de metilação global média das 5-mC DNA das amostras por paciente foram similares (Gráfico 5, p. 81).

Tabela 9 - Análise descritiva e de variância da metilação global das 5-mC DNA das amostras.

Fator De Variação	Medidas Descritivas					P*
	n	média	dp	mínimo	máximo	
Paciente						
1 (21)	8	0,5904	0,1990	0,2099	0,9374	0,114
2 (28)	8	1,0730	0,3100	0,3470	1,3690	
3 (29)	8	0,8730	0,6810	-0,1080	2,0690	
4 (30)	8	1,0130	0,5840	-0,0256	1,7450	
5 (31)	8	1,2117	0,1736	0,9454	1,5004	
Região da Tireóide						
LSD	5	0,7740	0,5770	-0,1080	1,3530	0,843
LMD	5	1,2310	0,5360	0,5900	2,0690	
LID	5	0,8840	0,4200	0,3470	1,4240	
IS	5	0,8260	0,4880	-0,0256	1,1860	
II	5	0,9250	0,6510	0,0304	1,7450	
LSE	5	0,9700	0,4980	0,3620	1,5000	
LME	5	1,0680	0,2760	0,6210	1,3590	
LIE	5	0,9400	0,4270	0,2100	1,2590	

* Valores de p são significativos para $p < 0,05$ (5%) - Análise de Variância
dp = desvio padrão; *ANOVA para comparação das médias. Alfa de Cronbach = 0,93

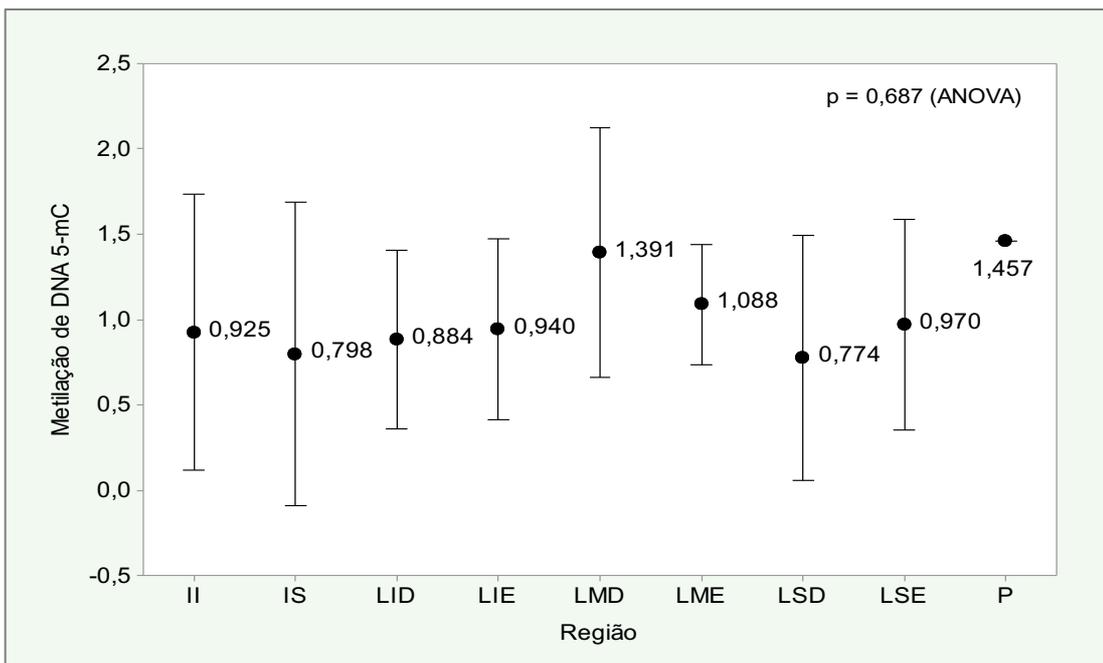
Gráfico 5 - Metilação global média das 5-mC DNA das amostras distribuídas por paciente.



Fonte: Jezini, D.L.

Considerando a região da tireoide, não houve evidências de que exista diferenças significativas nos padrões de metilação entre as mesmas, ou seja, os resultados são similares (p = 0,843) (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Metilação global média das 5-mC DNA das amostras distribuídas por região da tireoide.

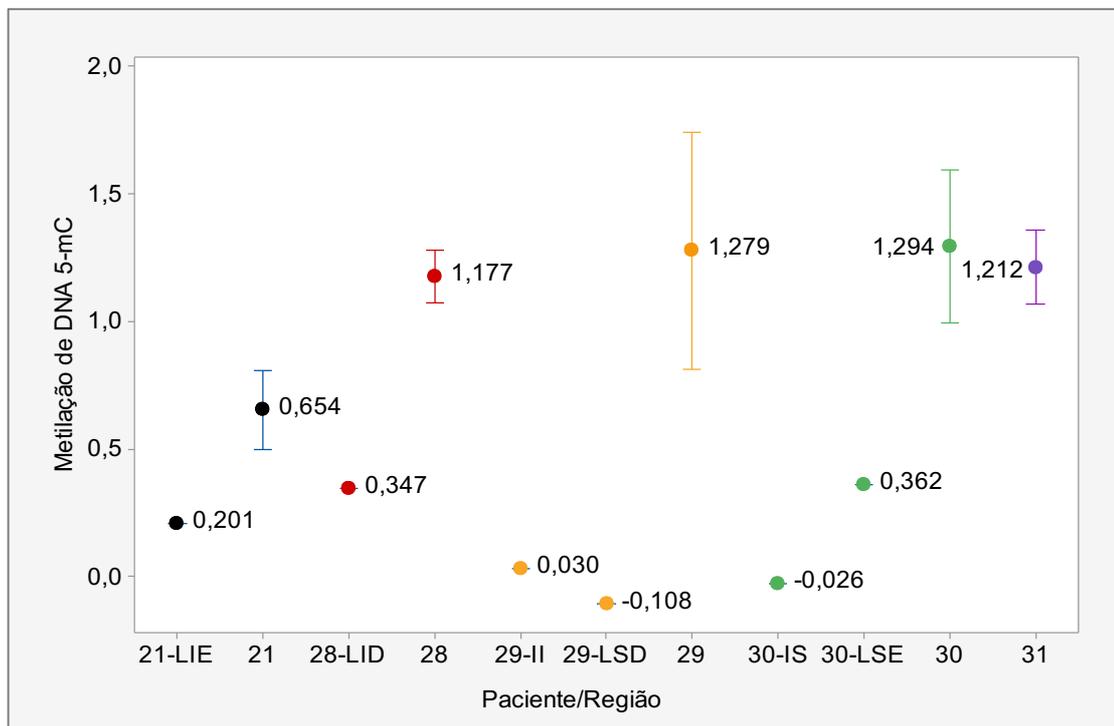


Fonte: Jezini, D.L.

Os resultados da comparação entre as regiões da tireoide num mesmo paciente (Gráfico 7):

1. Paciente 1 (21): o LIE foi considerado estatisticamente o que menos apresentou percentual de metilação de DNA.
2. Paciente 2 (28): o LID foi considerado estatisticamente o que menos apresentou percentual de metilação de DNA.
3. Paciente 3 (29): o II e LSD foram considerados estatisticamente os que menos apresentaram percentual de metilação de DNA, inclusive o LSD com valor negativo.
4. Paciente 4 (30): o IS e LSE foram considerados estatisticamente os que menos apresentaram percentual de metilação de DNA, inclusive o IS com valor negativo.
5. Paciente 5 (31): não foram encontradas regiões com baixo percentual de metilação de DNA, ou seja, toda a glândula se encontrava com o DNA globalmente metilado.

Gráfico 7. Médias da metilação de DNA 5-mC de cada paciente em comparação com as regiões que apresentaram menor percentual de metilação (< 0,5 ng)



Fonte: Jezini, D.L.

Metilação das Histonas

Considerando a análise de variância, observou-se que, ao nível de 5% de significância, que há fortes evidências de que os padrões médios de metilação das histonas H3K4me3, H3K9me3 e H3K27me 3 das pacientes avaliadas são significativamente diferentes entre si ($p < 1\%$), ou seja,

as três histonas se apresentam significativamente diferentes entre as pacientes. Ressaltando que, aparentemente na paciente 2 (28), nenhuma das histonas metiladas estavam presentes e na paciente 1(21), as histonas metiladas estavam mais expressas que nas demais (Tabela 10), (Gráfico 8; 9 -10, p. 84).

Tabela 10 - Análise descritiva e de variância da pan-metilação das histonas considerando o paciente como fator de variabilidade

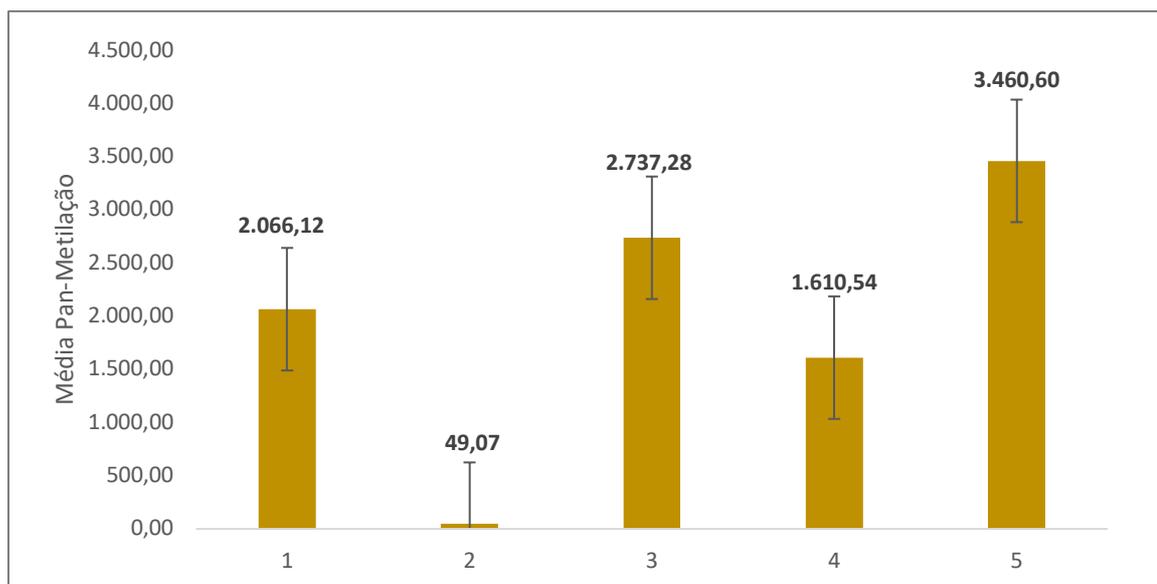
Histona	Paciente	Medidas Descritivas					p**
		n*	Média	dp	Mínimo	Máximo	
H3K27	1	6	1.465,43	852,28	289,89	2.590,96	p < 0,0001
	2	7	48,10	68,19	-12,77	165,43	
	3	5	2.207,23	576,03	1.563,83	2.827,66	
	4	5	822,55	644,07	30,85	1.675,00	
	5	4	1.933,51	211,61	1.672,87	2.189,36	
H3K4	1	6	2.066,12	1.276,19	567,39	3.941,85	p < 0,0001
	2	7	49,07	53,51	7,07	146,20	
	3	5	2.737,28	987,87	1.273,37	3.843,48	
	4	5	1.610,54	1.193,41	217,93	3.420,65	
	5	4	3.460,60	129,82	3.318,48	3.585,33	
H3K9	1	6	1.427,69	1.072,06	416,15	3.071,35	0,003
	2	7	50,45	80,69	-6,77	218,23	
	3	5	1.617,60	517,72	1.188,54	2.493,23	
	4	5	585,31	293,53	342,19	1.084,38	
	5	4	1.925,52	768,11	1.169,79	2.774,48	

* Total de regiões da tireoide de cada paciente

** Valores de p são significativos para $p < 0,05$ (5%) - Análise de Variância

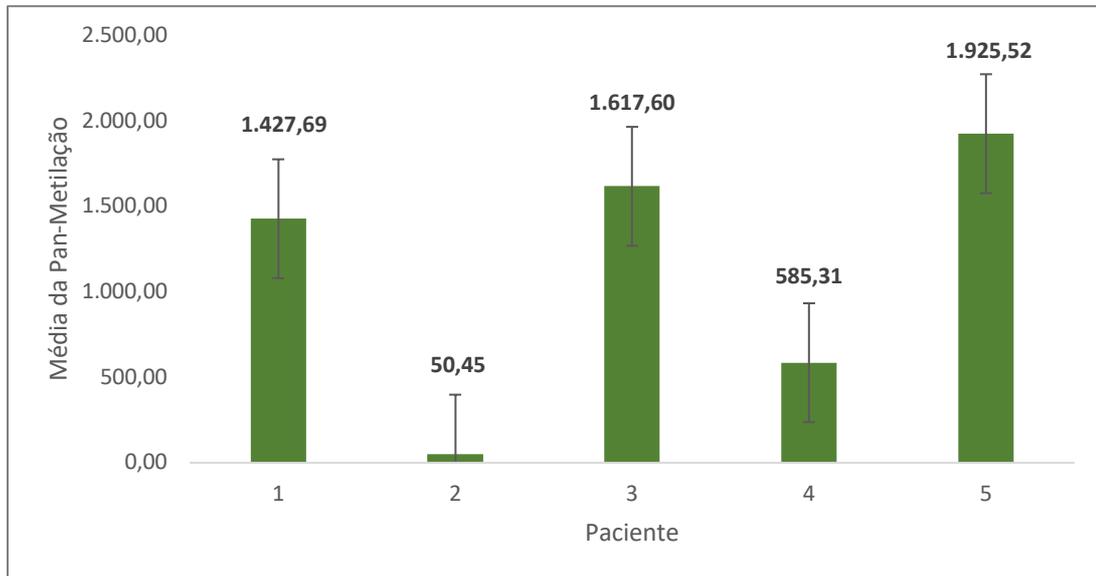
n° = quantidade de amostras, dp = desvio padrão

Gráfico 8 - Pan-metilação média da histona H3K4me3 entre as pacientes avaliadas.



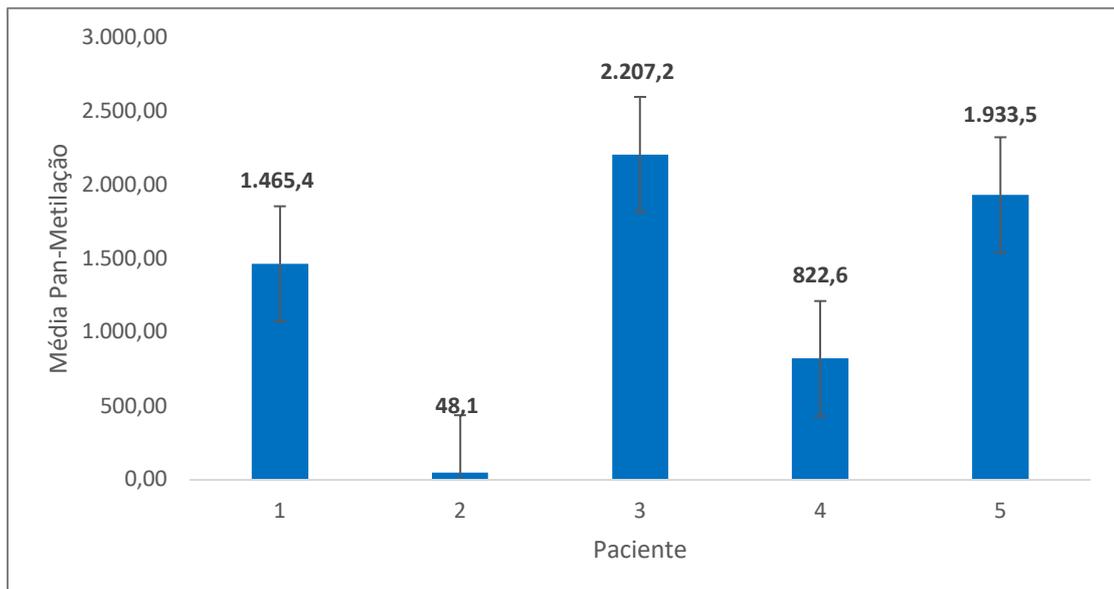
Fonte: Jezini, D.L.

Gráfico 9- Pan-metilação média da histona H3K9me3 entre as pacientes avaliadas.



Fonte: Jezini, D.L.

Gráfico 10 - Pan-metilação média da histona H3K27me3 das pacientes avaliadas.



Fonte: Jezini, D.L.

Considerando a análise de variância entre as regiões de um mesmo indivíduo, observou-se que não houve diferença significativa ao nível de 5% de significância, nos padrões médio de metilação da H3K4me3, H3K9me3 e H3K27me3 ($p > 5\%$). Isso significa que por indivíduo, os padrões médios da pan-metilação das histonas das diferentes regiões da glândula são

praticamente similares entre si (Tabela 11), (Gráficos 11; 12 -13 p. 86).

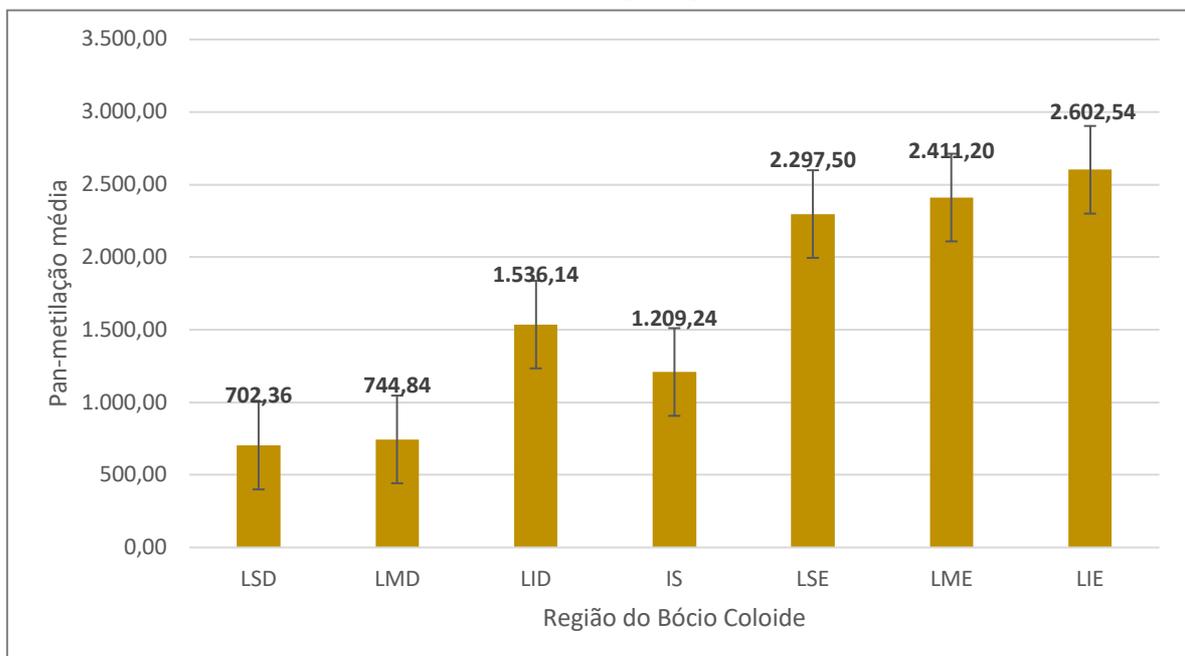
Tabela 11 - Análise descritiva e de variância da pan-metilação das histonas considerando a região da tireoide como fator de variabilidade

Histona	Região	Medidas Descritivas					p**
		n*	Média	dp	Mínimo	Máximo	
H3K27	LSD	3	499,29	430,75	10,11	821,81	0,461
	LMD	2	194,95	293,75	-12,77	402,66	
	LID	4	1.342,69	919,27	-6,91	1.957,45	
	IS	3	1.068,26	1.508,94	107,45	2.807,45	
	LSE	5	1.713,09	968,55	165,43	2.827,66	
	LME	5	1.519,26	976,51	69,68	2.590,96	
	LIE	3	1.227,84	1.065,38	3,72	1.945,74	
H3K4	LSD	3	702,36	595,93	15,76	1.085,33	0,122
	LMD	2	744,84	1.043,37	7,07	1.482,61	
	LID	4	1.536,14	1.355,22	31,52	3.318,48	
	IS	3	1.209,24	1.491,42	146,20	2.914,13	
	LSE	5	2.297,50	1.419,41	17,93	3.554,89	
	LME	5	2.411,20	1.438,41	102,72	3.585,33	
	LIE	3	2.602,54	2.235,11	22,28	3.941,85	
H3K9	LSD	3	275,69	248,18	1,04	483,85	0,188
	LMD	2	292,45	423,16	-6,77	591,67	
	LID	4	892,45	604,69	23,96	1.392,19	
	IS	3	641,32	570,07	218,23	1.289,58	
	LSE	5	1.005,42	576,13	13,02	1.500,52	
	LME	5	1.513,33	1.262,65	91,15	3.071,35	
	LIE	3	1.625,35	1.398,12	12,50	2.493,23	

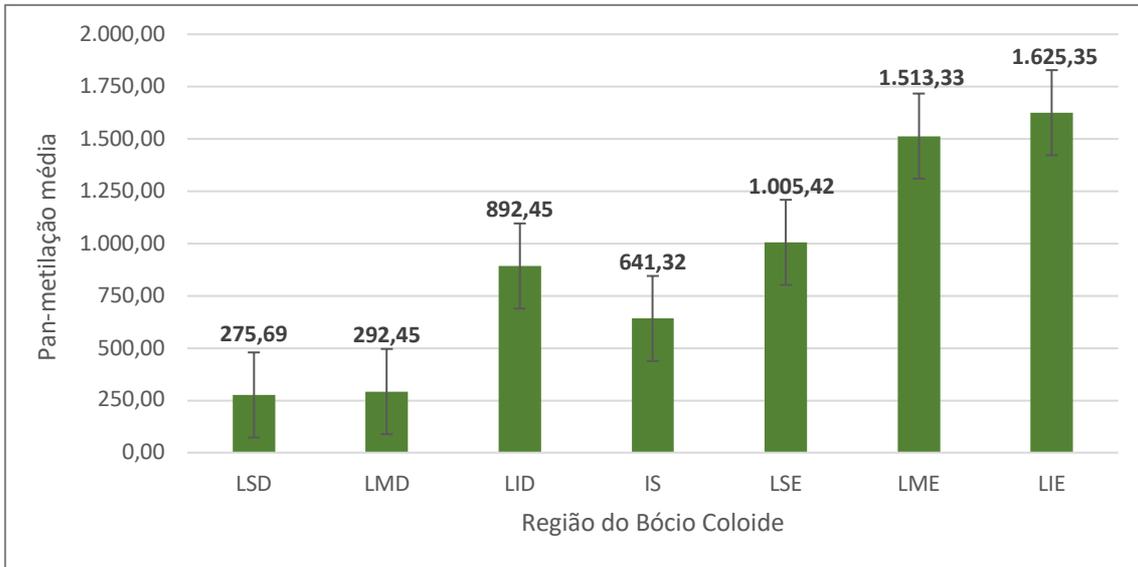
* Total de pacientes

** Valores de p são significativos para $p < 0,05$ (5%) - Análise de Variância

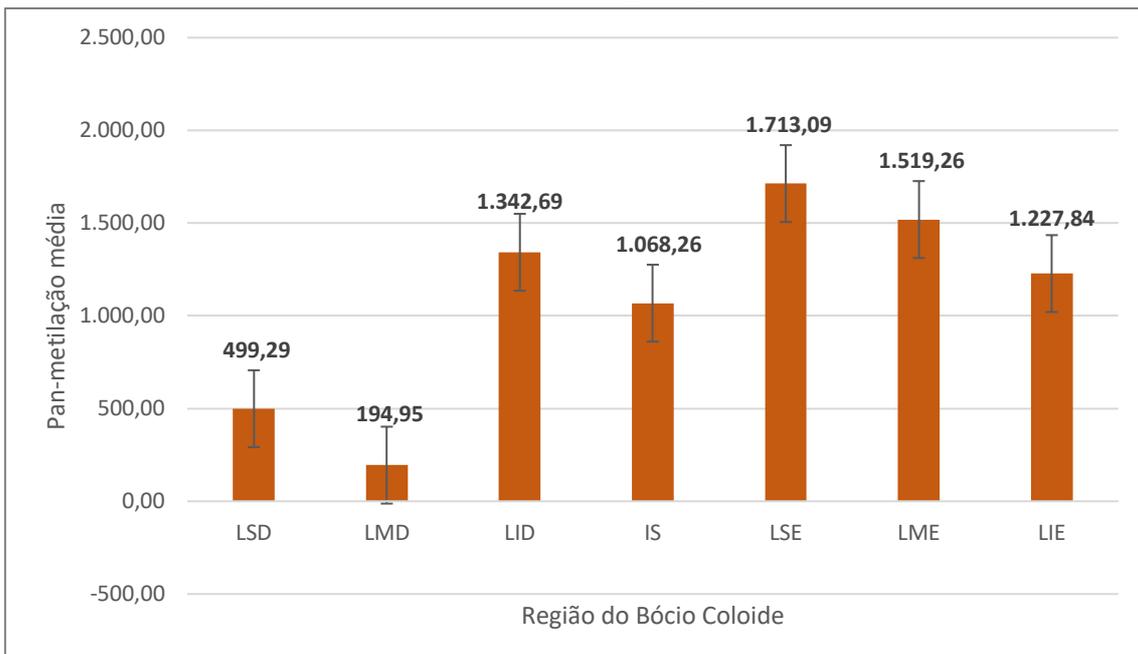
Gráfico 11 - Pan-metilação média da histona H3K4me3 por região do bório.



Fonte: Jezini, D.L.

Gráfico 12 - Pan-metilação média da histona H3K9me3 por região do bório.

Fonte: Jezini, D.L.

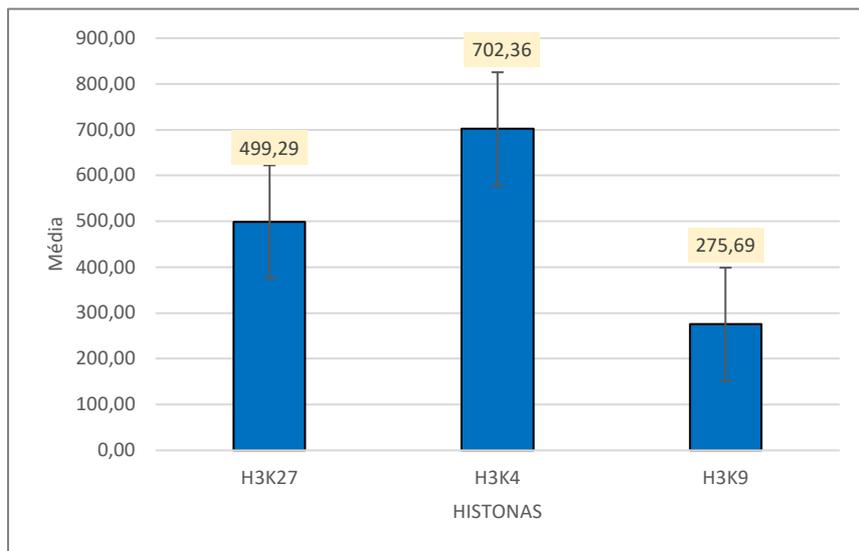
Gráfico 13 - Pan-metilação média da histona H3K27me3 por região do bório.

Fonte: Jezini, D.L.

Considerando a pan-metilação das histonas por região da glândula, os achados foram praticamente similares entre si. (Gráficos 14-15; Gráficos 16–18, p. 88; Gráficos 19-20, p. 89).

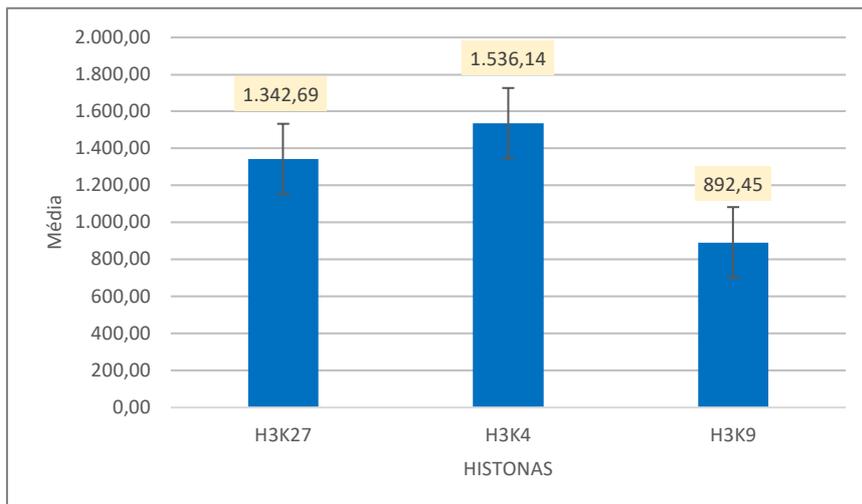
Pan-metilação média das histonas por região de bócio

Gráfico 14– Região do lobo superior direito (LSD) por histona estudada.



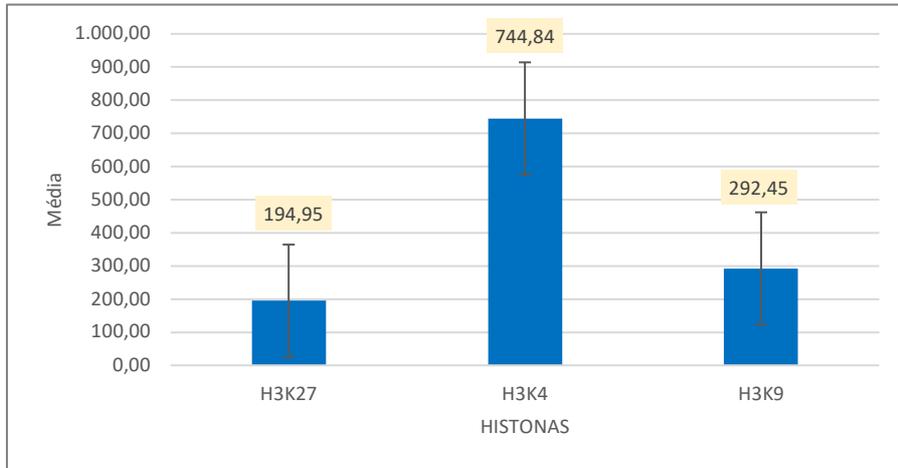
Fonte: Jezini, D.L.

Gráfico 15 - Região do lobo superior inferior direito (LID) por histona estudada.



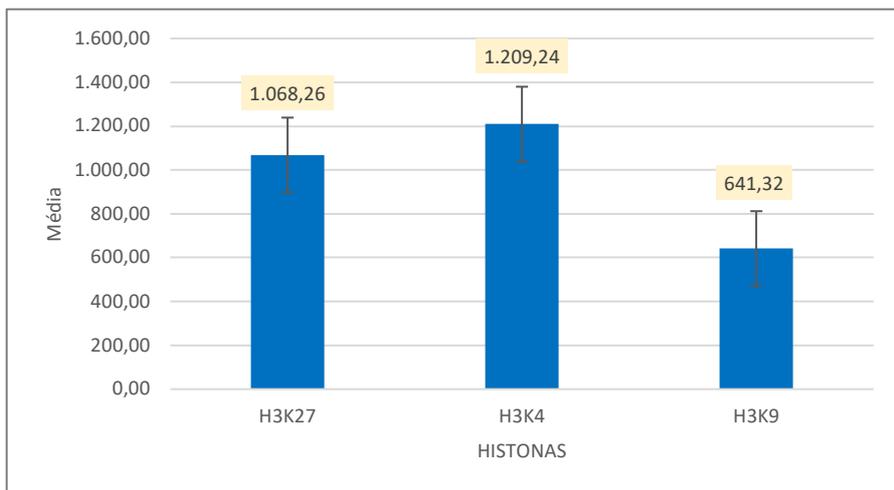
Fonte: Jezini, D.L.

Gráfico 16 – Região do lobo superior médio direito (LMD) por histona estudada.



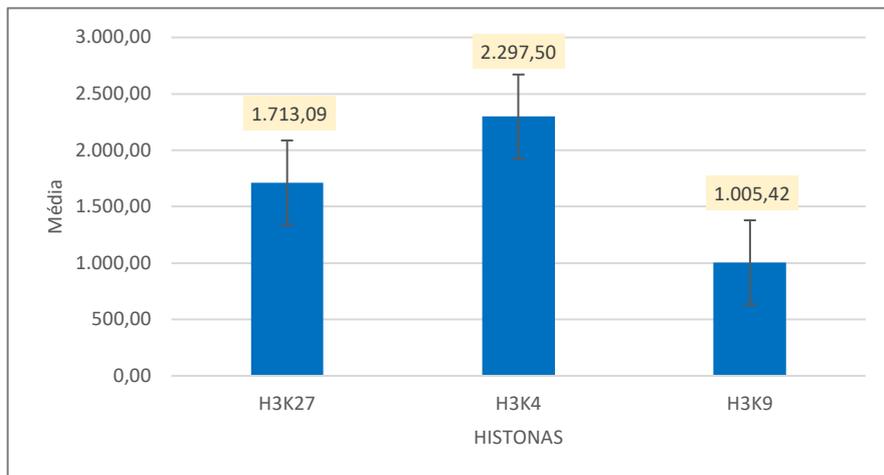
Fonte: Jezini, D.L.

Gráfico 17 - Região do istmo superior (IS) por histona estudada.



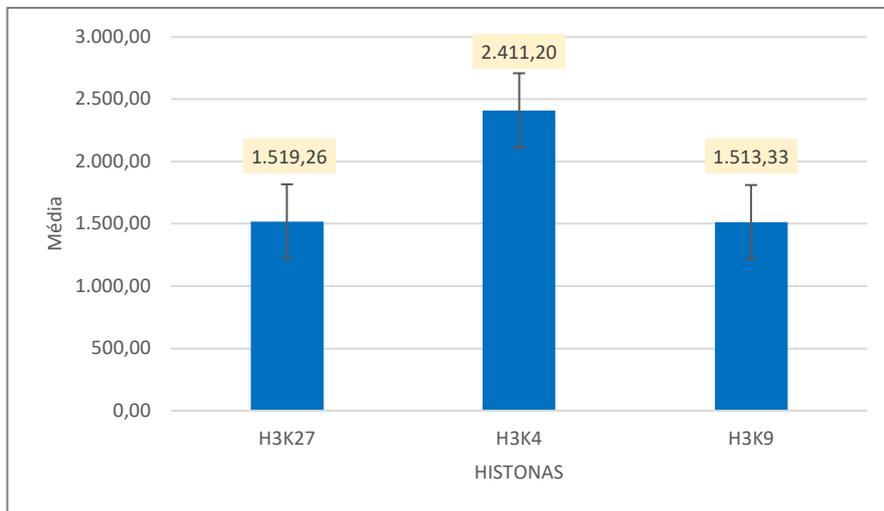
Fonte: Jezini, D.L.

Gráfico 18– Região do lobo superior esquerdo (LSE) por histona estudada.



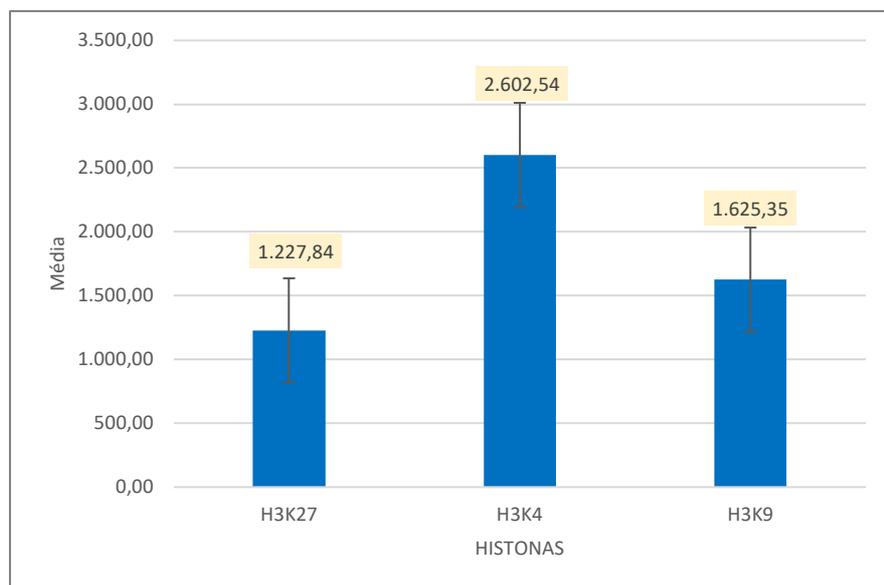
Fonte: Jezini, D.L.

Gráfico 19- Região do lobo médio esquerdo (LME) por histona estudada.



Fonte: Jezini, D.L.

Gráfico 20- Região do lobo inferior esquerdo (LIE) por histona estudada.



Fonte: Jezini, D.L.

Todas as correlações entre a metilação do DNA com as histonas foram negativas. Isso significa que quando a metilação do DNA diminui a das histonas também diminui. Entretanto, essa correlação entre a metilação e as histonas não foi significativa, ao nível de 5% de

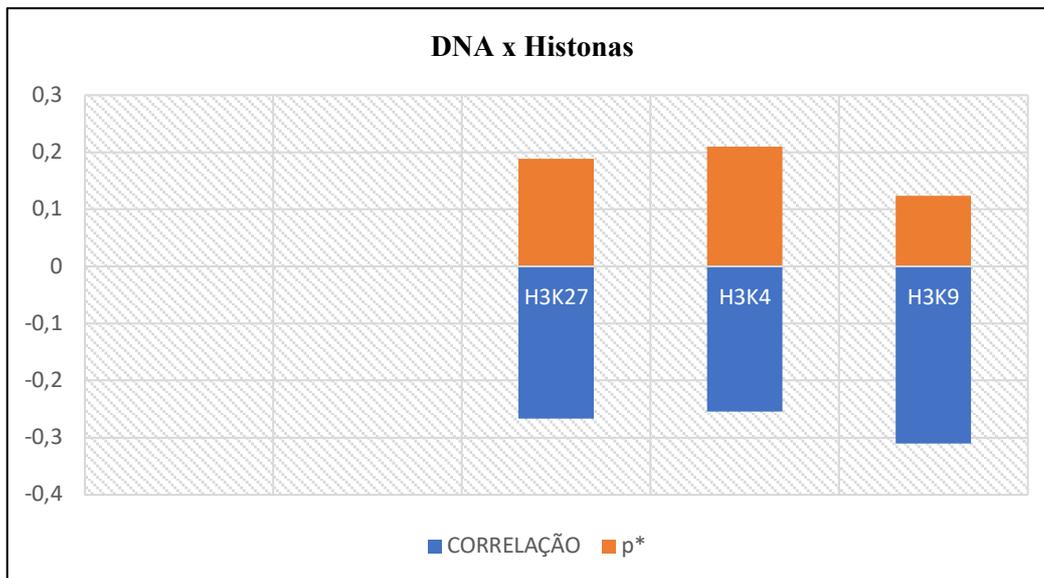
significância. Mas a correlação entre a metilação do DNA e a histona H3K9 demanda atenção, pois um pequeno aumento no tamanho da amostra talvez evidencie que a correlação entre ambos é significativa (Tabela12), (Gráfico 21).

Tabela 12 - Correlação entre a metilação do DNA com a metilação das Histonas H3K27, H3K4 e H3K9

Histonas	Correlação	p*
H3K27	-26,7%	0,188
H3K4	-25,4%	0,21
H3K9	-31,0%	0,124

* Valores de p são significativos para $p < 0,05$ (5%) - Coeficiente de Correlação de Pearson

Gráfico 21. Correlação entre a metilação do DNA com as histonas H3K27me3, H3K4me3 e H3K9me3.



Fonte: Jezini, D.L.

A participação da epigenética na gênese do BC parece ser cada vez mais evidente, documentada neste trabalho pela presença de padrões aberrantes de metilação global do DNA e da histona 3 nas lisinas 4, 9 e 27, em praticamente todas as regiões anatômicas da tireoide das pacientes estudadas. Estes microambientes encontrados, inicialmente semelhantes aos descritos em vários tipos de câncer, podem ser resultantes de algum determinante etiológico comum às duas patologias, corresponder às variações de apresentação clínica ou ao risco do BC sofrer transformação maligna.

Apesar de estudos complementares serem necessários para a identificação do que está gerando estes padrões aberrantes de metilação no BC e quais genes e/ou vias metabólicas participam do processo, do ponto de vista estatístico, os resultados merecem atenção, pois ambas modificações epigenéticas são inéditas no BC. Os padrões médios de metilação global do DNA se apresentaram semelhantes em todos os bócios estudados, não demonstrando predileção por regiões da tireoide, e os padrões médios da pan-metilação da histona 3 nas três lisinas (H3K4, H3K9 e H3K27), os resultados diferiram apenas entre as pacientes, mas se mostraram semelhantes em todas as regiões da glândula. Ressaltando que, aparentemente na paciente 2 (28) nenhuma das histonas estava pan-metilada, e na paciente 1(21), as histonas todas se mostravam mais expressas que nas demais.

Mesmo com os estudos em epigenética do BC sendo escassos na literatura, as metilações aberrante, ou seja, muito além dos padrões comumente encontrados nos tecidos normais, tanto de DNA como de histonas, que participam de silenciamentos ou ativação de genes, são pouco descritas em patologias benignas, sendo amplamente documentadas na gênese do câncer (BAYLIN; JONES, 2011), indicando mais uma vez, que em alguma etapa do processo da gênese do BC, pode se assemelhar ao campo epigenético que precede o câncer.

Além disso, sabemos que todo tecido biológico em condições patológicas sofre mudanças, geradas a partir de alterações moleculares induzidas por fatores intrínsecos e/ou extrínsecos. Estas mudanças podem se traduzir em variáveis teciduais complexas e progressivas, as proliferações hiperplásicas, neoplásicas sem ou com indiferenciação celular e perda dos limites, e consequente atribuição às células da capacidade de invasão e metástases à distancia, sendo um desafio reconhecer as margens precisas de segurança entre o tecido normal e o maligno (PALACIO-TORRALBA *et al.*, 2017).

O DNA sofre metilação de forma distinta a nível tecidual, determinada pela expressão de genes específicos que regulam a transcrição e que controlam a especificidade dos tecidos ou células, indicando que cada tipo apresenta um perfil único de metilação do DNA, como os padrões de metilações encontrados no câncer ou nas linhagens de células embrionárias humanas, sendo observado que modificações epigenéticas podem ser comuns a determinada resposta ou expressão gênica, como descrita na histona 3 (H3), que apesar dos mecanismos não serem bem esclarecidos, existe franca associação da trimetilação da H3K27 com apoptose celular e repressão gênica. (YAGI et al., 2008).

Na carcinogênese, a metilação aberrante do DNA e da histona H3K4, H3K9 e H3K27, desempenham papéis importantes nas principais etapas de transformação maligna dos tecidos, pois modificam diretamente a transcrição por meio do silenciamento de genes supressores de tumores ou através de miRNAs, como nos casos de leucemia linfocítica crônica, carcinoma de ovário, mama e melanoma maligno (ESTELLER, 2011; DAWSON; KOUZARIDES, 2012). Com isso, algumas modificações epigenéticas podem ser utilizadas no futuro como biomarcadores de detecção de vários tipos de câncer (NI; YE; HUANG, 2017).

Metilações aberrantes do DNA também são descritas no câncer humano relacionado às infecções virais ou bacterianas, como no câncer de fígado, estômago, nasofaringe e de cabeça e pescoço, como parte integrante do "campo epigenético de cancerização" resultante da ação indireta exercida pela inflamação crônica ou pela ação direta, principalmente de vírus, sobre a maquinaria epigenética das células hospedeiras (HATTORI; USHIJIMA, 2016).

Existem também evidências de que ocorra a reprogramação metabólica de células com transformação maligna, com o objetivo de recriar um microambiente propício ao desenvolvimento do câncer no estágio inicial da doença, cujas necessidades são proeminentes de maior perfusão sanguínea, aporte de oxigênio e nutrientes, pH ideal, fatores de oxidação e inflamação tecidual, todos controlados por genes que sofreram modificações genéticas ou epigenéticas durante o processo (SATOH *et al.*, 2017).

O mecanismo dominante da instabilidade genômica das células é o desequilíbrio da metilação do DNA, pelo fato de ser a modificação mais determinante na regulação da biologia de tumores, tanto em fenótipos de hipometilação quanto de hipermetilação, correspondendo a regulação anormal e interação de um grande número de fatores de transcrição que levam ao comportamento neoplásico maligno, como mudanças estruturantes, aumento da proliferação celular, redução da apoptose e capacidade do tumor em invadir tecidos adjacentes ou migrar

em metástases para outros órgãos, como documentado em estudos com animais experimentais (Figura 26) (CONERLY, M., & GRADY, 2010; ESPADA; ESTELLER, 2013).

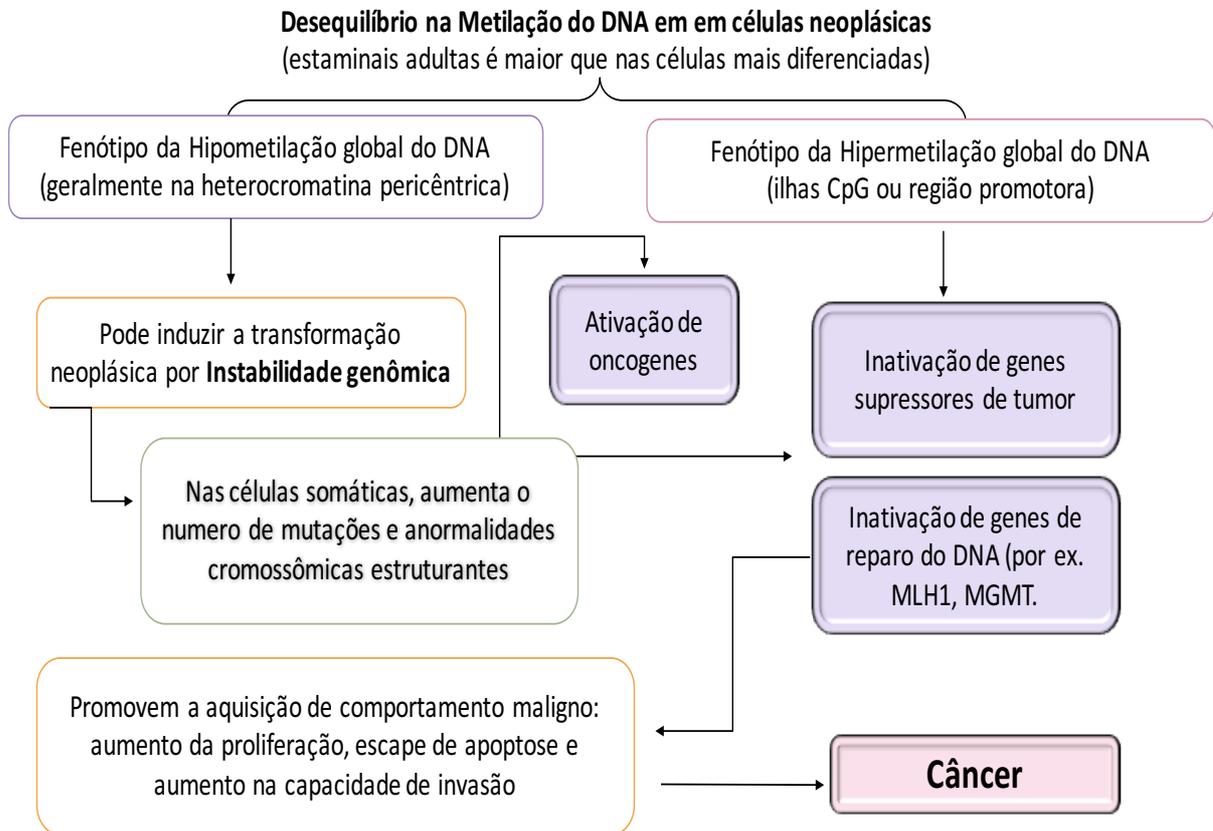


Figura 26: Desequilíbrio de metilação do DNA no Câncer. **Fonte:** Conerly, M., & Grady, W. M., 2010.

Com o advento de técnicas de sequenciamento após tratamento com bissulfito de baixa representação (RRS), complementadas com *RNA-seq* e *ChIP-seq illumina*, se consegue identificar o perfil de metilação do DNA de vários genes ao mesmo tempo, permitindo reconhecer redes de ligação entre eles, como descrito em pesquisa que estudou 82 tipo de tecidos humanos, oriundos da placenta, cérebro e músculo esquelético, onde foi observado que a hipermetilação era presente nos genes envolvidos nos cânceres originários de células progenitoras, e a hipometilação, nas alterações de telômeros e centrômeros. Nas amostras não cancerosas foram vistos padrões específicos de metilação somente em tecidos celulares primários ou estaminais, porém sem perfil aberrante (VARLEY et al., 2013).

Outro estudo utilizando técnica de *ChIP-sequence*, observou ser possível a existência da presença simultânea num único promotor da histona 3 trimetilada nas lisinas 4 e 27 (H3K4me3 e H3K27me3), nos chamados domínios bivalente, provavelmente relacionados ao equilíbrio da expressão gênica ativa e da instabilidade genômica das células durante o desenvolvimento, como necessária aos genes *Hox*. As marcas H3K4me3 e H3K27me3 podem estar presentes em diferentes conformações de forma assimétrica no mesmo nucleossomo. No entanto, ainda necessita de estudos complementares para ser melhor interpretada (VOIGT; TEE; REINBERG, 2013).

A metilação das histonas, principalmente a H3K4me3 pode ativar rapidamente a zona promotora de genes regulados pelo p53, a partir da interação com proteínas específicas envolvidas na formação do complexo da pré-inicialização (PIC), ou seja, em condições de estresse genotóxico a H3K4me3 aumenta os fatores de transcrição positivos e bloqueia os negativos na dependência de p53, aumentando a instabilidade celular e aumentando o risco de transformação maligna (LAUBERTH et al., 2013).

Existem ainda algumas variáveis longas da H3K4me3, responsáveis por indicar o aumento da atividade de alongamento e intensificação da transcrição. Ação esta conservada em células normais, mas ativada em genes supressores de tumores no câncer em geral, enquanto a H3K4me3 larga do tipo celular ser relacionada a genes de identidade celular e de atividade supressora de tumores específicos em determinadas células (CHEN et al., 2015).

Na tireoide, as lesões foliculares de origem maligna ou benigna apresentam características citológicas semelhantes, não sendo incomum achados de sobreposição entre elas. Segundo alguns autores, o BC pode ser considerado lesão precursora do carcinoma folicular da tireoide pela provável participação epigenética no processo de diferenciação celular, perda da apoptose ou das condições para mutações em genes do tipo *drivers* (YASUOKA et al., 2017).

Relatos recentes de modificações epigenéticas, que são observadas comumente no carcinoma folicular da tireoide, foram descritas em adenomas foliculares, como os miRNAs de interferência, modificações na expressão do oncogene *PTEN*, regulador negativo da via de sinalização da PI3K-AKT (*phosphoinositide-3-kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene homologue*), e do gene *CDKN1A*, inibidor da quinase 1 dependente de ciclina, por meio da sinalização via NF- κ B, regulação de gene-alvo pelo *CDKN1B* (controlador o ciclo celular) e do gene *RECK* (inibidor de *metaloprotease*), ambas alterações responsáveis pela transformação

maligna das células foliculares, comportamento agressivo e desdiferenciação anaplástica (RODRÍGUEZ-RODERO et al., 2017).

Embora os grandes estudos de epigenomas de referência publicados ainda não incluíssem tecidos tireoidianos humanos normais ou patológicos (ROADMAP EPIGENOMICS CONSORTIUM et al., 2015), recentemente utilizando a técnica de ChIP-seq, foi documentada a caracterização do epigenoma de algumas espécimes de patologias da tireoide (dois adenomas foliculares, um bócio coloide e um carcinoma papilífero), sendo observado seis modificações de histonas em quatro marcas ativadoras (H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac e H3K36me3) e duas marcas reprimidas (H3K9me3 e H3K27me3) (SIU *et al.*, 2017).

As influências da metilação global do DNA e das histonas diretamente na gênese do BC implica em ampliação de novos estudos, com técnicas mais específicas e de sequenciamento de alta performance, com o propósito de determinar os genes envolvidos.

Finalmente, os achados deste trabalho podem contribuir para mudar o paradigma de que achados moleculares de metilação aberrante de DNA e histonas ocorreriam somente em patologias ligadas à malignidade, e que o BC resulta de um estado de mudanças epigenéticas sendo de potencial risco ou se comporta como lesão precursora da transformação maligna em alguns indivíduos, podendo sugerir a interferência destas alterações na progressão da doença (Figura 27). Contudo, estudos complementares são necessários para esclarecer melhor quais genes podem estar silenciados ou ativados, e confirmar esta informação.

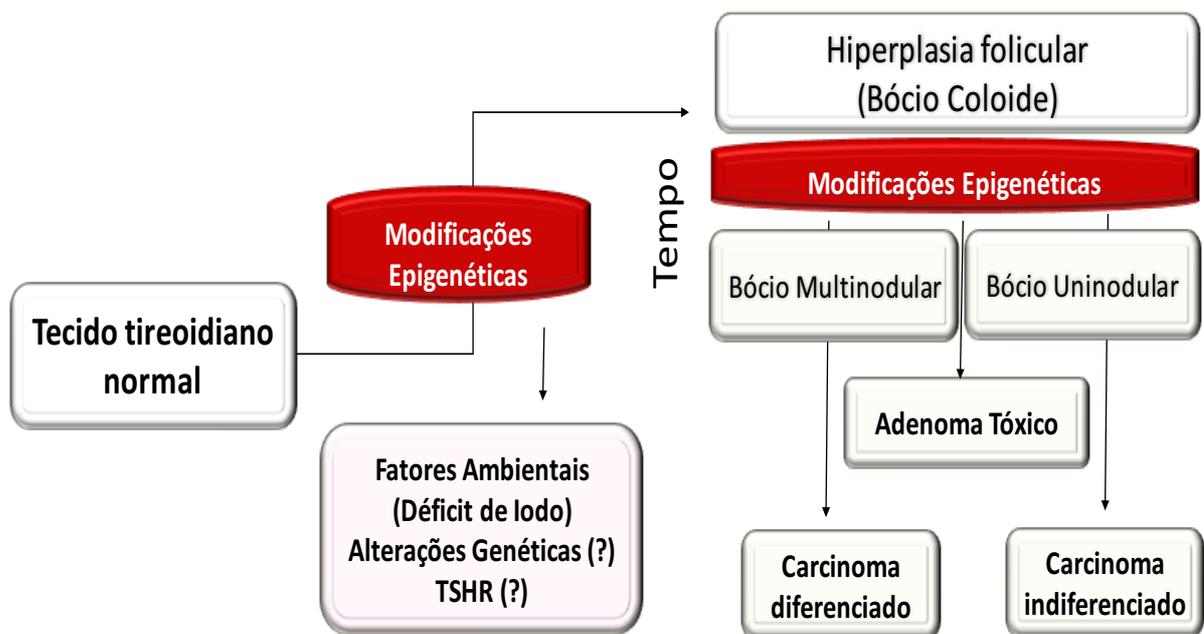


Figura 27: Sugestão da rota de modificações epigenéticas que podem ocorrer no bócio coloide e a progressão a variáveis teciduais. Fonte: Jezini, DL.

Nos últimos anos, a epigenética certamente se tornou uma área do conhecimento muito importante no esclarecimento de inúmeras patologias em que o ambiente prepondera como gatilho. No BC, os estudos epigenéticos disponíveis na literatura são escassos, porém se mostravam necessários, uma vez que o BC é considerada endêmico na nossa região.

Mapear a metilação do DNA e da histona 3 nas lisinas 4, 9 e 27 nas diferentes regiões da tireoide de cinco espécimes de BC, trouxe novas perspectivas à elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos, com resultados que merecem ser complementados em estudos futuros, focados na compreensão da gênese e manutenção destes padrões anormais encontrados, além disso, quebram o paradigma de que as metilações aberrantes não estão presentes em patologias consideradas benignas.

Apesar dos bócios selecionados apresentarem o parênquima bem heterogêneo, inclusive com dois deles associados ao adenoma folicular e um ao carcinoma papilífero da tireoide, os achados não mostraram diferenças significativas do ponto de vista estatístico, denotando que todas as regiões estudadas das cinco pacientes, expressaram padrões semelhantes de metilação do DNA e das histonas pelo método empregado.

A metilação do DNA, marca epigenética tradicionalmente considerada muito estável, e na maioria da vezes relacionada ao silenciamento gênico, foi igualmente elevada nas pacientes estudadas. Nos resultados das modificações das histonas, a ocorrência num mesmo indivíduos de padrões médios da H3K4me3, H3K9me3 e H3K27me3 são praticamente similares entre si, diferindo apenas entre os indivíduos, sugerindo que haja fatores desencadeantes comuns ou que podem corresponder às variáveis de expressão teciduais encontradas no BC. As correlações entre a metilação do DNA e as histonas estudadas foram negativas, significando que quando a metilação do DNA diminui a das histonas também diminui, necessitando expansão do tamanho das amostras para se verificar a importância do tal achado.

Com o avanço tecnológicos e de bioinformática, torna-se cada vez mais clara a importância das aplicações futuras das epigenética no conhecimento da gênese do BC, como também dos genes e mecanismos envolvidos nos processos. Portanto, apesar da necessidade de estudos complementares, os achados deste trabalho podem contribuir para pesquisas futuras que melhorem o diagnóstico precoce da transformação tecidual e o tratamento do BC.

- ALBERTS, B. **Molecular Biology of the Cell**. 6a. ed. New York and Abingdon, UK: [s.n.].
- ALLIS, C. D.; JENUWEIN, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. **Nat Rev Genet**, v. 17, n. 8, p. 487–500, ago. 2016.
- ANDERSSON, M.; BENOIST, B. DE; ROGERS, L. Epidemiology of iodine deficiency : Salt iodisation and iodine status. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 24, n. 1, p. 1–11, 2010.
- BAYLIN, S. B.; JONES, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 10, p. 726–34, 2011.
- BELL, C. G.; BECK, S. The epigenomic interface between genome and environment in common complex diseases. v. 9, n. 6, 2010.
- BENOIST, B. DE et al. Iodine deficiency in 2007 : Global progress since 2003. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 29, n. 3, p. 195–202, 2008.
- BHUTANI, N.; BURNS, D. M.; BLAU, H. M. DNA demethylation dynamics. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 866–872, 2011.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, p. 6–21, 2002.
- BIRD2, R. J. A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, v. 33, n. 7, p. 481–514, 2003.
- BISHOP, K. S.; FERGUSON, L. R. The interaction between epigenetics, nutrition and the development of cancer. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 922–947, 2015.
- BOHACEK, J.; MANSUY, I. M. Epigenetic Inheritance of Disease and Disease Risk. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 220–236, 2013.
- BOTELHO, J.B; JEZINI, D.L.; CARVALHO, D. M. **Tratamento Cirúrgico do Bócio de Grande Volume**. 1a. ed. Manaus/AM: ARTMED/PANAMERICANA EDITORA LTDA, 2013.
- BOTELHO, J. B. ISBN: 978-85-7401-426-5. 1a. ed. Manaus, AM: ADUA, 2012.
- BRENT, G. A. Mechanisms of thyroid hormone action. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 9, p. 3035–3043, 2012.
- BROWN, T. C. et al. Frequent Silencing of RASSF1A via Promoter Methylation in Follicular Thyroid Hyperplasia. **JAMA Surgery**, v. 149, n. 11, p. 1146, 2014.

BURNIAT, A. et al. Gene expression in RET/PTC3 and E7 transgenic mouse thyroids: RET/PTC3 but not E7 tumors are partial and transient models of human papillary thyroid cancers. **Endocrinology**, v. 149, n. 10, p. 5107–5117, 2008.

CABRAL, J. M. **Doenças da tireoide: como diagnosticar e tratar**. 1a. ed. Manaus/AM: [s.n.].

CARABALLO, M. C.-C.; MONTEIRO, B.; FLORES, I. H3K27me3 is an Epigenetic Mark of Relevance in Endometriosis. v. 22, n. 9, p. 1134–1142, 2015.

CHEN, K. et al. Broad H3K4me3 is associated with increased transcription elongation and enhancer activity at tumor suppressor genes. **HHS Public Access**, v. 47, n. 10, p. 1149–1157, 2015.

CHEN, V.; PAISLEY, J.; LU, X. Revealing common disease mechanisms shared by tumors of different tissues of origin through semantic representation of genomic alterations and topic modeling. **BMC Genomics**, v. 18, n. S2, p. 105, 2017.

COLORIMETRIC, H. Q. K.; P-, B. C. **EpiQuik™ Global Pan -Methyl Histone Complete Solutions for Epigenetics**, 2015.

CONERLY, M., & GRADY, W. M. Insights into the role of DNA methylation in disease through the use of mouse models. **Disease Models & Mechanisms**, v. 3, n. 5–6, p. 290–297, 2010.

COPPEDÈ, F. Epigenetics and Autoimmune Thyroid Diseases. v. 8, n. June, 2017.

COYLE, K. M.; BOUDREAU, J. E.; MARCATO, P. Genetic Mutations and Epigenetic Modifications: Driving Cancer and Informing Precision Medicine. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

DAWSON, M. A.; KOUZARIDES, T. Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 12–27, 2012.

DE KOCK, L. et al. Deep sequencing reveals spatially distributed distinct hot spot mutations in DICER1-related multinodular goiter. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 101, n. 10, p. 3637–3645, 2016.

DELANGE F, DE BENOIST B, PRETELL E, D. J. 2001 I. DEFICIENCY IN THE WORLD: WHERE DO WE STAND AT THE TURN OF THE CENTURY? T. 11:437–447. Iodine deficiency in the world: where do we stand at the turn of the century? **Thyroid** 1, v. 11, p. 437–447, 2004.

DHE-PAGANON, S.; SYEDA, F.; PARK, L. Review Article DNA methyl transferase 1: regulatory mechanisms and im- plications in health and disease. **Journal of Biochemistry and**

- Molecular Biology**, v. 2, n. 1, p. 58–66, 2011.
- DOHAN, O. et al. The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Characterization, Regulation, and Medical Significance. v. 24, n. 1, p. 48–77, 2003.
- DOMENE, H. M. et al. Very Early Detection of RET Proto-Oncogene Mutation Is Crucial for Preventive Thyroidectomy in Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 Children Presence of C-Cell Malignant Disease in Asymptomatic Carriers. 2002.
- DU, J. et al. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 9, p. 519–532, 2015.
- DUMONT, J. **Ontogeny , Anatomy , Metabolism and Physiology of the Thyroid**, 2011. (Nota técnica).
- DUNTAS, L. H. Selenium and the Thyroid : A Close-Knit Connection. v. 95, n. December, p. 5180–5188, 2010.
- ENCODE CONSORTIUM. An Integrated Encyclopedia of DNA Elements in the Human Genome. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 57–74, 2012.
- ERICKSON, A.; MOREAU, R. The regulation of FGF21 gene expression by metabolic factors and nutrients. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 0, n. 0, 2016.
- ESPADA, J.; ESTELLER, M. Mouse models in epigenetics: Insights in development and disease. **Briefings in Functional Genomics**, v. 12, n. 3, p. 279–287, 2013.
- ESTELLER, M. Epigenetics in Cancer. p. 1–12, 2008.
- ESTELLER, M. Non-coding RNAs in human disease. **Nature reviews. Genetics**, v. 12, n. 12, p. 861–74, 2011.
- FAAM, B. et al. Epigenetic modifications in human thyroid cancer (Review). **Biomedical Reports**, p. 3–8, 2014.
- FIGLIORE, E.; TONACCHERA, M.; VITTI, P. Influence of iodization programmes on the epidemiology of nodular goitre. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 4, p. 577–588, 2014.
- FORBES, S. A. et al. COSMIC : mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. v. 39, n. October 2010, p. 945–950, 2011.
- FOUNTOULAKIS, S.; PHILIPPOU, G.; TSATSOULIS, A. The role of iodine in the evolution of thyroid disease in Greece : from endemic goiter to thyroid autoimmunity. v. 6, n. 1, p. 25–35, 2007.
- FURLOW, J. D.; NEFF, E. S. A developmental switch induced by thyroid hormone : *Xenopus*

- laevis metamorphosis. **TRENDS in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, n. 2, 2006.
- GALUPA, R.; HEARD, E. X-chromosome inactivation: New insights into cis and trans regulation. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 31, p. 57–66, 2015.
- GIETKA-CZERNEŁ, M. The thyroid gland in postmenopausal women: physiology and diseases. v. 16, n. 2, p. 33–37, 2017.
- GODFREY, K. M.; COSTELLO, P. M.; LILLYCROP, K. A. The developmental environment, epigenetic biomarkers and long-term health. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 6, n. 5, p. 399–406, 2015.
- GOEL, R. et al. A Signaling Network of Thyroid-Stimulating Hormone. **J Proteomics Bioinform**, n. 4, p. 8, 2013.
- GOLL, M. G.; BESTOR, T. H. Eukaryotic Cytosine Methyltransferases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 481–514, 2005.
- GREWAL, S. I. S.; JIA, S. Heterochromatin revisited. v. 8, n. January, p. 35–46, 2007.
- HASHIMOTO, H. et al. UHRF1, a modular multi-domain protein, regulates replication-coupled crosstalk between DNA methylation and histone modifications. **Epigenetics**, v. 4, n. 1, p. 8–14, 2009.
- HATTORI, N.; USHIJIMA, T. Epigenetic impact of infection on carcinogenesis: mechanisms and applications. **Genome Medicine**, v. 8, n. 10, p. 1–13, 2016.
- HAUGEN, B. R. et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. **Thyroid**, v. 26, n. 1, p. 1–133, 2016.
- HOCHMAN, G. O sal como solução? Políticas de saúde e endemias rurais no Brasil (1940-1960) 1. p. 158–193, 2010.
- HODJAT, M. et al. Environmental toxicants, incidence of degenerative diseases, and therapies from the epigenetic point of view. **Arch Toxicol**, v. 91, p. 2577–2597, 2017.
- HOELZER, K.; SHACKELTON, L. A.; PARRISH, C. R. Presence and role of cytosine methylation in DNA viruses of animals. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 9, p. 2825–2837, 2008.
- HOLLIDAY, R. Epigenetics: A historical overview. **Epigenetics**, v. 1, n. 2, p. 76–80, 2006.
- INCA/BRASIL. **Incidência do Câncer no Brasil**, 2016.
- ITTERMANN, T. et al. Smoking as a risk factor for thyroid volume progression and incident

goiter in a region with improved iodine supply. p. 761–766, 2008.

JABLONKA, E.; LAMM, E. Commentary : The epigenotype — a dynamic network view of development. **International Journal of Epidemiology**, n. December, p. 16–20, 2012.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, v. 33, n. 3s, p. 245–254, 2003.

JERONIMO, C.; ROBERT, F. The Mediator Complex : At the Nexus of RNA Polymerase II Transcription. **Trends in Cell Biology**, v. xx, p. 1–19, 2017.

KARAKÖSE, M. et al. Frequency of nodular goiter and autoimmune thyroid disease and association of these disorders with insulin resistance in polycystic ovary syndrome. **Journal of the Turkish-German Gynecological Association**, p. 85–89, 2017.

KNOBEL, M. Etiopathology , clinical features , and treatment of diffuse and multinodular nontoxic goiters. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 39, n. 4, p. 357–373, 2016.

KNUDSEN, N.; BRIX, T. H. Genetic and non-iodine-related factors in the aetiology of nodular goitre. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 4, p. 495–506, 2014.

KOHRLE, J.; GARTNER, R. Selenium and thyroid. v. 23, p. 815–827, 2009.

KONDO, T.; EZZAT, S.; ASA, S. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. v. 6, n. April, p. 292–306, 2006.

KRAUTKRAMER, K. A. et al. Diet-Microbiota Interactions Mediate Global Epigenetic Programming in Multiple Host Tissues. **Molecular Cell**, v. 64, n. 5, p. 982–992, 2016.

KROHN, K. et al. Molecular Pathogenesis of Euthyroid and Toxic. v. 26, n. 4, p. 504–524, 2005.

KRONENBERG, H. et al. Fisiologia da tireoide e avaliação diagnóstica de pacientes com doenças tireoidianas. In: ELSEVIER (Ed.). . **Williams Tratado de endocrinologia**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd, 2010. p. 1532.

LABBÉ, R. M.; HOLOWATYJ, A.; YANG, Z. Histone lysine demethylase (KDM) subfamily 4 : structures , functions and therapeutic potential. v. 6, n. 1, p. 1–15, 2014.

LAUBERTH, S. M. et al. H3K4me3 interactions with TAF3 regulate preinitiation complex assembly and selective gene activation. **Cell**, v. 152, n. 5, p. 1021–1036, 2013.

LEVIN, H. L.; MORAN, J. V. Hosts. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 9, p. 615–627, 2011.

LI, M.; EASTMAN, C. The changing epidemiology of iodine deficiency. p. 1–7, 2012.

LIFE TECHNOLOGIES. PureLink ® Genomic DNA Kits For purification of genomic DNA. n.

25, p. 1–48, 2013.

LIN, P. et al. Epigenetic effects and molecular mechanisms of tumorigenesis induced by cigarette smoke: An overview. **Journal of Oncology**, v. 2011, 2011.

LONG, H. et al. The critical role of epigenetics in systemic lupus erythematosus and autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 74, p. 118–138, 2016.

MANOLE, D. et al. Estrogen Promotes Growth of Human Thyroid Tumor Cells by Different Molecular Mechanisms *. v. 86, n. 3, p. 1072–1077, 2001.

MCINNES, R. R.; MICHAUD, J. Development of the thyroid gland : lessons from congenitally hypothyroid mice and men. n. 7, p. 445–455, 2003.

MEDEIROS-NETO, G. Bócio Multinodular FISIOPATOLOGIA. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 42, n. 4, p. 14–18, 1998.

MEDEIROS-NETO, G. Iodine nutrition in Brazil: where do we stand? p. 470–474, 2009.

MINUCCI, S.; PELICCI, P. G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. January, 2006.

MOCHIZUKI, K. et al. Relationship between epigenetic regulation, dietary habits, and the developmental origins of health and disease theory. **Congenital Anomalies**, p. 1–7, 2017.

MOHAN, A. et al. Gene expression in the aging human brain: An overview. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 29, n. 2, p. 159–167, 2016.

MOLETI, M. et al. Female Reproductive Factors and Differentiated Thyroid Cancer. v. 8, n. May, 2017.

MONTEIRO, J. ET AL. Endometriosis Is Characterized by a Distinct Pattern of Histone 3 and Histone 4 Lysine Modifications. v. 21, n. 3, p. 305–318, 2014.

NI, S.; YE, M.; HUANG, T. Short stature homeobox 2 methylation as a potential noninvasive biomarker in bronchial aspirates for lung cancer diagnosis. **Oncotarget**, v. 8, n. 37, p. 61253–61263, 2017.

NISHIHARA, E. et al. A novel germline mutation of KEAP1 (R483H) associated with a non-toxic multinodular goiter. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, n. SEP, p. 1–5, 2016.

PACINI, F.; MEDICINE, M. D. Thyroid Nodules. In: **The Thyroid and its Diseases**. Chicago, Chicago, USA: [s.n.]. p. 2–4.

PALACIO-TORRALBA, J. et al. A Novel Method for Rapid and Quantitative Mechanical Assessment of Soft Tissue for Diagnostic Purposes : A Computational Study A Novel Method for Rapid and Quantitative Mechanical Assessment of Soft Tissue for Diagnostic Purposes : A

Computational Study. **Int J Numer Method Biomed Eng.**, 2017.

PARTHA, M. AND SINGAL, R.; A. DNA methylation and cancer. **JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY BIOLOGY**, v. 22, n. 22, p. 4632–4642, 2004.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature Publishing Group**, v. 28, n. 10, p. 1057–1068, 2010.

PROST, G. et al. Impact of connexin32 deletion on E7 or RET/PTC3 oncogene-driven growth and neoplastic transformation of the thyroid gland. **Endocrine-Related Cancer**, v. 16, n. 3, p. 873–884, 2009.

RAVICHANDRAN, M.; JURKOWSKA, R. Z.; JURKOWSKI, T. P. Target specificity of mammalian DNA methylation and demethylation machinery. **Organic & Biomolecular Chemistry**, 2018.

RICHMOND, R. K. et al. Crystal structure of the nucleosome ° resolution core particle at 2 . 8 A. v. 7, p. 251–260, 1997.

RIESCO-EIZAGUIRRE, G.; SANTISTEBAN, P. Advances in the molecular pathogenesis of thyroid cancer: lessons from the cancer genome. **European Journal of Endocrinology**, v. 175, n. 5, p. R203–R217, 2016.

ROADMAP EPIGENOMICS CONSORTIUM et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. **Nature**, v. 518, n. 7539, p. 317–329, 2015.

RODRÍGUEZ-RODERO, S. et al. Epigenetic alterations in endocrine-related cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 21, n. 4, 2014.

RODRÍGUEZ-RODERO, S. et al. Epigenetic modulators of thyroid cancer. **Endocrinología, Diabetes y Nutrición**, v. 64, n. 1, p. 44–56, 2017.

ROSE, N. R.; KLOSE, R. J. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 12, p. 1362–1372, 2014.

SAMBUUDASH, O.; KIM, H. S.; CHO, M. Y. Lack of aberrant methylation in an adjacent area of left-sided colorectal cancer. **Yonsei Medical Journal**, v. 58, n. 4, p. 749–755, 2017.

SARI, R. et al. The effect of body weight and weight loss on thyroid. p. 258–262, 2003.

SATOH, K. et al. Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 37, p. E7697–E7706, 2017.

SCHULZ, E. G.; HEARD, E. Role and control of X chromosome dosage in mammalian

- development. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 23, n. 2, p. 109–115, 2013.
- SCHULZ, L. C. The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. v. 107, n. 39, p. 16757–16758, 2010.
- SCHWARTZ, Y. B.; PIRROTTA, V. Polycomb complexes and epigenetic states. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 20, n. 3, p. 266–273, 2008.
- SECCO, D. et al. Stress induced gene expression drives transient DNA methylation changes at adjacent repetitive elements. **eLife**, v. 4, n. JULY2015, p. 1–26, 2015.
- SELAMAT, R. et al. Iodine deficiency status and iodised salt consumption in Malaysia : findings from a national iodine deficiency disorders survey. v. 19, n. October, p. 578–585, 2010.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics , 2017. **CA CANCER J CLIN**, v. 67, n. 1, p. 7–30, 2017.
- SIU, C. Characterization of the human thyroid epigenome. **J Endocrinol** **2**, v. 235, n. 1, p. 153–165, 2017.
- SONG, M. A. et al. Comparison of genome-scale DNA methylation profiles in hepatocellular carcinoma by viral status. **Epigenetics**, v. 11, n. 6, p. 464–474, 2016.
- SONG, Y. et al. Roles of Hydrogen Peroxide in Thyroid Physiology and Disease. v. 92, n. 10, p. 3764–3773, 2007.
- TAN, M. et al. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 1016–1028, 2011.
- TE PAS, M. F. W. et al. The importance of endophenotypes to evaluate the relationship between genotype and external phenotype. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 1–22, 2017.
- TOMCZAK, K.; CZERWIŃSKA, P.; WIZNEROWICZ, M. Review
The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. **Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia**, p. 68–77, 2015.
- TUREK-PLEWA, U.; JAGODZIŃSKI*, P. P. THE ROLE OF MAMMALIAN DNA METHYLTRANSFERASES IN THE REGULATION OF GENE EXPRESSION. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 10, n. June, p. 631–647, 2005.
- VAIMAN, M.; BEKERMAN, I. Anatomical approach to surgery for intrathoracic goiter. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 274, n. 2, p. 1029–1034, 2017.
- VAISSIÈRE, T.; SAWAN, C.; HERCEG, Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. **Mutation Research - Reviews in**

- Mutation Research**, v. 659, n. 1–2, p. 40–48, 2008.
- VARLEY, K. E. et al. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. p. 555–567, 2013.
- VENKATESH, S.; WORKMAN, J. L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 3, p. 178–189, 2015.
- VIEIRA, S. **Bioestatística, Tópicos Avançados**. 2. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- VIRILI, C.; CENTANNI, M. “With a little help from my friends” - The role of microbiota in thyroid hormone metabolism and enterohepatic recycling. **Molecular and Cellular Endocrinology**, p. 1–5, 2016.
- VOIGT, P.; TEE, W. W.; REINBERG, D. A double take on bivalent promoters. **Genes and Development**, v. 27, n. 12, p. 1318–1338, 2013.
- WANG, T.-H. et al. Association of Smoking, Alcohol Use, and Betel Quid Chewing with Epigenetic Aberrations in Cancers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1210, 2017.
- WARD, L. **Thyroid and Parathyroid Diseases – New Insights into Some Old and Some New Issues**. [s.l.] InTech, 2012.
- WHITE, M. G. et al. Epigenetic Alterations and Canonical Pathway Disruption in Papillary Thyroid Cancer: A Genome-wide Methylation Analysis. **Annals of Surgical Oncology**, v. 23, n. 7, p. 2302–2309, 2016.
- WU, H.; ZHANG, Y. Mechanisms and functions of Tet protein- mediated 5-methylcytosine oxidation. **Gene Dev.**, v. 25, n. 23, p. 2436–2452, 2011.
- WU, S. C.; ZHANG, Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 9, p. 607–620, 2013.
- YAGI, S. et al. DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) in mouse promoter regions demonstrating tissue-specific gene expression. **Genome Research**, v. 18, n. 12, p. 1969–1978, 2008.
- YANG, B. et al. Methylation Profiling Defines an Extensive Field Defect in Histologically Normal Prostate Tissues Associated with Prostate Cancer. **Neoplasia**, v. 15, n. 4, p. 399–IN13, 2013.
- YASUOKA, H. et al. A rare case of poorly differentiated thyroid carcinoma probably arising from a nodular goiter. n. I, p. 1–5, 2017.

ZHANG, X.; GAO, L.; JIA, S. Extracting Fitness Relationships and Oncogenic Patterns among Driver Genes in Cancer. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 39, 2017.

ZHENG, F. M.; SKEAFF, S. A. Thyroglobulin as a Biomarker of Iodine Deficiency : A Review. v. 24, n. 8, 2014.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

O (A) senhor (a).....está sendo convidado a participar da CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE TECIDOS TIREOIDIANOS NORMAIS E COM BÓCIO, que visa realizar o armazenamento de pequenos fragmentos de amostras de tecidos tireoidianos submetidos a tireoidectomia na Fundação Hospital Adriano Jorge (FHAJ) por bócio.

A coleta e o armazenamento destes fragmentos tireoidianos auxiliarão na execução de trabalhos científicos relacionados a bócios, possibilitando a criação de múltiplas linhas de pesquisa e fortalecimento das já existentes na área da genética em saúde humana.

Descrição do procedimento: Durante a tireoidectomia realizada na FHAJ, será acessada a região anterior do pescoço, através da mesma incisão realizada pelo cirurgião, expondo a glândula tireoide, seus ligamentos e nervos para posterior retirada exclusivamente do tecido tireoidiano, sem possibilidades de reconhecimento futuro da identidade.

Passíveis riscos e/ou desconfortos: a coleta do material será realizada da peça cirúrgica já retirada no ato operatório, assim, a coleta do material em si, não lhe trará riscos nem outros danos.

Para mais informações:

Prof. Joao Bosco Lopes Botelho, Tel.: (92) 99183-8680. Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas. Av. Carvalho Leal s/n.

Declaro consentimento em participar deste Projeto, autorizando a retirada do material necessário segundo as condições a mim explicadas por esse termo.

Declaro ainda estar ciente de que esta pesquisa tem finalidade científica, que a participação tem caráter voluntário, e que as identidades dos voluntários serão mantidas em total sigilo por tempo indeterminado, tanto pelo executor como pela instituição onde será realizada. Os resultados dos procedimentos executados na pesquisa serão analisados e alocados em tabelas, figuras ou gráficos e divulgados em palestras, conferencias, periódicos científico ou outras forma de divulgação que propicie o repasse dos conhecimentos para a sociedade e para autoridades normativas em saúde nacionais ou internacionais, de acordo com as normas/ leis regulatórias de proteção nacional e internacional.

Também estou ciente de que a participação neste trabalho não trará danos, além dos previstos neste termo, e que em qualquer momento eu poderei obter esclarecimentos sobre todos os procedimentos utilizados na pesquisa ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo físico, material ou moral.

Manaus, ____ de _____ de _____

Assinatura do doente/responsável

Pesquisador responsável

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CONSTRUÇÃO De uma BIBLIOTECA DE TECIDOS TIREOIDIANOS NORMAIS E COM BÓCIO
Pesquisador Responsável: João Bosco Lopes Botelho
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 16463813.9.0000.0007
Submetido em: 29/04/2013
Instituição Proponente: Diretoria de Ensino e Pesquisa - DPE
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_164638

- DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

- Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 1
 - Projeto Original (PO) - Versão 1
 - Documentos do Projeto
 - Folha de Rosto - Submissão 1
 - Informações Básicas do Projeto - Subm
 - Projeto Detalhado / Brochura Investigad
 - TCLE / Termos de Assentimento / Justif
 - Apreciação 1 - Fundação Hospital Adriano
 - Projeto Completo

Tipo de Documento

Situação

Arquivo

Postagem

Ações

- LISTA DE CENTROS PARTICIPANTES E COPARTICIPANTES

Apreciação	CAAE	Pesquisador Responsável	Comitê de Ética	Instituição	Situação	Tipo	R.C
------------	------	-------------------------	-----------------	-------------	----------	------	-----

- HISTÓRICO DE TRÂMITES

Apreciação	Data/Hora	Tipo Trâmite	Versão	Perfil	Origem	Destino	Informações
PO	01/06/2013 21:29:39	Parecer liberado			Fundação Hospital Adriano Jorge - FHAJ		
PO	01/06/2013 21:28:27	Parecer do colegiado emitido			Fundação Hospital Adriano Jorge - FHAJ	Fundação Hospital Adriano Jorge - FHAJ	
PO	01/06/2013 21:27:46	Parecer do relator emitido			Fundação Hospital Adriano Jorge - FHAJ	Fundação Hospital Adriano Jorge - FHAJ	
PO	01/06/2013 21:21:52	Aceitação de Elaboração de Relatoria			Fundação Hospital Adriano Jorge - FHAJ	Fundação Hospital Adriano Jorge - FHAJ	
PO	28/05/2013 10:23:04	Confirmação de Indicação de Relatoria			Fundação Hospital Adriano Jorge - FHAJ	Fundação Hospital Adriano Jorge - FHAJ	
PO	22/05/2013 10:34:51	Indicação de Relatoria			Fundação Hospital Adriano Jorge - FHAJ	Fundação Hospital Adriano Jorge - FHAJ	
PO	22/05/2013 10:34:12	Aceitação do PP			Fundação Hospital Adriano Jorge - FHAJ	Fundação Hospital Adriano Jorge - FHAJ	
PO	29/04/2013 00:58:15	Submetido para avaliação do CEP		Pesquisador Principal	PESQUISADOR RESPONSAVEL	Fundação Hospital Adriano Jorge - FHAJ	

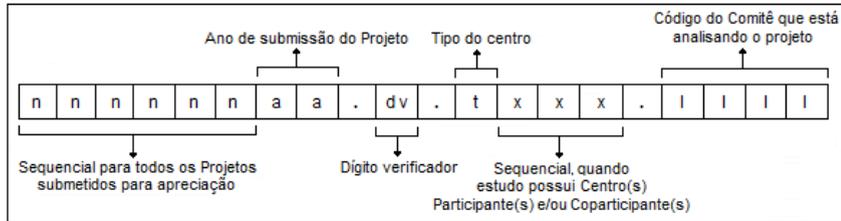


LEGENDA:**(*) Apreciação**

PO = Projeto Original de Centro Coordenador	POP = Projeto Original de Centro Participante	POc = Projeto Original de Centro Coparticipante
E = Emenda de Centro Coordenador	Ep = Emenda de Centro Participante	Ec = Emenda de Centro Coparticipante
N = Notificação de Centro Coordenador	Np = Notificação de Centro Participante	

(*) Tipo

P = Projeto de Centro Coordenador Pp = Projeto de Centro Participante Pc = Projeto de Centro Coparticipante

(*) Formação do CAAE[Voltar](#)[Enviar Notificação](#)[Submeter Emenda](#)[Gerar Interface Rebec](#)

Este sistema foi desenvolvido para os navegadores Internet Explorer (versão 7 ou superior),
ou Mozilla Firefox (versão 9 ou superior).

ANEXO 3 – Detalhamento do Banco de Tecidos de Tireoides Normais e com B/ócio da localizado na Universidade Federal do Amazonas /UFAM:

Localização:

O BTTNB/UFAM está localizado na sala de Criopreservação no Laboratório de Biotecnologia no Minicampus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), em Manaus/AM.

Forma de Armazenamento dos tecidos:

Os tecidos frescos de bócios foram colocados em microtubos de 1,5 ml, individualizados e identificados por região da coleta estão sob conservação a – 80oC.

Responsáveis pelo BTTNB/UFAM:

O pesquisador responsável pela formação do BTTNB/UFAM é o Prof. Dr. H.C. João Bosco Lopes Botelho/BIOTEC/UFAM, e o pesquisador responsável pelo armazenamento é o Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho/BIOTEC/UFAM e Dra. Enedina Nogueira de Assunção.

Local de obtenção das amostras para o BTTNB

As amostras foram obtidas diretamente do centro cirúrgico da FHAJ, logo após a cirurgia da tireoide (tireoidectomia).

Transporte das amostras:

Imediatamente após a coleta dos fragmentos no Centro Cirúrgico da FHAJ, os microtubos com as amostras frescas foram devidamente acondicionados e transportados em recipiente próprio com nitrogênio líquido.

ANEXO 4 - Resultado dos Exames Histopatológica das peças cirúrgicas

Descrição histopatológica *peças cirúrgicas* dos Bócios:

Paciente 1 (21) – M. J. O.B.

Macro: Tireoide com o LD medindo 5,0 x 3,5 x 2,0 cm, LE globoso, medindo 8,0 x 5,5 x 5,0 cm, o lobo intermediário medindo 2,5x 1,5cm. Aos cortes o LD é multinodular com os nódulos constituídos por material gelatinoso com aspecto colóide. O LE é uma única formação globosa encapsulada, com aspecto gelatinoso, o lobo intermediário com formação nodular brancacenta fibrosa, medindo 1,0 cm de diâmetro.

Micro: os cortes mostram tireoide exibindo neoplasia pela proliferação de folículos de diâmetros variados, ora revestidos por células pavimentosas, ora por células cúbicas, de permeio a tecido conjuntivo frouxo. **Conclusão:** Adenoma Folicular de tireoide (LE)

Paciente 2 (28) – E. S. S.

Macro: Tireoide pesando 30 g LD medindo 6,0 x 5,0 x 3,0 cm e o LE 4,0 x 3,0 x 1,0 cm. Apresentam superfície nodular acastanhada e firme. Os cortes no LD mostra capsula delgada, superfície exibindo diminutas cavitações císticas de parede espessa e brancacenta. Os cortes do LE evidencia superfície uniforme e translúcida.

Micro: os cortes mostram tireoide exibindo proliferação de folículos com diâmetros variados, ora revestidos por células cúbicas, ora por células pavimentosas, albergando na luz substancia colóide. No estroma observa-se septos de tecido conjuntivo de permeio a linfócitos, histiócitos e hemossiderófagos. Em outras áreas nota-se tireoide exibindo neoplasia constituída pela proliferação de folículos de diâmetro variado, revestidos ora por células pavimentosas, ora por células cúbicas, de permeio a tecido conjuntivo frouxo.

Conclusão: Hiperplasia Multinodular da tireoide (Bócio Adenomatoso) com área de Adenoma Folicular (LD).

Paciente 3 (29) – V. A. C.

Macro: Tireoide pesando 220 g, o LE medindo 12,0 x 6,5 x 6,0 cm e o LD: 6,0 x 5,0 x 3,0 cm, com superfície externa lisa, bocelada. Apresentam superfície nodular acastanhada e firme. Ao corte vê-se capsula delgada, nódulos de diâmetros diversos, ora translúcidos, ora enegrecidos, medindo em media 1,0 cm de diâmetro. LD os cortes mostram nódulos bem individualizados translúcidos.

Micro: os cortes mostram tireoide exibindo proliferação de folículos com diâmetros variados, ora revestidos por células cúbicas, ora por células pavimentosas, albergando na luz substancia

coloide. No estroma observa-se septos de tecido conjuntivo de permeio a linfócitos, histiócitos e hemossiderófagos. **Conclusão:** Hiperplasia Multinodular da tireoide (Bócio Adenomatoso)

Paciente 4 (30) – M.E.L.M.

Macro: tireoide constituída por LE, LD e Istmo medindo em conjunto 7,0 por 5,5 por 2,5 cm, pesando 30 g, coloração pardo clara, superfície lobulada e capsula rôta na porção inferior do LE, assim como na borda inferior do istmo. Os segmentos medem A-LE 4,0 x 2,5 x 2,5 cm, B-LD 3,0 x 2,5 x 2,0 cm, e C – I 4,5 x 4,0 x 2,5cm. Aos cortes do LE parênquima pardo escuro com nódulo sólidos complexos bem delimitados, contendo áreas sólidas e áreas císticas preenchidas por coloides densos, medindo 1,5 cm no maior eixo. O Istmo parênquima pardo escuro com nódulos complexos bem delimitados, contendo áreas sólidas e áreas císticas preenchidas por coloides densos, medindo 3,0 cm no maior eixo. O LD parênquima pardo escuro, com nódulos complexos bem delimitados, contendo áreas sólidas e áreas císticas preenchidas por coloides densos, 1,0 cm no maior eixo.

Micro: os cortes mostram tireoide exibindo proliferação de folículos com diâmetros variados, ora revestidos por células cubicas, ora por células pavimentosas, albergando na luz substancia coloide. No estroma observa-se septos de tecido conjuntivo de permeio a linfócitos, histiócitos e hemossiderófagos. **Conclusão:** Hiperplasia Multinodular da tireoide (Bócio Adenomatoso).

Paciente 5 (31) – G.K.L.R.

Macro: tireoide constituída por LE, LD e Istmo medindo no conjunto 7,0 x 6,5 x 3,5 cm, pesando 70 g, coloração pardo escura, superfície lobulada e capsula fibrosa íntegra. Os segmentos medem A-LE 5,0 x 2,8 x 2,5 cm, B-LD 5,0 x 3,5 x 2,5 cm, e C – I 5,0 x 3,5 x 3,0cm.

Micro: aos cortes do LE parênquima pardo escuro com nódulo sólido bem delimitado, medindo 1,0 cm no maior eixo. O istmo apresenta-se de coloração pardo clara subvertido por nódulos complexos com áreas irregulares preenchidas por material coloidal âmbar. O LD tem coloração pardo escura, superfície multinodular medindo a maior 1,5 cm.

Conclusão: Produto de tireoidectomia total, Carcinoma Papilífero medindo 1 cm de diâmetro, não encapsulado, localizado em LD. Ausência de invasão linfática, vascular ou de extensão extratireoidiana. Margens cirúrgicas livres. Tecido adjacente com Adenoma Folicular e Hiperplasia Multinodular da tireoide (Bócio Adenomatoso).

Número Banco Tecidos Iniciais idade da cirurgia data de nascimento sexo Procedência *Número do Registro da FHAJ	Tempo de conhecimento do Bócio	Função tireoidiana associada	Outras condições associadas	níveis de T4 Livre	níveis de TSH	Ac Anti TPO	Dados de USG (volume total)/TC de pescoço	Dados da PAAF	Tipo de cirurgia	data da cirurgia	Nº de amostras	complicações	Histopatológico
21 = 1 G. K. L. R. 33 anos 22/04/1984 Coari/AM 181384	28 = 2 E. S. S. 63 anos 26/07/1953 Manaus/AM 175736	29 = 3 V. A. C. 54 anos 09/04/1962 Manaus/AM 177285	30 = 4 M. E. L. M. S. 59 anos 06/10/1956 Manaus/AM 169386	21 = 1 M. J. O. B. 52 anos 30/09/1963 Manaus/AM 90028	assintomática	eutireoidismo			Tireoidectomia Total	07/07/2014	✓	ausentes	Adenoma Follicular (bócio multinodular - LD, istmo e LE)
há 6 anos percebeu aumento do volume da glândula tireóide (2010)	há 1 ano e meio, com alteração de palpação - BMN(2015)	aumento de volume da tireóide há 06 anos (2010).	descoberta de incidentaloma em março/2016 após uma USG cervical						Tireoidectomia Total	30/08/2016	∞	rouquidão no 1º PO (melhorada) hipoparatiroidi.	Adenoma Follicular/Hiperplasia Follicular (toda glândula)
eutireoidismo	eutireoidismo	eutireoidismo	eutireoidismo	1,45 ng/dL	0,4mIU/mL	ne	US: Bócio multinodular, volume total: 99,93 cm3	Nódulo colóide	Tireoidec. Total	24/08/2016	∞	ausentes	Hiperplasia Follicular (BMN)
Neurofibromatose tipo 1	Hipertensão e Diabetes M. tipo 2	Tabagista e ex-etilista	Hérnia de Disco	0,87ng/dL	1,136mIU/mL	ne	TC: bócio c/ extensão de 1,4cm ao introito torácico, multinodular com calcif. c/ vol: 31cm3	LE: Bethesda II / LD: Bethesda I	Tireoidectomia Total	19/09/2016	∞	ausentes	Hiperplasia Follicular (BMN)
T4 total: 6,2	ne	ne	ne	1,41mIU/mL			US: Nódulo em LD e heter. com vasc. perif.de 2,4 x1,6cm/ vol: 25cm3	Nódulo follicular benigno	Tireoidectomia Total	19/09/2016	∞	ausentes	Carcinoma Papilifero (lobo Direito) /Adenoma Follicular/Hiperplasia Follicular
níveis de TSH	ne	ne	ne				US: Nódulo em LD e outros quatro na E/ TC: nódulo à E com desvio de traqueia, sem invasão	Bócio nodular em regressão, Bethesda II	Tireoidectomia Total	07/07/2014	∞	ausentes	Adenoma Follicular (bócio multinodular - LD, istmo e LE)
Ac Anti TPO									Tireoidectomia Total	07/07/2014	∞	ausentes	Adenoma Follicular (bócio multinodular - LD, istmo e LE)
Dados de USG (volume total)/TC de pescoço									Tireoidectomia Total	07/07/2014	∞	ausentes	Adenoma Follicular (bócio multinodular - LD, istmo e LE)
Dados da PAAF									Tireoidectomia Total	07/07/2014	∞	ausentes	Adenoma Follicular (bócio multinodular - LD, istmo e LE)
Tipo de cirurgia									Tireoidectomia Total	07/07/2014	∞	ausentes	Adenoma Follicular (bócio multinodular - LD, istmo e LE)
data da cirurgia									Tireoidectomia Total	07/07/2014	∞	ausentes	Adenoma Follicular (bócio multinodular - LD, istmo e LE)
Nº de amostras									Tireoidectomia Total	07/07/2014	∞	ausentes	Adenoma Follicular (bócio multinodular - LD, istmo e LE)
complicações									Tireoidectomia Total	07/07/2014	∞	ausentes	Adenoma Follicular (bócio multinodular - LD, istmo e LE)
Histopatológico									Tireoidectomia Total	07/07/2014	∞	ausentes	Adenoma Follicular (bócio multinodular - LD, istmo e LE)

ANEXO 6 – Procedimento e as soluções empregadas no protocolo para extração de histonas:

(Autor: Spartaco Astolfi, Enedina Assunção, 2015)

Procedimento:

Fragmentação das amostras – com auxílio de pinças e lâminas de bisturi, as amostras foram cortadas e colocadas em pequenos envelopes de papel alumínio (dobrados a mão) e fechados. Com auxílio de uma pinça longa, foram submergidos em almofariz preenchida com nitrogênio líquido. Após o congelamento pelo nitrogênio, ainda dentro do papel alumínio, as amostras de tecido eram rapidamente pulverizadas por processo manual por meio de um bastão.

Identificação das amostras – as amostras foram colocadas em microtubos de 1500 µL que foram devidamente identificadas com o número do registro do BTTNB e com as iniciais da região da tireoide a que pertenciam, sendo mantidas constantemente em gelo.

Adição de solução tampão BET – foram adicionadas aos microtubos com as amostras pulverizadas, 500 µL de tampão BET, e homogeneizada no próprio tubo com auxílio de um pistilo fino, e depois mantidas em gelo por 5 a 10min.

Primeira centrifugação – logo após o descanso no gelo, os tubos foram centrifugados a 2000g a 4°C por 5 minutos, com descarte do sobrenadante.

Nova adição de solução tampão BET – no sedimento residual dos tubos foram adicionados novamente 500 µL de tampão BET, sendo homogeneizados com o auxílio de um pistilo fino, permanecendo outra vez no gelo por mais 5 a 10 min.

Segunda centrifugação – os tubos foram centrifugados a 2000 g a 4 °C por 5 minutos, com descarte novamente do sobrenadante, sendo reservado o sedimento.

Ressuspensão em solução HE - nos sedimentos residuais dos tubos, onde estavam as histonas, foram colocados 120 µL de solução de extração de histona (HE), e feita a ressuspensão, permanecendo os tubos em gelo por mais 30 minutos. A cada 5 minutos eram homogeneizados suavemente no próprio tubo, com auxílio do pistilo fino.

Terceira centrifugação – os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 5 minutos a 4 °C.

Subdivisão do sobrenadante em alíquotas – a subdivisão foi feita em três alíquotas de 100 µL (alíquota 1, 2 e 3 de cada amostra de tecido), sendo descartado o sedimento.

Adição de acetona – nas alíquotas 1, 2 e 3 foram adicionados individualmente 1 mL de acetona, permanecendo as amostras em -20 °C *overnight*.

Quarta centrifugação - no dia seguinte, os tubos foram centrifugados 12.000 g/10 min, com descarte cuidadoso do sobrenadante outra vez.

Secagem e armazenamento dos pellets – secos os *pellets*, foram em seguida, estocados a -80 °C. Ao serem utilizadas, foram ressuspensas em 100 µL de H₂O milli-Q estéril.

Soluções empregadas no Protocolo:

- 1. Tampão fosfato-salina (PBS):** 800 g NaCl (cloreto de sódio), 20 g de KCl (cloreto de potássio), 144 g de Na₂HPO₄ · 2H₂O (fosfato de sódio dibásico dodeca-hidratado) e 24 g de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) em 8L de água destilada, levar em autoclave a 121 °C, com pressão de 1 atm por 20 minutos, e estocado a 4 °C.
- 2. Tampão de extração BET (Triton Extraction Buffer):** PBS pH 7,4 ajustado com hidróxido de sódio (NaOH) + TRITON x100 0,5 % (C34H62H11) - surfactante não iônico + PSMF 2 mM, 0,02 % (v/v) de NaN₃ (azida de sódio), numa densidade de célula de 10⁷ células/ml.
- 3. Solução de extração de histona (HE):** composta por glicerol 10% + HCl (ácido clorídrico) 0,5 M e 2-mercaptoetilamine-HCl. 0,1 M

ANEXO 7 - Fluxograma do método de quantificação de Histonas

Fluxograma do método de quantificação de metilação de Histonas EpiQuik™ Global *Pan-Methyl* histonas H3-K4 / H3-K9/ H3-K27 *Quantification kit* (Colorimétrico) - com adaptação feita a partir do site da *Epigentek*, 2015 (Figura 14).

Obs.: O procedimento metodológico foi realizado para cada tipo específico de histona estudada, e em placas e anticorpos específicas para cada tipo, conforme recomendações do fabricante.

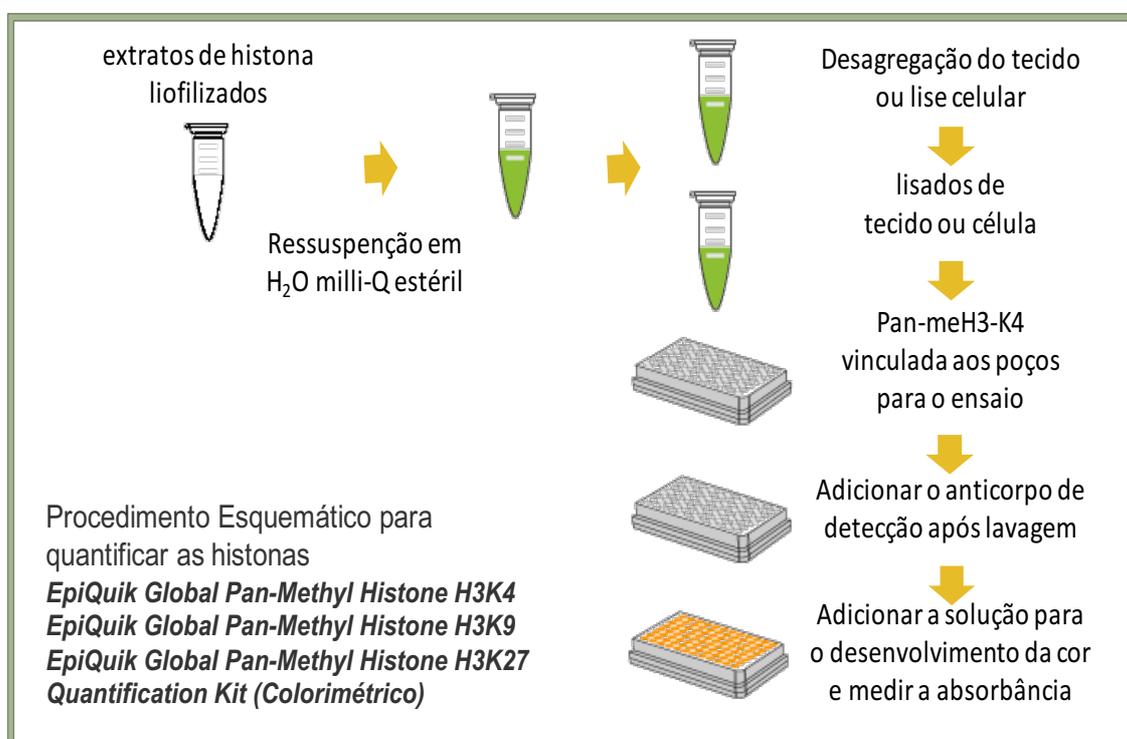


Figura 14. Fluxograma do método de quantificação colorimétrica de metilação *EpiQuik® Global Pan-Methyl histonas H3-K4 / H3-K9/ H3-K27 Quantification kit* (Colorimétrico). Fonte: extraído e adaptado do site da *Epigentek*, 2015

ANEXO 8 – Procedimento de Extração do DNA/Preparo das Amostras

Fragmentação e digestão:

Fragmentação: com auxílio de pinças e lâminas de bisturi, as amostras de tecidos de tireoide foram cortadas e acondicionadas em pequenos envelopes feito a mão de papel alumínio, para serem facilmente submergidas com auxílio de uma pinça em almofariz com nitrogênio líquido, sendo congeladas e rapidamente pulverizadas por processo manual (utilizando um pistilo), e colocadas em tubos de microcentrifuga estéril devidamente identificados com o número do registro no BTTNB e região da tireoide a que pertenciam, sendo mantidas o tempo todo em gelo. As amostras tinham aproximadamente 25 mg de tecido pulverizado.

Digestão pela Proteinase K: utilizada para uma eficiente lise de tecidos/células, sendo adicionado 180 μ L de tampão de digestão *Genomic PureLink*[®] e 20 μ L de Proteinase K (fornecido com o kit) a cada amostra, com o tecido ficando completamente imerso na mistura tampão, e foram bem misturados com vórtex, e em seguida Incubados a 55 °C, com vórtex ocasional até que a completa lise (1- 4 horas).

Para remover qualquer material particulado, o lisado foi centrifugado na velocidade máxima durante 3 minutos à temperatura ambiente, e o sobrenadante transferido para um novo tubo de microcentrifuga estéril.

Digestão pela RNase A: foi adicionado 20 μ L de RNase A (fornecido no kit) ao lisado, e misturado bem por meio de um breve vórtex, e incubado à temperatura ambiente durante 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 μ L do tampão *PureLink*[®] *Genomic Lysis / Binding* Buffer e misture bem por vórtex, e adicionados 200 μ L 96-100% de etanol ao lisado, e bem misturado por vórtex por 5 segundos.

Procedimento de purificação usando colunas de rotação: Tampões e tubos com colunas: *PureLink*[®] *Genomic Wash Buffers* 1 e 2 / *PureLink*[®] *Genomic Elution Buffer* / Colunas de rotação *PureLink*[®] em microtubos / microtubos *PureLink*[®]

Obs.: Antes de iniciar o procedimento foi adicionado etanol (96-100%) nos tampões de lavagem segundo o rotulo: *PureLink*[®] *Genomic Wash Buffer 1* e *PureLink*[®] *Genomic Wash Buffer 2*, e foram armazenados à temperatura ambiente.

Ligação do DNA:

1. Selecionada a coluna de rotação PureLink®.
2. Em seguida, foi adicionado o lisado (~ 640 µL) à coluna de rotação PureLink® e centrifugado a 10 000×g durante 1 minuto à temperatura ambiente.
3. Descartado o tubo de baixo, recolhendo apenas a coluna, sendo colocada em um microtubo.
4. Foram adicionados ao novo microtubo com a coluna 500 µL de tampão de lavagem 2.
5. Em seguida, o microtubo com a coluna foi centrifugado à velocidade máxima durante 3 minutos à temperatura ambiente. Descartado outra vez o tubo de baixo.

Eluição:

1. Colocada a coluna de rotação em um tubo esterilizado de microcentrífuga de 1,5 mL
2. Adicionado 30 µL de *PureLink® Genomic Elution Buffer* à coluna.
3. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 1 minuto.
4. Centrifugados à velocidade máxima durante 1 minuto à temperatura ambiente.
5. Finalizado com o tubo contendo o DNA purificado. Removido e descartada a coluna.

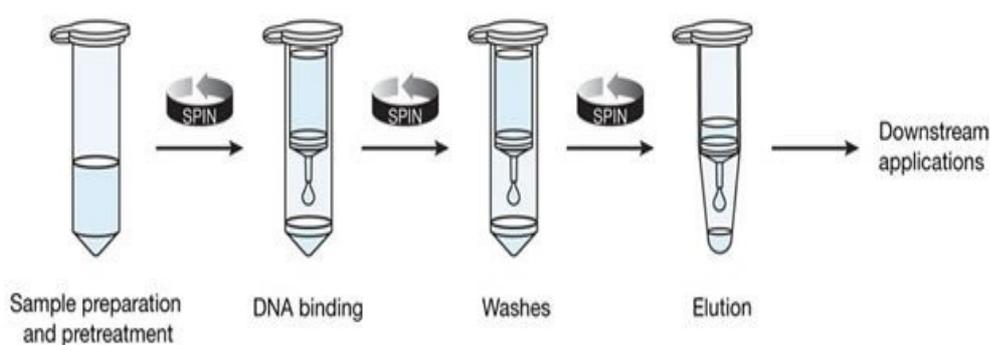
Resumo do procedimento metodológico (Figura 15):

Figura 15. Procedimento para extração de DNA genômico orientado pelo fabricante do *PureLink* (Invitrogen, cat. no. K1820-02). Fonte: <https://www.thermofisher.com/order/catalog> (último acesso 02/07/2017)

ANEXO 9 - Quantificação do DNA genômico

Técnica empregada foi por quantificação por espectrofotômetro *Nanodrop*[®] (*Thermo Scientific*[®]) – Etapa refeita no Laboratório de Tecnologia do DNA/CAM/UFAM *Biochemistry Department at Ponce Health Science University*, Ponce/Porto Rico, 2016

1. Iniciamos com o preparo da solução de trabalho (*Working Solution*) com o fluoróforo na proporção de 1:200.
2. Na quantificação usamos uma curva padrão com valor de 0 a 200, com duas soluções padrão, na quantidade de 10 μ L do padrão e 190 μ L da solução de trabalho (*WS*).
3. Foram adicionados 10 μ L de cada solução padrão *Nanodrop*[®] ao tubo apropriado, e colocado em vórtex por 2-3 segundos, com devidos cuidados para evitar bolhas (utilizando pipeta de precisão). Foram pipetados nos tubos 199 μ L da solução e 1 μ L do DNA extraído de cada amostra não diluído.
4. Iniciados os procedimentos no aparelho para a devida leitura e calibração (Figura 16).

Resultado:

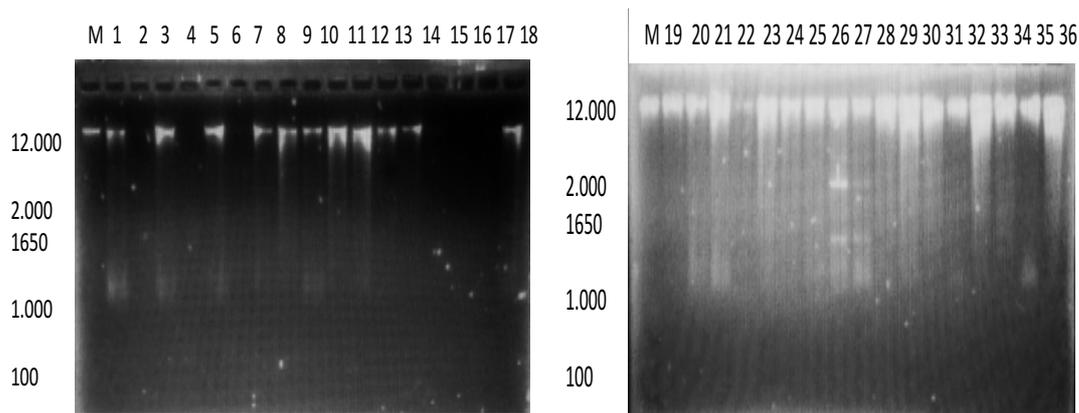


Figura 16: Perfil eletroforético das amostras de DNA de bócio. Fonte: Laboratório de Tecnologia do DNA - CAM/UFAM, 2016.

ANEXO 10 - Procedimento da Análise Quantitativa da Metilação Global do DNA:

Procedimento:

1. As amostras de DNA genômico liofilizadas foram ressuspensas em H₂O milli-Q estéril, e em seguida colocadas na placa de ELISA com poços de 350 µL, distribuídas obedecendo uma sequencia esquemática (Figura19), com a primeira tira sendo reservada às soluções padrões de negativo e branco.
2. Para o controle negativo utilizamos 20 µg/mL do ME3 - um polinucleotídeo não metilado contendo 50 % de citosina, Teste branco que consiste na adição somente do tampão com o objetivo de avaliar se houve contaminação durante o experimento. Na sequencia, foram colocados em 10 poços a Curva padrão (concentrações crescentes e conhecidas do antígeno empregado), como padrão de comparação para deduzir as quantidades de antígenos nas soluções-testes.
3. O teste foi feito em duplicata, para que houvesse o controle dos erros de manuseio. A média dos resultados foi avaliada e não houve diferença significativa.
4. Inicialmente na placa, foi colocada solução tampão (saturada) do Kit contendo o primeiro anticorpo em concentração conhecida e suficiente para adsorver nos poços da placa.
5. Logo depois, os poços foram lavados com tampão de lavagem, e ao retirar o tampão, o anticorpo fica aderido à placa.
6. Foi adicionada a solução contendo proteína de alto peso molecular, como a BSA (Albumina de Soro Bovino), com o objetivo de bloquear as áreas onde os anticorpos não aderiram à placa (sítios inespecíficos).
7. Em seguida, os poços foram lavados vinculados aos anticorpos de captura e detecção por 1,5 horas, onde as Ilhas CpG metiladas foram comprovadas após incubação com os anticorpos de captura for 30 minutos, seguidos da incubação com o Ac de detecção por mais 30 minutos, tampões e reagentes sobre microplacas de 96 poços.

Desenho e foto respectivas da configuração da distribuição das amostras e dos controles nos poços na placa de ELISA, as fotos referentes ao experimento e as fotos do fluxo do procedimento em bancada até a leitura colorimétrica (Figura 17).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M E3	M E3	21	21	28	28	29	29	30	30	31	31
B	C 0,5	C 0,5	21	21	28	28	29	29	30	30	31	31
C	C 1,0	C 1,0	21	21	28	28	29	29	30	30	31	31
D	C 2,0	C 2,0	21	21	28	28	29	29	30	30	31	31
E	C 5,0	5,0	21	21	28	28	29	29	30	30	31	31
F	C 10,	C 10,	21	21	28	28	29	29	30	30	31	31
G	-	-	21	21	28	28	29	29	30	30	31	31
H	-	-	21	21	28	28	29	29	30	30	31	31

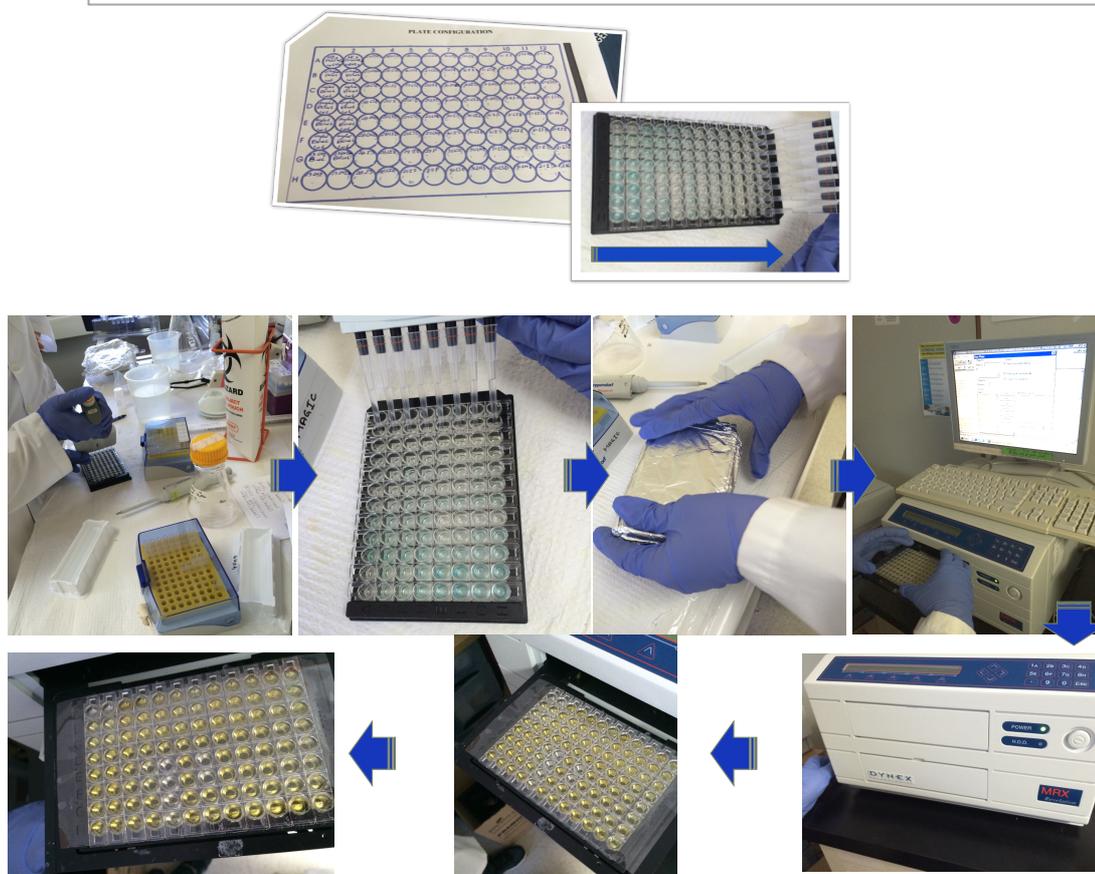


Figura 17. Procedimento da análise da Metilação Global do DNA em placa/leitor de ELISA desenho: Jezini, DL. 2017 e Fotos retiradas nas dependências da *Ponce Health Science University*, Ponce/Porto Rico, 2016 (ME3 (20 µg/ml de controle negativo, C (curva padrão), 21, 28, 29, 30 e 31 (amostras).

ANEXO 11 - Fluxograma da metodologia colorimétrica de ELISA para a quantificação de metilação do DNA detalhada abaixo, com adaptação feita a partir do site da *Epigentek* (Figura 18).

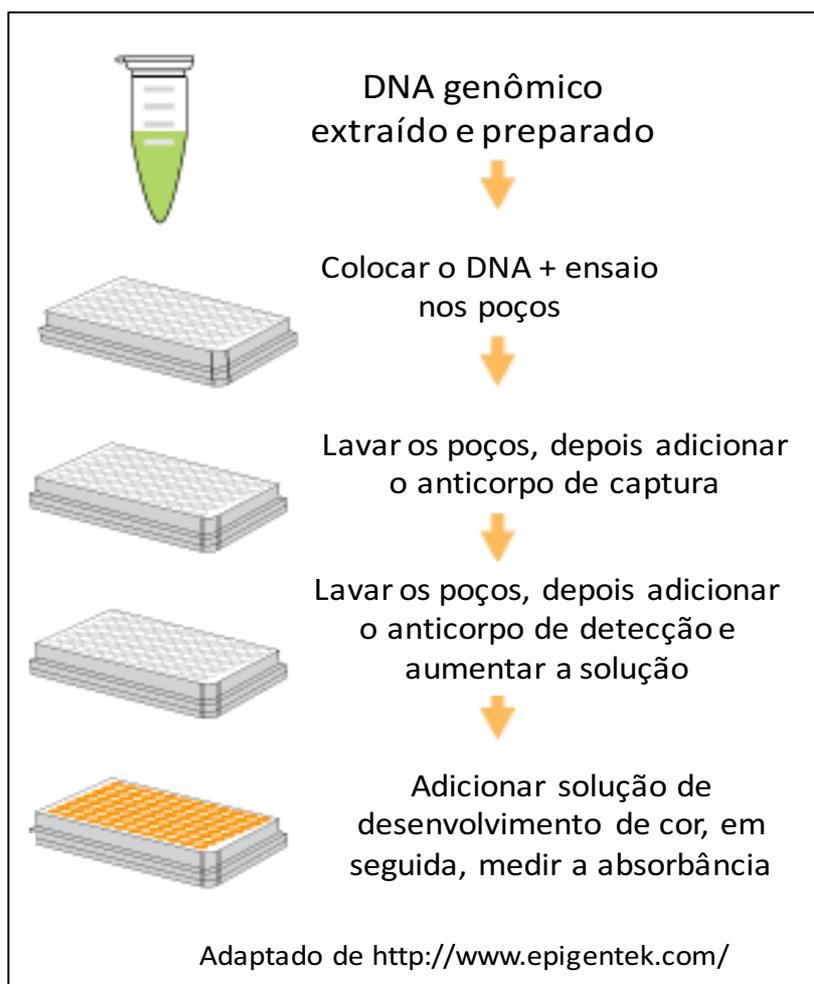
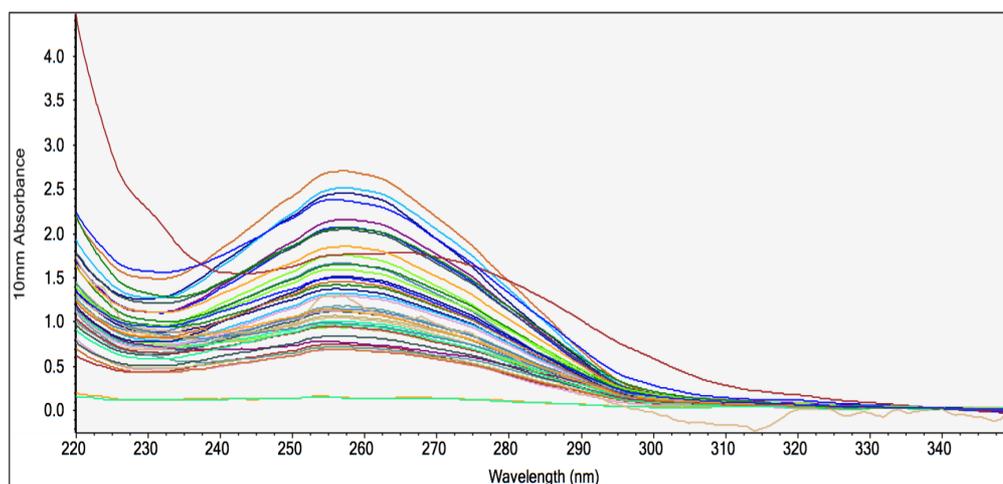


Figura 18: Fluxograma do método de quantificação de metilação do DNA genômico utilizando a técnica em ELISA no kit de Quantificação de Metilação **MetilFlash®**. Fontes: Jezini, D.L.
Fonte: adaptado de <http://www.epigentec.com/> (acessado em abril/2016).

ANEXO 12

Resultado da Quantificação de DNA genômico das amostras de bócio utilizando *Nanodrop*® detalhadas pelos números BTTNB.

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	23 LME	MB Core	9/30/2016 4:36:37 PM	72.3	µg/ml	1.447	0.796	1.82	1.56	DNA	50.00
2	23 LMD	MB Core	9/30/2016 4:40:20 PM	101.1	µg/ml	2.023	1.148	1.76	1.55	DNA	50.00
3	23 LMD*	MB Core	9/30/2016 4:41:57 PM	70.5	µg/ml	1.410	0.780	1.81	1.75	DNA	50.00
4	28 LSE	MB Core	9/30/2016 4:43:56 PM	46.4	µg/ml	0.927	0.520	1.78	1.65	DNA	50.00
5	28 LMD	MB Core	9/30/2016 4:45:27 PM	53.7	µg/ml	1.074	0.617	1.74	1.32	DNA	50.00
6	28 IS	MB Core	9/30/2016 4:46:11 PM	45.1	µg/ml	0.902	0.523	1.73	1.42	DNA	50.00
7	29 LSD	MB Core	9/30/2016 4:46:47 PM	40.1	µg/ml	0.802	0.477	1.68	1.66	DNA	50.00
8	28 II	MB Core	9/30/2016 4:47:28 PM	56.7	µg/ml	1.133	0.600	1.89	1.36	DNA	50.00
9	28 II 2nd	MB Core	9/30/2016 4:48:19 PM	77.1	µg/ml	1.542	0.883	1.75	1.66	DNA	50.00
10	28 LID	MB Core	9/30/2016 4:49:09 PM	46.9	µg/ml	0.937	0.579	1.62	1.07	DNA	50.00
11	28 LIE	MB Core	9/30/2016 4:49:43 PM	62.5	µg/ml	1.250	0.717	1.74	1.82	DNA	50.00
12	28 LME	MB Core	9/30/2016 4:50:36 PM	73.3	µg/ml	1.466	0.820	1.79	1.95	DNA	50.00
13	29 LSE	MB Core	9/30/2016 4:51:35 PM	36.2	µg/ml	0.725	0.485	1.49	1.01	DNA	50.00
14	29 LSD	MB Core	9/30/2016 4:52:10 PM	33.9	µg/ml	0.679	0.445	1.53	1.12	DNA	50.00
15	29 II	MB Core	9/30/2016 4:52:52 PM	51.1	µg/ml	1.021	0.615	1.66	1.19	DNA	50.00
16	29 LID	MB Core	9/30/2016 4:53:33 PM	63.9	µg/ml	1.278	0.740	1.73	1.65	DNA	50.00
17	29 LIE	MB Core	9/30/2016 4:54:11 PM	115.8	µg/ml	2.316	1.307	1.77	1.49	DNA	50.00
18	29 LME	MB Core	9/30/2016 4:54:56 PM	68.8	µg/ml	1.376	0.793	1.74	1.46	DNA	50.00
19	29 P	MB Core	9/30/2016 4:55:32 PM	32.5	µg/ml	0.649	0.391	1.66	1.57	DNA	50.00
20	30 LSE	MB Core	9/30/2016 4:56:11 PM	48.2	µg/ml	0.964	0.562	1.72	1.37	DNA	50.00
21	30 LMD	MB Core	9/30/2016 4:56:51 PM	90.5	µg/ml	1.810	1.008	1.79	1.66	DNA	50.00
22	30 IS	MB Core	9/30/2016 4:57:29 PM	87.1	µg/ml	1.743	1.443	1.21	0.77	DNA	50.00
23	30 LSD	MB Core	9/30/2016 4:58:01 PM	100.0	µg/ml	1.999	1.104	1.81	1.67	DNA	50.00
24	30 II	MB Core	9/30/2016 4:58:37 PM	44.6	µg/ml	0.893	0.554	1.61	1.00	DNA	50.00
25	30 LID	MB Core	9/30/2016 4:59:11 PM	44.9	µg/ml	0.897	0.538	1.67	1.21	DNA	50.00
26	30 LIE	MB Core	9/30/2016 4:59:53 PM	55.4	µg/ml	1.107	0.643	1.72	1.56	DNA	50.00
27	30 LME	MB Core	9/30/2016 5:01:43 PM	54.0	µg/ml	1.080	0.602	1.79	1.46	DNA	50.00
28	31 LSE	MB Core	9/30/2016 5:03:48 PM	66.2	µg/ml	1.323	0.742	1.78	1.52	DNA	50.00
29	31 LMD	MB Core	9/30/2016 5:04:47 PM	105.9	µg/ml	2.117	1.149	1.84	1.94	DNA	50.00
30	31 IS	MB Core	9/30/2016 5:05:34 PM	56.8	µg/ml	1.136	0.651	1.75	1.80	DNA	50.00
31	31 LSD	MB Core	9/30/2016 5:06:17 PM	34.0	µg/ml	0.679	0.403	1.68	1.49	DNA	50.00
32	31 II	MB Core	9/30/2016 5:07:16 PM	123.3	µg/ml	2.466	1.350	1.83	1.97	DNA	50.00
33	31 LID	MB Core	9/30/2016 5:08:14 PM	101.4	µg/ml	2.028	1.108	1.83	1.86	DNA	50.00
34	31 LIE	MB Core	9/30/2016 5:09:35 PM	80.4	µg/ml	1.609	0.909	1.77	1.61	DNA	50.00
35	31 LME	MB Core	9/30/2016 5:10:21 PM	132.4	µg/ml	2.648	1.437	1.84	1.80	DNA	50.00
36	29 LMD	MB Core	9/30/2016 5:11:18 PM	5.5	µg/ml	0.111	0.076	1.45	1.21	DNA	50.00
37	29 LMD 2nd	MB Core	9/30/2016 5:12:18 PM	5.6	µg/ml	0.113	0.084	1.34	1.22	DNA	50.00
38	29 LME	MB Core	9/30/2016 5:13:37 PM	35.4	µg/ml	0.709	0.382	1.85	1.73	DNA	50.00
39	21 LID	MB Core	9/30/2016 5:14:43 PM	53.6	µg/ml	1.072	0.595	1.80	1.76	DNA	50.00
40	21 IS	MB Core	9/30/2016 5:15:42 PM	49.9	µg/ml	0.999	0.557	1.79	1.51	DNA	50.00
41	21 II	MB Core	9/30/2016 5:16:31 PM	85.3	µg/ml	1.706	0.896	1.90	1.83	DNA	50.00
42	21 LSD	MB Core	9/30/2016 5:17:10 PM	80.5	µg/ml	1.609	0.830	1.94	1.86	DNA	50.00
43	21 LIE	MB Core	9/30/2016 5:17:57 PM	32.8	µg/ml	0.655	0.372	1.76	1.49	DNA	50.00
44	21 LSE	MB Core	9/30/2016 5:18:40 PM	120.4	µg/ml	2.408	1.205	2.00	1.94	DNA	50.00



Fonte: Jezini, D.L. de *Biochemistry Department at Ponce Health Science University, Ponce/Porto Rico, 2016.*

ANEXO 13

Tabela 5: Resultado da leitura da absorvância em espectrofotômetro do percentual de pan-metilação da 5-mC DNA de amostras de bôcio, estratificada por área de tireoide.

ID Number	Value 1	Value 2	Average	Blank	5-mC(ng)	5-mC %DNA Methylated
23 LME	1,567	1,628	1,5975	0,153	1,288409091	1,288409091
23 LMD	1,806	1,914	1,86	0,153	1,550909091	1,550909091
23 LMD	1,942	1,794	1,868	0,153	1,558909091	1,558909091
28 LSE	1,703	1,654	1,6785	0,153	1,369409091	1,369409091
28 LMD	1,517	1,341	1,429	0,153	1,119909091	1,119909091
28 IS	1,37	1,437	1,4035	0,153	1,094409091	1,094409091
28 LSD	1,448	1,474	1,461	0,153	1,151909091	1,151909091
20 II	1,31	1,4	1,355	0,153	1,045909091	1,045909091
28 LID	0,608	0,705	0,6565	0,153	0,347409091	0,347409091
28 LIE	1,527	1,61	1,5685	0,153	1,259409091	1,259409091
28 LME	1,554	1,454	1,504	0,153	1,194909091	1,194909091
29 LSE	1,36	1,387	1,3735	0,153	1,064409091	1,064409091
29 LSD	0,188	0,214	0,201	0,153	-0,108090909	-0,108090909
29 II	0,294	0,385	0,3395	0,153	0,030409091	0,030409091
29 LID	1,152	1,074	1,113	0,153	0,803909091	0,803909091
29 LIE	1,346	1,397	1,3715	0,153	1,062409091	1,062409091
29 LME	1,511	1,546	1,5285	0,153	1,219409091	1,219409091
29 LMD	2,441	2,315	2,378	0,153	2,068909091	2,068909091
29 P	1,685	1,848	1,7665	0,153	1,457409091	1,457409091
30 LSE	0,671	0,671	0,671	0,153	0,361909091	0,361909091
30 LMD	1,472	1,327	1,3995	0,153	1,090409091	1,090409091
30 IS	0,288	0,279	0,2835	0,153	-0,025590909	-0,025590909
30 LSD	1,17	1,299	1,2345	0,153	0,925409091	0,925409091
30 II	2,065	2,044	2,0545	0,153	1,745409091	1,745409091
30 LID	1,64	1,827	1,7335	0,153	1,424409091	1,424409091
30 LIE	1,507	1,554	1,5305	0,153	1,221409091	1,221409091
30 LME	1,628	1,708	1,668	0,153	1,358909091	1,358909091
31 LSE	1,742	1,877	1,8095	0,153	1,500409091	1,500409091
31 LMD	1,566	1,62	1,593	0,153	1,283909091	1,283909091
31 IS	1,526	1,465	1,4955	0,153	1,186409091	1,186409091
31 LSD	1,531	1,793	1,662	0,153	1,352909091	1,352909091
31 II	1,596	1,461	1,5285	0,153	1,219409091	1,219409091
31 LID	1,501	1,441	1,471	0,153	1,161909091	1,161909091
31 LIE	1,325	1,184	1,2545	0,153	0,945409091	0,945409091
31 LME	1,319	1,386	1,3525	0,153	1,043409091	1,043409091
21 LME	0,946	0,914	0,93	0,153	0,620909091	0,620909091
21 LID	1,177	0,801	0,989	0,153	0,679909091	0,679909091
21 IS	0,974	1,519	1,2465	0,153	0,937409091	0,937409091
21 II	0,929	0,852	0,8905	0,153	0,581409091	0,581409091
21 LSD	0,957	0,756	0,8565	0,153	0,547409091	0,547409091
21 LIE	0,458	0,58	0,519	0,153	0,209909091	0,209909091
21 LSE	0,927	0,803	0,865	0,153	0,555909091	0,555909091

Fonte: Jezini, D.L., leitura da absorvância em espectrofotômetro. *Biochemistry Department at Ponce Health Science University*, Ponce/Porto Rico, 2016.

Distribuição da Metilação global do DNA comparada à variação tecidual do histopatológico dos pacientes