

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Joyce Nascimento Santos

Perfil bioquímico e significado clínico de genes da via *MAPK/KINASE* no diagnóstico de neoplasias da tireoide

São José dos Campos - SP
2022

JOYCE NASCIMENTO SANTOS

Perfil bioquímico e significado clínico de genes da via *MAPK/KINASE* no diagnóstico de neoplasias da tireoide

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Renata de Azevedo Canevari

São José dos Campos - SP
2022

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Santos, Joyce Nascimento

Perfil bioquímico e significado clínico de genes da via MAPK/KINASE no diagnóstico de neoplasias da tireoide / Joyce Nascimento Santos; orientadora, Renata de Azevedo Canevari. - São José dos Campos, SP, 2022.

1 CD-ROM, 85 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. tireoide. 3. neoplasia. 4. MAPK/KINASE. I. Canevari, Renata de Azevedo, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Joyce Nascimento Santos, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 20 de Maio de 2022.



Autor(a) da Obra

Data da defesa: 07 / 03 / 22

JOYCE NASCIMENTO SANTOS

**“PERFIL BIOQUÍMICO E SIGNIFICADO CLÍNICO DE GENES DA VIA MAPK/KINASE
NO DIAGNÓSTICO DE NEOPLASIAS DA TIREOIDE”.**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF. DR. LUÍS EDUARDO SILVA SOARES

Luís Eduardo Silva Soares

PROF.ª DR.ª RENATA DE AZEVEDO CANEVARI

Renata de Azevedo Canevari

PROF.ª DR.ª SARA MARTORELI DA SILVEIRA BINATO - Uninove

Sara Martoreli da Silveira Binato

Prof.ª Dr.ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 07 de março de 2022.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus pelas bênçãos concedidas e pelas realizações centradas em Sua vontade.

Agradeço imensamente a minha família pelo apoio e suporte durante toda a trajetória. Por acreditarem em meu potencial e não me deixarem cair.

Agradeço a Profa Dra Renata de Azevedo Canevari por compartilhar seu conhecimento, tempo e ensinamentos que vão além sobre biologia molecular e câncer. À todas as correções, auxílios e incentivos na busca de um trabalho polido e por acreditar em meu potencial.

Agradeço a todos os companheiros e colaboradores do Laboratório de Biologia Molecular do Câncer pelo apoio direto e indireto durante essa jornada.

Agradeço aos pacientes que aceitaram doar amostras ao Biobanco ICESP em um momento tão delicado e incerto que esta doença possui.

Agradeço a equipe do Biobanco ICESP, em especial ao Dr. Roger Chammas e Dra. Miyuki Uno pelo auxílio.

Agradeço ao Dr. Tanmoy Bhattacharjee pela ajuda e realização das análises de FTIR.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação ValeParaibana de Ensino.

RESUMO

As neoplasias de tireoide são os principais tipos de malignidade endócrina que atualmente apresentam incidência crescente nos últimos anos. O diagnóstico pode apresentar resultados inconclusivos, levando a necessidade do emprego de técnicas adicionais mais precisas, tais como a análise molecular, proteica e por espectroscopia FT-IR. Com este tipo de abordagem mais possibilidades diagnósticas, como também e prognósticas poderão ser realizadas. Neste sentido, é essencial a busca de marcadores moleculares para o diagnóstico entre os diferentes tipos histológicos. O objetivo deste estudo consistiu em identificar marcadores moleculares pertencentes à via *MAPK/KINASE* em carcinomas papilífero de tireoide (CPT) e lesões de bócio, quando comparados aos seus tecidos normais adjacentes, além de avaliar as características espectrais para a determinação do diagnóstico dessas lesões. Para isso foi realizada a análise da expressão de genes e proteína pertencentes a via *MAPK/KINASE* pela técnica de qRT-PCR e imunohistoquímica, respectivamente, e a avaliação das amostras pela técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Foram utilizadas 70 amostras de tecidos de tireoide, sendo 25 casos classificados pela análise citopatologia como CPT e 25 casos diagnosticados como bócio, com respectivos tecidos normais adjacentes. A análise por espectroscopia FTIR foi capaz de classificar tecidos normais, bócio e CPT com alta sensibilidade, mostrando a efetividade da técnica em classificar com alta sensibilidade as lesões de tireoide das amostras normais, possuindo potencial para aplicações clínicas no diagnóstico de câncer e lesões de tireoide. A análise da proteína Ciclina A1 demonstrou o potencial para o diagnóstico, sugerindo que esta proteína é um potencial marcador proteico em CPT. A análise molecular dos genes *FOS* e *JUN* foram eficazes na identificação de lesões tireoidianas e os genes *MAP2K6*, *CCNA1* e *SFN* são potenciais marcadores moleculares para a identificação de amostras de CPT.

Palavras-chave: tireoide, neoplasia, expressão gênica, marcador molecular, *MAPK/KINASE*.

**BIOCHEMICAL PROFILE AND CLINICAL SIGNIFICANCE OF MAPK/KINASE
PATHWAY GENES IN THE DIAGNOSIS OF THYROID NEOPLASMS
ABSTRACT**

Thyroid neoplasms are the main types of endocrine malignancy that currently have an increasing incidence in recent years. The diagnosis may present inconclusive results, leading to the need to use additional, more precise techniques, such as molecular and protein analysis and by FT-IR spectroscopy. With this type of approach, more diagnostic and prognostic possibilities can be realized. In this sense, it is essential to search for molecular markers for the diagnosis among the different histological types. The objective of this study was to identify molecular markers belonging to the MAPK/KINASE pathway in papillary thyroid carcinomas (PTC) and goiter lesions, when compared to their adjacent normal tissues, in addition to evaluating the spectral characteristics to determine the diagnosis of these lesions. For this, the analysis of the expression of genes and proteins belonging to the MAPK/KINASE pathway was performed by the qRT-PCR and immunohistochemistry technique, respectively, and the evaluation of the samples by the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) technique. 70 samples of thyroid tissue were used, 25 cases classified by cytopathology analysis as PTC and 25 cases diagnosed as goiter, with the respective adjacent normal tissues. Analysis by FTIR spectroscopy was able to classify normal tissues, goiter and PTC with high sensitivity, showing the effectiveness of the technique in classifying thyroid lesions from normal samples with high sensitivity, having potential for clinical applications in the diagnosis of cancer and thyroid lesions. . Analysis of the Cyclin A1 protein demonstrated the potential for diagnosis, suggesting that this protein is a potential protein marker in PTC. Molecular analysis of the FOS and JUN genes were effective in identifying thyroid lesions and the MAP2K6, CCNA1 and SFN genes are potential molecular markers for the identification of PTC samples.

Keywords: thyroid, neoplasm, gene expression, molecular marker, MAPK/KINASE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) Amostras de RNA visualizadas pelas bandas 18S e 28S em eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. (B) Amostras de RNA visualizadas no sistema de eletroforese capilar utilizando o Agilent 2100 Bioanalyzer 2100 (B). MN: marcador de peso molecular. RIN: RNA integrity number.....	44
Figura 2: Curvas padrões e curvas de amplificação para os genes alvo <i>CCNA1</i> (A), <i>CDKN1C</i> (B), <i>FOS</i>	46
Figura 3. Curvas de dissociação para os genes <i>CCNA1</i> (A), <i>CDKN1C</i> (B), (C) Gene <i>FOS</i> , (D) Gene <i>HSPA5</i> , (E) Gene <i>JUN</i> , (F) Gene <i>KSRI</i> , (G) Gene <i>MAP2K6</i> , (H) Gene <i>MAPK8IP2</i> , (I) Gene <i>SFN</i> , (J)Gene <i>MRPL19</i>	49
Figura 4. Comparação entre medianas dos níveis de expressão gênica pela técnica RT-qPCR dos genes <i>CCNA1</i> , <i>FOS</i> , <i>JUN</i> , <i>KSRI</i> , <i>MAP2K6</i> , <i>MAPK8IP2</i> , <i>HSPA5</i> , <i>SFN</i> e <i>CDKN1C</i> em amostras de CPT e grupo normal (grupo controle) (Análise 1). QR: quantificação relativa do gene. PTC: carcinoma papilífero de tireoide. NORMAL: amostras não tumorais de tireoide.	54
Figura 5. Comparação entre medianas dos níveis de expressão gênica pela técnica RT-qPCR do genes <i>CCNA1</i> , <i>FOS</i> , <i>JUN</i> , <i>KSRI</i> , <i>MAP2K6</i> , <i>MAPK8IP2</i> , <i>HSPA5</i> , <i>SFN</i> e <i>CDKN1C</i> em amostras de bócio e grupo normal (grupo controle) (Análise 2). QR: quantificação relativa do gene. GOITER: amostras de bócio. NORMAL: amostras não tumorais de tireoide.	54
Figura 6. Comparação entre medianas dos níveis de expressão gênica pela técnica RT-qPCR do genes <i>CCNA1</i> , <i>FOS</i> , <i>JUN</i> , <i>KSRI</i> , <i>MAP2K6</i> , <i>MAPK8IP2</i> , <i>HSPA5</i> , <i>SFN</i> e <i>CDKN1C</i> em amostras de CPT e grupo normal adjacente (grupo controle) (Análise 3). QR: quantificação relativa do gene. PTC: carcinoma papilífero de tireoide. ADJCENTE NORMAL: amostras normais adjacentes.	55
Figura 7. Comparação entre medianas dos níveis de expressão gênica pela técnica RT-qPCR dos genes <i>CCNA1</i> , <i>FOS</i> , <i>JUN</i> , <i>KSRI</i> , <i>MAP2K6</i> , <i>MAPK8IP2</i> , <i>HSPA5</i> , <i>SFN</i> e <i>CDKN1C</i> em amostras de bócio e grupo normal adjacente (grupo controle) (Análise 4). QR: quantificação relativa do gene. ADJCENTE NORMAL: amostras normais adjacentes. GOITER: amostras de bócio.	55
Figura 8. Comparação entre medianas dos níveis de expressão gênica pela técnica RT-qPCR do genes <i>CCNA1</i> , <i>FOS</i> , <i>JUN</i> , <i>KSRI</i> , <i>MAP2K6</i> , <i>MAPK8IP2</i> , <i>HSPA5</i> , <i>SFN</i> e <i>CDKN1C</i> em amostras de CPT e bócio (grupo controle) (Análise 5). QR: quantificação relativa do gene. PTC: carcinoma papilífero de tireoide. GOITER: amostras de bócio.....	56
Figura 9. Fotomiografia representativa dos <i>scores</i> da intensidade da imunomarcação da Ciclina A1. A: <i>score</i> 0 – ausência de marcação. B: <i>score</i> 1 – marcação fraca. C: <i>score</i> 2 – marcação levemente moderada. D: <i>score</i> 3 – marcação moderada. E: <i>score</i> 4 – marcação forte. Aumento real 10x.	57
Figura 10. Fotomiografia comparativa da expressão da Ciclina A1 por IHC em tecido de CPT (A) e Bócio(B). Aumento real 10x.....	58
Figura 11. (A) Espectro médio de amostra de bócio e normais adjacentes avaliados por FTIR. (B) Espectros médio de amostra de CPT, bócio e normais adjacentes avaliados por FTIR. PTC: carcinoma papilífero de tireoide. Goiter: bócio. Adjacent normal: normal adjacente de bócio. Normal: normal adjacente de bócio.....	60
Figura 12. Análise multivariada PCA. (A) Análise multivariada PCA em amostra de bócio e amostra seus normais adjacentes. Goiter: espectro de amostras de bócio. Adjacent normal: espectro de amostras normaladjacente de bócio. (B) Análise multivariada PCA em amostra de CPT, amostras de bócio e amostra seus normais adjacentes. PTC: espectro de amostras de carcinoma papilífero de tireoide. Goiter: espectro de	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostra de CPT, b3cio e seus respectivos normais adjacentes nas an3lises realizadas. CPT: carcinoma papil3fero de tireoide. B: b3cio. NAdj: normal adjacente. N: normal de tecido tireoidiano n3o tumoral	34
Tabela 2. Nove genes alvo e gene end3geno avaliados por RT-qPCR.	39
Tabela 3: Efici3ncia de amplifica3o pelos valores de slope, valor de efici3ncia e coeficiente de linearidade dos primers para a amplifica3o dos genes alvos CCNA1, CDKN1C, FOS, HSPA5, JUN, KSR1, MAP2K6, MAPK8IP2, SFN e do gene end3geno MRPL19. As concentra3es das dilui3es utilizadas para a obten3o dos valores de slope foram de 1000, 200, 40, 8 e 1,6 ng/ μ l de cDNA.....	45
Tabela 4. An3lise por imuno express3o da Ciclina A1 em amostras CPT e amostras de b3cio.	58
Tabela 5. Principais modos vibracionais detectados nas amostras de tecido tireoidiano (CPT, b3cio e normal adjacente de b3cio). *: modo vibracional, vs: modo vibracional de estiramento sim3trico, vas:modo vibracional de estiramento assim3trico.....	59
Tabela 6. An3lise discriminante de componente linear principal (PC- LDA). Em A: B (b3cio) e NA (normal adjacente). Em B: CPT (carcinoma papil3fero de tireoide), B (b3cio) e NA (normal adjacente).....	63
Tabela 7. LOOCV. Em A: B (b3cio) e NA (normal adjacente). Em B: CPT (carcinoma papil3fero de tireoide), B (b3cio) e NA (normal adjacente).	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
BMN	Bócio multinodular
<i>BRAF</i>	<i>B-Raf Proto-Oncogene</i>
<i>CCNA1</i>	<i>Cyclin A1</i>
<i>CDKN1C</i>	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1C</i>
cDNA	DNA complementar
CFT	Carcinoma Folicular de Tireoide
CPT	Carcinoma papilífero de tireoide
CPTVF	Carcinoma papilífero de tireoide variante folicular
Ct	Ciclo <i>Threshold</i>
<i>Cyclin-A1</i>	Ciclina A1
<i>EGF</i>	Fator de crescimento epidérmica
<i>ERK</i>	Quinase regulada por sinal extracelular
<i>FOS</i>	<i>Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i>
FTIR	Espectroscopia de infravermelho pela transformada de <i>Fourier</i>
<i>HSPA5</i>	<i>Heat shock protein family A (Hsp70) member 5</i>
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IHC	Imunohistoquímica
<i>JUN</i>	<i>Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i>
<i>KSR1</i>	<i>Kinase suppressor of ras 1</i>
<i>MAPK/KINASE</i>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
<i>MAPKKK</i>	MAP quinase quinase quinase
<i>MAPKK</i>	MAP quinase quinase
<i>MAPK8IP2</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2</i>
<i>MAP2K6</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 6</i>
<i>MRPL19</i>	<i>Mitochondrial Ribosomal Protein L19</i>
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina

PCA	Análise de componentes principais
<i>RAS</i>	<i>Ras family Proto-Oncogene</i>
<i>RET</i>	<i>Ret Proto-Oncogene</i>
<i>SFN</i>	<i>Stratifin</i>
TG	Tireoglobulina
TPO	Tireoperoxidase
TSH	Hormônio estimulador da tireoide
US	Ultrassom
$\Delta\Delta Ct$	Delta-Delta Ct

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Glândula da Tireoide	14
2.2 Patologias da glândula tireoide	14
2.2.1 <i>Bócio nodular</i>	15
2.2.2 <i>Carcinoma de tireoide</i>	16
2.3 Métodos Diagnósticos e prognósticos em câncer de tireoide.....	17
2.4 Marcadores moleculares.....	19
2.6 Marcadores proteicos.....	26
2.7 Espectroscopia infravermelho por transformada de <i>Fourier</i> (FTIR)	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Obtenção das amostras	33
4.2 Análise de Expressão gênica.....	36
4.2.1 <i>Genes selecionados</i>	36
4.2.2 Extração, purificação e quantificação do RNA	36
4.2.3 <i>Síntese de cDNA</i>	37
4.2.4 <i>Análise Quantitativa pela RT-qPCR</i>	37
4.2.5 <i>Análise estatística</i>	39
4.3 Análise de Imunohistoquímica	40
4.3.2 Anticorpos	40
4.3.3 Procedimento	40
4.3.4 <i>Análise quantitativa de imagem</i>	41
4.4 Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier - FTIR	42
4.4.1 <i>Amostras</i>	42
4.4.2 <i>Obtenção dos espectros</i>	42
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Expressão gênica	44
5.2 Imunoexpressão Ciclina A1.....	56
5.3 Espectroscopia FT-IR	58
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXO 1	80
ANEXO 2	81
APÊNDICE 1	84
APÊNDICE 2	85

1 INTRODUÇÃO

Pelo fato de na última década ter ocorrido um crescimento rápido de pacientes diagnosticados com tumores tireoidianos, principalmente a população feminina sendo o quinto tipo mais incidente, o desenvolvimento desses tumores, tanto do ponto de vista genético quanto clínico, merece ser amplamente estudado.

O CPT é o principal tipo histológico e representa mais de 85% de todos os cânceres de tireoide, embora este tipo de tumor apresenta uma evolução lenta, assintomática e ser um câncer indolente com bom prognóstico e baixa taxa de mortalidade, algumas características clinicopatológicas são conhecidas por estarem correlacionadas com evoluções fatais, como os tumores primários de grandes dimensões e metástases distantes, sendo este, um importante fator de risco para recorrência e baixa sobrevida dos pacientes. O bócio é definido como aumento da glândula tireoide sendo secundária a proliferação multifocal de tireócitos, resultando em estruturas foliculares heterogêneas. Essa doença eleva-se a cada ano em taxas alarmantes, afetando 10% de pessoas em todo mundo. No qual, a frequência é mais alta em áreas onde é observada baixa ingestão de iodo podendo atingir até 80% de toda população. Aproximadamente de 5 a 10% dos bócios podem desenvolver um carcinoma de tireoide, sendo o mais encontrado o carcinoma papilífero de tireoide.

As técnicas utilizadas rotineiramente para o diagnóstico destes tumores tais como US e PAAF, apresentam uma baixa especificidade e sensibilidade, além de elevados erros de interpretação das variantes histológicas, levando os pacientes a se submeterem as cirurgias sem a devida necessidade, e conseqüentemente ocasionando o aumento das conseqüências clínicas e psicológicas e com os custos globais de saúde. Por exemplo é relatado que somente 20% dos casos indeterminados são de fato neoplasias malignas, e aproximadamente de 2 a 37% dos resultados são falso-negativos. Além disso, outras limitações deste método ocorrem com frequência, como a dificuldade na amostragem de pequenos tumores, diagnósticos inconclusivos e sangramento no local do procedimento.

Atualmente sabe-se que os tumores malignos, adotam características clínicas, histológicas, bioquímicas, e genéticas exclusivas e por isso é de grande importância a realização de um diagnóstico precoce e individualizado, possibilitando assim, um tratamento mais efetivo para cada paciente. A análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de *Fourier* (FTIR) é uma tecnologia não invasiva que pode detectar mudanças de grupo funcional em moléculas das células e tecidos. A identificação da expressão proteica é realizada principalmente pela técnica de IHC é a mais utilizada para em muitos tumores,

visto que as proteínas podem ser utilizadas como alvos de marcadores celulares. As alterações genômicas e o descontrole da expressão gênica, são eventos importantes para o desenvolvimento e progressão tumoral nos tecidos humanos e seu conhecimento favorece o diagnóstico, prognóstico e acompanhamento. Contudo, novas perspectivas utilizando técnicas de biologia molecular têm levado a identificação de marcadores moleculares específicos para a determinação tanto do diagnóstico quanto do prognóstico do tumor. Assim, a destes estudos em conjunto poderá levar a uma melhor compreensão da bioquímica molecular de neoplasias tireoidianas, representando um avanço no diagnóstico de lesões tireoidianas que atualmente são realizadas principalmente por PAAF e por histologia.

Considerando assim o potencial dessas técnicas na diferenciação de tecidos biológicos e da relação da via de sinalização *MAPK/KINASE* na patogênese de vários tipos de cânceres, bem como a existência de poucos estudos relacionando esta via com a etiologia e diagnóstico dos tumores de tireoide, em especial com os carcinomas papilíferos, acreditamos que a análise molecular dessa via e as realizações da análise por espectroscopia FT-IR e imunohistoquímica, poderão auxiliar em um diagnóstico mais preciso destes tumores, que atualmente ainda apresentam alta taxa de imprecisão quando realizado por meio das técnicas diagnósticas tradicionais utilizadas em rotina clínica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Glândula da Tireoide

A glândula tireoide é uma estrutura situada na porção baixa do pescoço, sendo constituída por dois lobos, possuindo em média, 15 a 20 gramas, sendo circundada por uma rede de vasos sanguíneos, os quais levam os hormônios produzidos para o corpo. Tem como função ser uma glândula endócrina e responsável pela produção de hormônios (ALLEN; FINGERET, 2020). Essa glândula é responsável pela produção dos hormônios T3 (triiodotironina) e T4 (tiroxina), importantes para o metabolismo do organismo. Os hormônios tireoidianos modulam o crescimento celular, o metabolismo e a diferenciação por meio da ligação do T3 aos receptores de hormônio tireoidiano, levando à ativação de vias genômicas (CHAN *et al.*, 2017). A ação desta glândula na produção desses hormônios é regulada pela ação do hormônio tireoestimulante outireotrofina (TSH) que é controlado pelo eixo hipotálamo-hipófise (CITTERIO *et al.*, 2019).

O TSH modula a função tireoidiana, exercendo um efeito trópico e diferenciado nas células foliculares que são fundamentais para a função endócrina, garantindo assim a síntese e liberação dos hormônios T3 e T4 e o estímulo das etapas da biossíntese hormonal, tais como a produção da tireoglobulina (TG), transporte de iodeto, produção da enzima tireoperoxidase (TPO), síntese de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) e liberação hormonal. Por meio da secreção do TSH, a glândula modula a atividade metabólica de uma variedade de tecidos, aumentando o consumo de oxigênio, o catabolismo de glicose e a degradação de ácidos graxos no fígado para a síntese de colesterol, sendo essas funções fundamentais para a manutenção do equilíbrio do organismo. Deste modo, as células foliculares são indispensáveis para a função endócrina adequada da tireoide, onde a alteração das mesmas poderá levar ao surgimento de uma infinidade de doenças específicas, incluindo as neoplasias tireoidianas e até mesmo o câncer (AL-SUHAIMI *et al.*, 2019).

2.2 Patologias da glândula tireoide

Os distúrbios da tireoide são os problemas clínicos mais comuns na prática endócrina (NAMBRON; ROSENTHAL; BAHL, 2020; UPADHYAYA *et al.*, 2017). As patologias que acometem a glândula tireoide podem ser originadas por um desequilíbrio hormonal

estimulado por fatores externos, endógenos e/ou genéticos. As principais patologias benignas encontradas na glândula tireoide são a presença de nódulos, bócio, tireoidites e adenomas, embora a formação de patologias benignas não seja clara, 38% podem desaparecer em 10 a 30 anos, sendo o acompanhamento clínico a conduta clínica. (XIA *et al.*, 2021; MOGHADDAM *et al.*, 2016). As patologias malignas são determinadas pelo carcinoma de tireoide, que geralmente se origina de células foliculares, sendo bem diferenciados, ou de células parafoliculares, que constituem os carcinomas pouco diferenciados. Em contraste com os nódulos benignos, quando crescem gradativamente, é necessário tratamento médico e cirúrgico, visto que estes carcinomas diferem um do outro em termos de propensão a recorrência e disseminação metastática (XIA *et al.*, 2021).

2.2.1 Bócio nodular

Uma das principais e mais comuns patologias que pode acometer a glândula da tireoide, alterando seu formato ou função, é a presença de bócios, as quais podem se apresentar como nódulos solitários, únicos ou como bócios multinodulares (KRAVCHENKO *et al.*, 2020). O bócio nodular é na maioria das vezes, visto pelo aumento da glândula tireoide que se caracteriza por um crescimento excessivo e estrutural ou uma transformação funcional de uma ou várias áreas dentro do tecido normal da tireoide (CAN *et al.*, 2020). O bócio multinodular (BMN) é definido como aumento da glândula tireoide sendo secundária a proliferação multifocal de tireócitos, resultando em estruturas foliculares heterogêneas (CAN *et al.*, 2020). Os termos bócio adenomatoso, bócio nodular atóxico e bócio coloide nodular são usados para descrever o BMN. Essa doença eleva-se a cada ano em taxas alarmantes, afetando 10% de pessoas em todo mundo (KRAVCHENKO *et al.*, 2020). No qual, a frequência de BMN é mais alta em áreas onde é observada baixa ingestão de iodo podendo atingir até 80% de toda população (CAO *et al.*, 2017).

A deficiência crônica de iodo acarreta aumento da secreção endógena do hormônio hipofisário TSH e, conseqüentemente, estimula a função e o crescimento em todas as células foliculares. Devido à heterogeneidade intrínseca própria das células foliculares, a resposta ao estímulo é amplamente variável, ocorrendo a formação de nódulos a partir dos tireócitos com elevado potencial para o crescimento (YILDIRIM *et al.*, 2020). O TSH não está apenas envolvido no controle das funções diferenciadas, incluindo a expressão dos genes específicos da tireoide, mas também na regulação da expressão dos fatores de crescimento e seus

receptores. Estudos com cultura de células de BMN demonstraram que a sinalização independente do TSH e dependente de fator decrescimento semelhante à insulina (IGF-I) e/ou fator de crescimento epidérmico (EGF) pode ter grande importância na regulação do crescimento de tireócitos humanos (KYRILLI *et al.*, 2017; YILDIRIM *et al.*, 2020).

Os nódulos do BMN podem ser categorizados como lesões encapsuladas (adenomas) ou lesões sem cápsula (nódulos adenomatosos) e por critérios morfológicos adotados pela OMS classificam-se os nódulos em graus que variam de 0 a 5, sendo que o grau 0 significa que a glândula de tireoide não é determinada visualmente e por palpação e o último grau 5 significa que a glândula tireoide está alargada causando compressão de órgãos adjacentes. Em termos funcionais, dependendo da capacidade de captar iodo detectado por meio da cintilografia de tireoide, os nódulos são classificados como frios, constituindo aproximadamente 85% dos nódulos, ou quentes, constituindo 5% dos nódulos, sendo que 10% dos nódulos possuem captação normal na cintilografia. Vale ressaltar, que a prevalência pode variar geograficamente dependendo do consumo de iodo de cada população (CAO *et al.*, 2017).

Aproximadamente de 5 a 10% dos BMNs podem desenvolver um carcinoma de tireoide, sendo o mais encontrado o carcinoma papilífero de tireoide (CPT) (MUSA *et al.*, 2017). O diagnóstico histológico do carcinoma da tireoide derivado do BMN é difícil (LÓPEZ, ZABALA, CURA, 2013) e deste modo critérios para detectar a malignidade no BMN são variáveis, sendo extremamente difícil definir com exatidão áreas com potencial de crescimento maligno das áreas com tecido benigno (MEDEIROS-NETO; RUBIO, 2016). A indicação da tireoidectomia em pacientes com bócio somente é indicada após a observação de alguns critérios como: histórico médico completo, avaliação clínica da cabeça-pescoço ultrassom (US) da glândula e consequente sintomas que afetam a qualidade de vida do paciente (HOLZER *et al.*, 2020).

2.2.2 Carcinoma de tireoide

O câncer de tireoide é a malignidade endócrina mais comum, acometendo principalmente a população feminina. A incidência desta neoplasia está aumentando e é uma preocupação importante para a saúde pública. Segundo o Ministério da Saúde em 2020 foram estimados cerca de 11.950 novos casos para o gênero feminino, tornando-o o quinto mais frequente em mulheres (INCA, 2020). Embora a taxa de incidência de câncer de tireoide tenha se estabilizado nos últimos anos, observa-se no mundo um aumento referente aos estágios avançados dessa doença, com uma elevada taxa de metástases linfonodais e maior risco de

recidiva, desta forma, diminuindo a qualidade de vida do paciente (MEDAS *et al.*, 2020; RUIZ PARDO *et al.*, 2020). Além disso, é evidenciado que a maior incidência deste câncer são tumores do menor tamanho e em um estágio denominado subclínico da doença, devido a melhoria dos métodos de diagnósticos utilizados em rotina clínica (PARDO *et al.*, 2020).

Os carcinomas são classificados como carcinomas oriundos de células foliculares ou parafoliculares. Em relação aos tipos histológicos oriundos de células foliculares, diferentes carcinomas são descritos: CPT, incluindo seu subtipo carcinoma papilífero detireoide variante folicular (CPTVF), carcinomas foliculares, carcinomas de células de Hürthle e carcinomas pouco diferenciados e anaplásicos. Os carcinomas originados de células parafoliculares é descrito o carcinoma medular de tireoide (PAN *et al.*, 2017; CHMIELIK *et al.*, 2018). O CPT é o principal tipo histológico e representa mais de 85% de todos os cânceres de tireoide bem diferenciados de origem folicular, ocorrendo em maior frequência em mulheres na quarta e quinta década de vida (MANSOUR *et al.*, 2018). Dentre os parâmetros de risco que devem ser considerados, podemos incluir: histórico familiar, histórico de exposição à radiação, achados clínicos e idade do paciente (RONEN *et al.*, 2020). Embora este tipo de tumor apresenta uma evolução lenta, assintomática e ser um câncer indolente com bom prognóstico e baixa taxa de mortalidade, algumas características clinico patológicas são conhecidas por estarem correlacionadas com evoluções fatais, como os tumores primários de grandes dimensões e metástases distantes, sendo este, um importante fator de risco para recorrência e baixa sobrevida dos pacientes (YU *et al.*, 2020). As metástases em linfonodos cervicais são consideradas um fator de risco independente para recorrência e aumento da morbidade, sendo encontradas em 20 a 50% dos casos de CPT, sendo uma informação extremamente importante para o tratamento do paciente (CHANG *et al.*, 2017). De todos os casos de CPT, 3,8% dos casos mostram metástases à distância, com o mais comum deles sendo nos pulmões e ossos, enquanto que as metástases intra-abdominais são extremamente raras (NIMMAGADDA *et al.*, 2019).

2.3 Métodos Diagnósticos e prognósticos em câncer de tireoide

Os métodos diagnósticos atuais utilizados na rotina clínica incluem uma avaliação clínica cuidadosa, a realização de testes bioquímicos (dosagens de hormônios e de anticorpos), exame de ultrassom da tireoide e a indicação da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) quando se suspeita que o paciente é portador de uma neoplasia maligna (ABDULLAH *et al.*, 2019). A biópsia pela PAAF é hoje o principal método para determinar

se um nódulo tireoidiano é benigno ou maligno, sendo considerado o padrão ouro para o diagnóstico de nódulos tireoidianos. No entanto, a sensibilidade deste procedimento apresenta muitas variações, com taxa considerável de diagnóstico de lesões foliculares de significado indeterminado resultando em dificuldades na conduta clínica dos pacientes, muitas vezes necessitando da realização de uma nova biópsia ou levando o paciente a procedimentos cirúrgicos para retirada da glândula sem necessidade. Por exemplo é relatado que somente 20% dos casos indeterminados são de fato neoplasias malignas, e aproximadamente de 2 a 37% dos resultados são falso-negativos (MISIAKOS *et al.*, 2016; AHN, PARK, CHOI; 2017; MAYSON *et al.*, 2019). Além disso, outras limitações deste método ocorrem com frequência, como a dificuldade na amostragem de pequenos tumores, diagnósticos inconclusivos e sangramento no local do procedimento (ZHANG *et al.*, 2017; MAYSON *et al.*, 2019).

É extremamente importante entender o desenvolvimento do CPT bem como garantir o diagnóstico correto destas lesões com o intuito de melhorar o prognóstico dos pacientes e fornecer com isso suporte para novas terapêuticas. Atualmente a busca de um tratamento totalmente efetivo para os diferentes tipos de câncer é o foco da área da oncologia, o que seria possível se houvesse certeza do diagnóstico e prognóstico dessas neoplasias. No entanto, os atuais métodos diagnósticos e prognósticos não permitem essa certeza e muitas vezes não conseguem definir o diagnóstico e a agressividade do tumor.

Assim, diante da dificuldade atual da obtenção de diagnósticos precisos para as diferentes lesões da tireoide e da determinação segura das margens cirúrgicas livres do tumor, que são realizadas rotineiramente por meio das análises citológicas e histopatológicas, o estabelecimento de novos métodos de análise de rotina associados a essas técnicas tradicionais, poderá resultar em um diagnóstico mais preciso e seguro, além de contribuir para uma determinação mais exata das margens de segurança da lesão.

Considerando estes aspectos, muitos trabalhos sobre câncer de tireoide têm sugerido o emprego de novos métodos, sejam moleculares (OSPINA *et al.*, 2020), de análise proteica por meio de técnicas, tais como a análise de imunohistoquímica (IHC) (KIM; ROH; PARK, 2016) e bioquímicos por meio da análise de espectroscopia, tais como a análise de espectroscopia de infravermelho pela transformada de *Fourier* (FTIR) (MARTINEZ-MARIN *et al.*, 2017) para serem aplicados juntamente com a PAAF no sentido de fornecer com maior exatidão o diagnóstico, o grau de invasividade tumoral e o prognóstico destas lesões quando comparadas com a análise citopatológica obtida pela PAAF.

Deste modo, é importante buscar novos métodos para se detectar além das alterações histológicas, alterações bioquímicas e moleculares da glândula tireoide com o objetivo de

compreender melhor a biologia deste tumor e aprimorar o diagnóstico e prognóstico das lesões benignas e malignas que ocorrem nesta glândula. Atualmente estudos que avaliam o perfil genético das lesões de tireoide têm sido realizados no sentido de auxiliar os patologistas na determinação de um diagnóstico e prognóstico mais preciso, e conseqüentemente em um tratamento mais efetivo para os pacientes acometidos por esta patologia (RAZAVI *et al.*, 2017; OSPINA *et al.*, 2020).

Portanto, é essencial compreender os mecanismos moleculares dessas lesões para se identificar, por exemplo, marcadores diagnósticos entre os diferentes tipos histológicos, marcadores para identificação de carcinomas com alto risco de agressividade e marcadores de invasão tumoral.

2.4 Marcadores moleculares

As alterações genômicas e o descontrole da expressão gênica, são eventos importantes para o desenvolvimento e progressão tumoral nos tecidos humanos e seu conhecimento favorece o diagnóstico, prognóstico e acompanhamento (RANGEL-POZZO *et al.*, 2020; LAN *et al.*, 2018). Nas últimas décadas, progressos significativos têm sido realizados na compreensão dos perfis moleculares e na patogênese do câncer de tireoide, especialmente para o CPT, levando à identificação de alterações genéticas fundamentais e novas vias oncogênicas implicadas na iniciação e/ou desenvolvimento deste tumor (LIU *et al.*, 2018).

Considerando o CPT, até o momento não existem métodos efetivos que se determine com precisão o diagnóstico e o nível de malignidade e invasividade do tumor. Contudo, novas perspectivas utilizando técnicas de biologia molecular têm levado à identificação de marcadores moleculares específicos para a determinação tanto do diagnóstico quanto do prognóstico do tumor. Por exemplo, é relatado na literatura a comparação em diferentes tipos de lesões de tireoide e encontrado genes diferencialmente expressos entre os tecidos avaliados. Visto isso, a utilização de técnicas moleculares traz uma avaliação mais específica na análise do comportamento biológico do tecido, podendo detectar mudanças a nível molecular que posteriormente irão originar alterações teciduais, sendo considerada uma técnica ideal para o diagnóstico precoce de uma lesão (HU *et al.*, 2017; MANSOUR *et al.*, 2018).

A associação entre a mutação *BRAF*, gene pertencente à via *MAPK/KINASE*, e as características agressivas do tumor tem sido relatada na literatura (RANGEL-POZZO *et al.*, 2020; KURE; WADA; NAITO, 2019). Em 2015, a *American Thyroid Association (ATA)* incluiu em suas diretrizes a avaliação da presença ou ausência de fatores preditivos como a

mutação *V600E* no gene *BRAF* no sentido de melhorar a estratificação de risco para pacientes com CPT. A mutação *BRAF V600E* é o evento genético mais conhecido e comumente identificado nas amostras de CPT e, embora os achados ainda não sejam conclusivos, esta mutação tem sido associada com um risco aumentado de recorrência tumoral, metástase em linfonodo, extensão extratiroidal e câncer de tireoide em estágio avançado (ZHOU *et al.*, 2019).

Atualmente, além da descoberta da associação da mutação no gene *BRAF* com pior prognóstico em CPT, novos marcadores moleculares estão sendo determinados para um diagnóstico, prognóstico e tratamento mais efetivo destes tumores (BRITO; HAY, 2019). Alterações genéticas pontuais no gene *RAS* e fusões *RET/CPT*, além de mutações no promotor *TERT*, são observadas na população adulta e associada ao fenótipo mais agressivo (RANGEL-POZZO *et al.*, 2020). Estudos avaliando os perfis moleculares carcinomas da tireoide identificaram potenciais marcadores moleculares diagnósticos (ZELLA *et al.*, 2020; KONDROTIENÉ *et al.*, 2020; SHEIKHOESLAMI *et al.*, 2020).

Zella *et al.* (2020), analisaram a expressão do *CD133* e *ABCB5* com a agressividade tumoral em amostras de CPT. Para esse objetivo, o estudo utilizou para análise 119 amostras de CPT e 40 amostras de bócio pela técnica de *microarray* e a técnica de imuno-histoquímica utilizando os anticorpos anti-*CD133* e anti-*ABCB5*. No qual, foi possível observar a superexpressão de *ABCB5* no grupo CPT quando comparado com grupo de amostras de bócio, além disso, a prevalência positiva do *CD133* foi relacionada com metástase linfonodal, podendo ser utilizada como ferramenta diagnóstica cirurgica fundamental na identificação de paciente que necessitam de esvaziamento cervical.

Kondrotiené *et al.* (2020) analisaram o potencial diagnóstico em 49 amostras de CPT, 23 amostras de bócio e 57 amostras não tumorais de cinco moléculas de miRNA, sendo eles: miR-221, miR-222, miR-146b, miR-21, miR-181b. Os autores detectaram a superexpressão em amostras de CPT quando comparado com amostras não tumorais do miR-221, miR-222, miR-146b, miR-21 e miR-181b. Além disso, foi evidenciado o aumento de expressão significativo nas amostras de CPT quando comparado com o grupo de bócio nos níveis de miR-222. Estes resultados indicam o perfil do miR-222 na discriminação das amostras de CPT e amostras de bócio.

Sheikholeslami *et al.* (2020) tiveram como objetivo analisar a expressão e metilação do gene *NOLA* em 41 amostras de CPT quando comparadas com 38 tecidos de bócio. Os resultados do estudo, permitiram observar que a expressão do gene *NOLA* foi significativamente reduzido nas amostras de CPT quando comparado com as amostras de

bócio, sendo apenas inversamente correlacionada com a metilação em *NOL4*. Tais resultados indicam que a regulação negativa do gene *NOL4* está relacionado com a metilação mais próxima do promotor do gene, sendo associado com metástase linfonodal e associando este gene como um importante supressor tumoral.

Estudos em carcinomas de tireoide avaliaram a relação da alteração da expressão de genes específicos com a proliferação, viabilidade e invasão tumoral tanto em amostras de CPT e seu tecido normal adjacente. Estes estudos detectaram que a alteração na expressão de determinados genes influenciou diretamente a invasão tumoral ao tecido adjacente ao tumor (XUE *et al.*, 2020; SHAO *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2018; YIN *et al.*, 2017; FU *et al.*, 2017; CHOU *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2013).

Zhang *et al.* (2020), analisaram a associação do *elF5A2* e sua função biológica *in vitro* e *in vivo*. Os autores detectaram a superexpressão do gene *elF5A2* nas amostras de carcinoma papilífero de tireoide quando comparadas com amostras normais adjacentes, fatores correlacionadas com extensão extratireoidiana, metástase linfonodal e mutação *BRAF*. *In vitro*, a inibição do *elF5A2* evitou a invasão e migração celular, além de induzir a apoptose. O estudo indica o *elF5A* como marcador prognóstico e alvo terapêutico eficaz para o CPT.

Shao *et al.* (2020) realizaram as análises de expressão e função do lncRNA *AGAP2-ASI* em 110 amostras de carcinomas papilífero de tireoide e seu normal adjacente de forma pareada. Os resultados das análises evidenciou a expressão aumentada nos tecidos de CPT, sendo associada com a metástase linfonodal. A regulação negativa do *AGAP2-ASI* diminuiu a migração e invasão celular em células de CPT, além de reduzir a expressão da metaloproteinase-2 (MMP2), indicando que esses resultados podem servir como alvo prognóstico e terapêutico em CPT.

Xue *et al.* (2020) analisaram em trinta amostras de CPT e em tecidos normal adjacentes o sequenciamento utilizando RNA-Seq, no qual 3745 genes foram diferencialmente expressos e correlacionados com o desenvolvimento tumoral. Por meio da técnica de RT-qPCR foi realizada a validação dos genes *ADORA1*, *APOE* e *LPAR5* visto que dentre os genes analisados, apenas esses três apresentaram significância estatística na análise global. A análise de expressão gênica aumentada nas amostras de CPT, permitiu verificar que esses genes estão relacionados com a sobrevivência nesse tecido, além dos níveis de transcritos serem significativamente aumentados nas amostras de CPT quando comparado com as amostras adjacentes. O estudo permite concluir que a identificação de três genes relacionados com o desempenho regulatório importante nas amostras de CPT, além da relação com o desenvolvimento, metástase e infiltração nessa histologia.

Wang *et al.* (2013), analisaram a expressão do gene *MMP-13* em 208 amostras de CPT e 100 amostras de tecido normal adjacente pelas técnicas de RT-qPCR e IHC. Estes autores detectaram expressão aumentada deste gene tanto nos tecidos de CPT com metástase linfonodal. Nenhuma coloração foi observada nas amostras de tecido normal adjacente. Desta forma, os autores sugerem que o gene *MMP-13* está fortemente associado com invasão tumoral da tireoide como também com o desenvolvimento de metástases de linfonodos regionais em pacientes com CPT.

Chou *et al.* (2016) realizaram a análise de *microarray* de todo o genoma, análise computacional e ensaios do gene repórter *3' UTR* com o objetivo de identificar se a proteína quinase 1 associada ao receptor de interleucina-1 (*IRAK1*) é um gene alvo do microRNA miR-146b. Os níveis de expressão do miR-146b e da *IRAK1* foram obtidas pela técnica de RT-qPCR a partir da análise de 50 amostras de CPT e seus tecidos normais adjacentes. Este estudo evidenciou que o nível de mRNA do gene *IRAK1* foi regulado negativamente pelo miR-146b, promovendo características agressivas ao CPT, enquanto que a restauração da expressão de *IRAK1* reverteu esse efeito.

Yin *et al.* (2017) avaliaram alguns mecanismos moleculares envolvidos na invasão tumoral de tecidos normais adjacentes de CPT. Pela técnica de RT-qPCR estes autores detectaram a regulação negativa na linhagem celular de CPT, capaz de inibir significativamente a proliferação e invasão celular. O miR-195 exerce uma função supressora de tumor por meio da expressão diferenciada aumentada nos genes *CCND1* e *FGF2* em 38 amostras de CPT comparadas com os tecidos normais adjacentes, permitindo serem correlacionados com a inibição da proliferação, migração e invasão celular, sendo este micro-RNA sugerido neste estudo como novo marcador para CPT.

Fu *et al.* (2017) investigaram a expressão do *lncRNA-ATB* em 64 amostras de tecidos de CPT e seus tecidos normais adjacentes com objetivo de explorar os mecanismos de proliferação, migração e invasão tumoral. Estes autores observaram expressão aumentada do *lncRNA-ATB* nas linhagens celulares de CPT quando comparadas com a linhagens epiteliais foliculares normais. Os autores sugeriram que a expressão de *lncRNA-ATB* é capaz de diferenciar as amostras de CPTs em relação aos tecidos normais, bem como discriminar pacientes que apresentam CPT com metástase em linfonodos daqueles sem metástase em linfonodos. Esses estudos podem fornecer orientação para um tratamento clínico para o câncer de tireoide e melhorar o prognóstico desses pacientes.

Wang *et al.* (2018) investigaram a relação entre miR-211-5p e o gene *SOX11*, e os efeitos na proliferação, viabilidade e invasão em amostras de CPT e os tecidos normais

adjacentes. Estes autores detectaram que o miR-211-5p foi regulado positivamente e o gene *SOX11* apresentou diminuição de expressão nos tecidos tumorais da tireoide. Além disso, miR-211-5p suprimiu a expressão de *SOX11*. Ao inibir *SOX11*, o miR-211-5p suprimiu a proliferação e invasão das células de câncer de tireoide, sugerindo ser um potencial marcador de invasão celular em CPT.

A capacidade das células tumorais para invadir os tecidos adjacentes é governada por uma rede complexa de sinais moleculares, a maioria dos quais ainda não foram identificados (SANCISI *et al.*, 2012). Sancisi *et al.* (2012), investigaram a biologia dos tumores invasivos da tireoide, detectando que o inibidor da ligação do DNA 1 (Id1), controla a expressão da isoforma I e do fator de transcrição *Runx2* que desempenha um papel central na mediação da função pró-invasiva nas células tumorais da tireoide regulando a proliferação, a migração e a invasividade, ativando genes que estão envolvidos na degradação da matriz e invasão celular. Esse estudo demonstra a existência de um eixo molecular que controla a invasividade do tumor na tireoide, alterando a capacidade das células tumorais em interagir com o microambiente tumoral. Esses fatores podem revelar marcadores valiosos que podem permitir o diagnóstico precoce de tumores agressivos da tireoide.

Considerando a grande heterogeneidade genética dos tumores da tireoide ainda há muitas controvérsias sobre quais os marcadores moleculares são adequados ou como combiná-los para a determinação do melhor diagnóstico e/ou prognóstico dos pacientes. Assim, estudos adicionais são necessários para se buscar novos marcadores moleculares tanto para tornar o diagnóstico dessa patologia mais preciso e sensível quanto para se estimar a agressividade do tumor (HAUGEN *et al.*, 2016).

2.5 Via molecular *MAPK/KINASE*

A via de sinalização *Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK/KINASE)* é a principal via constantemente relacionada com o desenvolvimento do câncer de tireoide, em que mutações em genes específicos pertencentes a esta via tem sido associada a um diagnóstico diferencial entre os diversos tipos tumorais, ao risco aumentado de recorrência tumoral, metástase em linfonodo e câncer de tireoide em estágio avançado. Esta é uma via de transdução de sinal conservada que utiliza uma série de proteínas quinases para transmitir sinais da membrana celular para o núcleo, controlando uma grande variedade de processos celulares essenciais, incluindo proliferação, diferenciação, motilidade e apoptose. A hiperativação da via *MAPK/KINASE* está relacionada com várias patologias, incluindo doenças neurodegenerativas e o desenvolvimento de diabetes e câncer (KATZ; ARRIT;

YARDEN, 2007; ZABALLOS; SANTISTEBAN, 2017).

A ativação da sinalização *MAPK* é regulada por três proteínas quinases formando um sistema regulatório que estabelece uma via sequencial de ativação de proteínas quinase: a MAP quinase quinase quinase (*MAPKKK*), a MAP quinase quinase (*MAPKK*) e a MAP quinase. Os sinais em geral são transmitidos por meio de fosforilação sequencial e ativação de várias proteínas por meio de uma transdução de sinal. A ativação dessa via é desencadeada quando os estímulos externos, por exemplo, fatores de crescimento e mitógenos, se ligam aos receptores da membrana plasmática, principalmente receptores de tirosina quinase ativados, induzindo a dimerização do receptor e a auto fosforilação de resíduos que são reconhecidos por proteínas adaptadoras, tais como *SHC1* (*src* homology 2 contendo domínio proteína de transformação 1) e *GRB2* (proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento) (ZABALLOS; SANTISTEBAN, 2017). Por sua vez, as proteínas adaptadoras recrutam trifosfato de guanina (GTP) para ativar o fosfato de guanina e ativar *RAS* que por sua vez recruta proteínas, tais como *RAF* para a membrana plasmática o que induz a ativação sequencial de *MEK* e *ERK* (KURE; WADA; NAITO, 2019). Sabe-se que acima de duzentos efetores diferentes são ativados por *ERK* em diferentes compartimentos celulares, como citoplasma, mitocôndria, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e particularmente o núcleo onde estimulam um conjunto de fatores de transcrição que estão principalmente relacionados à proliferação celular, incluindo os fatores de transcrição *c-FOS*, *c-JUN*, *c-MYC* ou *ELK1* (YAEGER; CORCORAN, 2019).

Devido à importância biológica da via *MAPK/KINASE* na regulação de diversos processos de sinalização celular, as alterações genéticas em efetores desta via estão relacionadas diretamente com a oncogênese. Mutações em vários genes codificadores de proteínas da via *MAPK/KINASE* foram detectadas em mais da metade de todos os cânceres humanos (BUROTTO *et al.*, 2014). Em câncer de tireoide, alterações genéticas nos receptores tirosina quinase e em efetores da via *MAPK/KINASE* também são frequentes (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010), onde em aproximadamente 70% desses cânceres são causados por mutações em genes chaves da *MAPK/KINASE* (XING, 2013). Por exemplo, os genes *RET*, *RAS*, *BRAF*, *PI3K*, *PTEN* e *AKT*, que codificam as proteínas da cascata de sinalização apresentam-se frequentemente mutados ou com expressão alterada em CPT (JASIN; OZSARI; HABRA, 2014). O gene *NrCAM* apresentou expressão elevada em CPTs em relação aos tecidos não tumorais correspondentes demonstrando ser um potencial marcador diagnóstico nestas lesões (ZHANG *et al.*, 2016) para CPT. O oncogene *BRAF* possui mutações presentes em metade dos casos de CPT, ocasionando a ativação da via *MAPK/KINASE* (PENNA, 2017).

Gunda *et al.* (2017) avaliaram a aplicação terapêutica de inibidores *BRAF V600E* como tratamento importante no carcinoma de tireoide, uma vez que agentes pró-apoptóticos podem ser combinados com inibidores *MAPK*, demonstrando que a combinação é eficaz para regular a via *MAPK/KINASE* e reduzir efetivamente a capacidade de migração, invasão e proliferação celular.

Xing *et al.* (2013) estabeleceu o papel da via de sinalização *MAPK/KINASE* no processo de proliferação celular e apoptose. Yu *et al.* (2018) demonstraram que a ativação da via de sinalização *MAPK/KINASE* induzida pelo gene *CRLF1* promove a tumorigênese em amostras de CPT. Tang *et al.* (2020) estudou a via de sinalização *MAPK/KINASE* como um regulador do gene *GRB7* na modulação do crescimento celular e apoptose mitocondrial em amostras de carcinoma de tireoide quando comparado com as amostras normais adjacentes.

A ativação de *MAPK* também é consequência de mutações primárias que dão origem ao carcinoma da tireoide, tais como as mutações do ponto nos genes *BRAF* e *RAS* e rearranjos *RET/PTC*, sendo consideradas alterações frequentes e específicas nestas lesões (HSU *et al.*, 2019). Considerando o envolvimento direto da via de sinalização *MAPK/KINASE* no desenvolvimento das neoplasias da tireoide, novos estudos são necessários para uma melhor compreensão da associação de genes específicos pertencentes a *MAPK/KINASE* com os tumores tiroidianos, com possibilidade de descoberta de potenciais marcadores diagnósticos e/ou prognósticos nessas lesões.

Desta forma, a análise da expressão de genes e proteínas pertencentes a via *MAPK/KINASE* se faz necessário. O uso de amostras de tecidos tumorais e normais adjacentes em amostras de CPT e BMN, poderá fornecer uma medida importante do envolvimento desses genes na invasão tumoral e na determinação mais precisa da margem comprometida no momento da cirúrgica e conseqüentemente uma perspectiva mais precisa da evolução do paciente. Além disso, associados às técnicas moleculares e de análise proteica, o emprego de técnicas de espectroscopia óptica também vem se tornando cada vez mais viável para a determinação do diagnóstico do câncer e da agressividade tumoral, onde a associação com os resultados obtidos pela análise de expressão de genes da via *MAPK/KINASE* poderá trazer um enorme benefício para a conduta clínica aos pacientes acometidos com tumores de tireoide.

Silva *et al.* (2018), analisaram 84 genes pertencentes à via *MAPK/KINASE*, por meio da PCR quantitativa em tempo real, comparando os grupos: amostras benignas (bócio, adenoma e hiperplasia) e tumores malignos (CPT e CFT); tumores malignos (CPT e CFT) e amostras de bócio; amostras de CPT com amostras benignas (bócio, adenoma e hiperplasia); amostras de

CFT com amostras benignas (bócio, adenoma e hiperplasia). Os resultados da expressão diferencial, demonstrou que os genes: *SFN*, *HSPA5*, *MAP2K6*, *KSRI*, *MAPK10*, *MAPK8IP2* e *MEF2C* estão envolvidos com diferenciação dos tumores malignos. Os genes *CDKN1C*, *FOS*, *JUN*, *ETS1*, *MEF2C*, *CREB1*, *RBI*, *ETS2* e *GRB2* estão relacionados na diferenciação dos CFT. Os genes *SFN*, *HSPA5*, *MAPK8IP2*, *FOS*, *JUN*, *ETS1*, *MEF2C* e *GRB2* apresentaram expressão diferencial na comparação dos casos de CPT e CFT. Além disso, na análise comparativa das amostras de bócio com as outras neoplasias benignas nenhum dos genes apresentaram expressão diferencial. Os autores encontraram pela análise do *array*, genes diferencialmente expressos com potencial diagnóstico em tecidos malignos e benignos de tireoide.

Um estudo prévio do nosso grupo submetido para a revista **Journal of Biomedical Science** (Queiroz *et al.* 2021) diferenciou por meio da técnica de FTIR e análise molecular as amostras de CPT, CFT de tecidos normais e tecidos benignos (bócio, adenoma folicular e hiperplasia folicular). Os resultados da análise de PCA permitiram observar a separação dos espectros de tecidos benignos em relação aos tecidos tumorais. As análises de LDA usando LOOCV mostraram que os tecidos normais, benignos, CFT e CPT puderam ser classificados com 60, 70, 93 e 78% de eficiência, respectivamente. Adicionalmente, foi possível classificar as amostras de tecido benigno de bócio, adenoma folicular e hiperplasia folicular com 93, 83 e 100% de eficiência, respectivamente. Os resultados pela análise molecular permitiram observar o poder diagnóstico dos genes *FOS* e *JUN*, demonstrando diminuição de expressão, respectivamente em: tecidos malignos ($P=0,0032$ e $P= 0,0025$), tecidos de CPT ($P= 0,0375$ e $P= 0,0455$), tecidos de CFT ($P= 0,0048$ e $P= 0,0021$). Na comparação entre tecidos de CFT e CPT foi observada a diferença estatística significativa no gene *JUN*, demonstrando diminuição de expressão em tecidos de CFT ($P= 0,0028$). Este estudo sugeriu que a técnicas de FTIR e de análise molecular dos genes *FOS* e *JUN* possibilitaram a discriminação das amostras benignas dos tumores malignos de tireoide. No presente estudo, objetivamos buscar outros genes marcadores diagnósticos e confirmar o poder de sensibilidade da técnica de FT-IR por meio da análise de amostras de CPT, bócio e dos tecidos normais adjacentes a ambas as lesões.

2.6 Marcadores proteicos

A identificação da expressão proteica é realizada principalmente pela técnica de IHC é a mais utilizada para em muitos tumores, visto que as proteínas podem ser utilizadas como alvos

de marcadores celulares (SURACE *et al.*, 2019). Hoje na rotina clínica, diversos marcadores imunohistoquímicos podem ser utilizados para identificar moléculas-alvo para tratamentos oncológicos individualizados, beneficiando os pacientes, como os receptores de estrogênio e progesterona e oncoproteínas como, por exemplo, o *c-erbB-2/HER2* no câncer de mama, o *CD20* nos linfomas, o *EGFR* e *VEGFR* em diversos tipos de tumores, entre outros (DAI, 2016).

Em câncer de tireoide, estudos vêm descobrindo algumas proteínas específicas que estão diretamente envolvidas no desenvolvimento do câncer de tireoide e que possuem grande potencial de serem utilizadas como marcadores diagnósticos ou prognósticos na prática clínica (HUK *et al.*, 2018; ZHAN *et al.*, 2018; BIAN, 2020; RAMÍREZ-MOYA *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020).

Hu *et al.* (2015), analisou pela análise de imunohistoquímica (IHC) a expressão das proteínas mucina 1 (*MUC 1*) e c-myc em 123 amostras de pacientes com CPT, bócio e tecidos normais adjacentes. Nesse estudo, pode-se observar diferenças na expressão de *MUC1* e c-myc em CPT quando comparado com as amostras de carcinoma e tecidos benignos, e assim concluíram que *MUC 1* e c-myc são marcadores importantes para a diferenciação de CPT em relação aos tumores benignos. Além disso, pela observação da expressão diferencial da proteína c-myc nos carcinomas, tumores benignos e tecidos normais adjacentes, estes autores demonstraram que estas proteínas são marcadores importantes de invasão local.

Lin *et al.* (2015), ao analisarem a expressão do antígeno *TAK1* em tumores de tireoide, incluindo papilíferos (n=6), foliculares (n=21), medulares (n=15) e indiferenciados (n=4) e tecidos normais adjacentes por IHC, detectaram que a expressão de *TAK1* foi de 78,2% no tecido tumoral, sendo significativamente maior que nos tecidos normais adjacentes que foi de 14,9%. Estes resultados, sugerem que *TAK1* pode ser um fator importante envolvido na patogênese do câncer de tireoide, e que a inibição da regulação desta proteína pode melhorar o prognóstico de pacientes, reduzindo a proliferação e invasão tecidual observados nos resultados com cultura de célula.

Do *et al.* (2017) detectaram que a expressão da proteína esfingosina quinase 1 está relacionada com o desenvolvimento e progressão do CPT e um pior prognóstico destes tumores, além disso, estes autores sugeriram que esta proteína pode ser útil como biomarcador preditivo para a metástase dos linfonodos.

Sakr *et al.* (2017) demonstraram a relação da agressividade tumoral com o aumento de expressão de proteínas envolvidas com a atividade proliferativa de suas células c-myc, antígenos associados ao ciclo celular, Ki-67 e antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA). Além desses, outros estudos utilizando a técnica de IHC, buscaram avaliar outros

marcadores proteicos associados à agressividade do tumor, progressão e invasão tumoral com o objetivo de identificar o seu envolvimento com o desenvolvimento do carcinoma de tireoide (HE *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2017; BU *et al.*, 2018; FUZIWARA *et al.*, 2019).

2.7 Espectroscopia infravermelho por transformada de *Fourier* (FTIR)

A análise bioquímica por meio da aplicação de métodos espectroscópicos ópticos no diagnóstico do câncer tem sido uma área de interesse nas últimas décadas (ZANCLA *et al.*, 2020). O uso da espectroscopia óptica, vem se tornando uma técnica viável para diagnóstico precoce do câncer por possuir vantagens em relação a técnica histopatológica tradicional, com resultados em tempo real e com a possibilidade da obtenção de diagnósticos não invasivos ou minimamente invasivos (SILVA *et al.*, 2020a). Na espectroscopia de infravermelho (IR) um tecido absorve um comprimento de onda da luz e emite em um comprimento de onda mais longo. A luz dispersa tem ligeiras mudanças nos comprimentos de onda devido a interações entre a luz incidente e grupos bioquímicos, como bandas de amida, grupos metil e estruturas anelares em estruturas celulares, como ácidos nucleicos e proteínas (WALD *et al.*, 2016).

A espectroscopia de infravermelho por transformada de *Fourier* (FTIR) é uma tecnologia não invasiva que pode detectar mudanças de grupo funcional em moléculas das células e tecidos. Tais mudanças podem ser visualizadas por meio de um espectro geralmente retirado da faixa do infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}) (LEWIS *et al.*, 2010). A espectroscopia por FTIR possui as vantagens da realização da análise tecidual de forma indolor, em tempo real e possui especificidade na determinação exata das mudanças bioquímicas que indicam futuras alterações morfológicas quando as mesmas ainda não se manifestaram micro e macroscopicamente. Por exemplo, estudos em cânceres de cólon (LI *et al.*, 2005), próstata (SIQUEIRA; LIMA, 2016), mama (ELMI *et al.*, 2017), cervical (RYMSZA *et al.*, 2018) e gástrico (LIU *et al.*, 2017) mostraram que a técnica FTIR é uma ferramenta promissora para diagnóstico e diferenciação das características bioquímicas dos tecidos neoplásicos e normais.

Alguns poucos estudos utilizando a espectroscopia FTIR em câncer de tireoide demonstraram a efetividade desta técnica em diferenciar faixas espectrais referentes aos componentes bioquímicos presentes nos tecidos malignos e tecidos benignos da tireoide (DAS *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2011).

Das *et al.* (2008) observou em seu estudo a espectroscopia FT-IR em tecidos biológicos, por ser uma proposta desafiadora devido à forte absorção de luz infravermelho em

tecidos com água. Os pesquisadores analisaram as diferenças espectrais de FTIR em tecidos de paratireoide (n=7), hiperplasia de tireoide (n=4), adenomas de tireoide (n=3) e linfonodos de tireoide (n=3). Na comparação entre os grupos pode-se observar que os espectros de lipídios apresentaram maior intensidade em amostras de linfonodo e maiores picos de ácidos nucleicos foram observados em amostras de adenoma, demonstrando o aumento no crescimento celular, este estudo demonstrou a viabilidade da técnica FTIR no diagnóstico intra operatório durante a exploração cirúrgica, com potencial de aplicação no diagnóstico de biópsia em linfonodo sentinela em argem tumoral.

Zhang *et al.* (2011) utilizaram a técnica FTIR como ferramenta poderosa para distinguir tecido normal e câncer, encontrando diferenças significativas em amostras de CPT quando comparados com amostras de bócio, combinando a espectroscopia FTIR e o método de análise discriminante para discriminação rápida em nódulos benignos e malignos durante operação cirúrgica.

Depciuch *et al.* (2018) distinguiram os tecidos tireoidianos normais de tecidos de carcinoma folicular de tireoide (CFT) por meio da espectroscopia FTIR com o objetivo de sugerir a utilização desse método como ferramenta diagnóstica. O estudo utilizou 15 amostras de tecido tireoidianos em *microarrays* e seus resultados indicaram que o tecido de CFT quando comparados com o tecido não tumoral, apresentou menor intensidade de proteínas, gorduras e açúcares indicando uma mudança estrutural nesses compostos. Além disso, as análises por PCA puderam demonstrar a diferença espectral em os dois grupos analisados, podendo concluir que a técnica FTIR permite distinguir os tecidos normais de neoplásicos.

Zancla *et al.* (2020) por meio da técnica de espectroscopia FTIR e análise multivariada, analisaram em amostras de CPT a presença de corpos pseudomatosos, estruturas calcificadas consideradas marcador diagnóstico confiável para essa histologia e correlacionada com variantes mais agressivas e metástase linfonodal. Histologicamente os corpos pseudomatosos são difíceis de serem reconhecidos pela subjetividade clínica, nesse cenário que o estudo teve como objetivo contribuir com a obtenção de um diagnóstico mais preciso. Os resultados obtidos pela análise espectral, foram comparados com tecidos corados por hematoxilina-eosina fornecendo validação histológica, a faixa espectral 850-1100 cm^{-1} foi a mais confiável na detecção desses corpos pseudomatosos, com as características de carboapatita nessa região. Pode-se concluir a combinação de espectroscopia FTIR e análises multivariadas como técnica a ser aplicada em rotina clínica para favorecer um diagnóstico precoce de amostras de CPT.

A espectroscopia FTIR é uma ferramenta promissora para complementar a análise patológica dos diferentes tumores, incluindo tireoide, que é muito subjetiva. Para maximizar o

poder desta técnica, tanto os elementos espaciais quanto os espectrais devem ser combinados ao conhecimento da estrutura química do tecido para analisar as diferentes características da amostra, no sentido de poder diferenciar a patologia benigna de uma lesão maligna da tireoide. Com este tipo de abordagem mais possibilidades diagnósticas, como também e prognósticas poderão ser realizadas (SILVA *et al.*, 2020a).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar por meio das análises de expressão gênica e proteica marcadores moleculares diagnósticos pertencentes à via *MAPK/KINASE* em amostras de CPT e bócio nodular, quando comparados com seus tecidos normais adjacentes, além de buscar o diagnóstico dessas lesões por meio da análise dos espectros bioquímicos pela técnica de espectroscopia por FTIR.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar pela técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) a expressão de genes específicos pertencentes à via *MAP/KINASE*: *CCNA1*, *SFN*, *JUN*, *KSRI*, *MAPK2K6*, *HSPA5*, *MAPK81P2*, *CDKNIC* e *FOS* em amostras de CPT e amostras normais de tecido tireoidiano não tumoral para analisar o potencial diagnóstico desses genes;
- Analisar pela técnica de RT-qPCR a expressão de genes específicos pertencentes à via *MAP/KINASE*: *CCNA1*, *SFN*, *JUN*, *KSRI*, *MAPK2K6*, *HSPA5*, *MAPK81P2*, *CDKNIC* e *FOS*, em amostras de bócio e amostras normais de tecido tireoidiano não tumoral para analisar o potencial diagnóstico desses genes;
- Analisar pela técnica de RT-qPCR a expressão de genes específicos pertencentes à via *MAP/KINASE*: *CCNA1*, *SFN*, *JUN*, *KSRI*, *MAPK2K6*, *HSPA5*, *MAPK81P2*, *CDKNIC* e *FOS*, em amostras de CPT e seus respectivos tecidos normais adjacentes para confirmar o potencial diagnóstico desses genes;
- Analisar pela RT-qPCR a expressão de genes específicos pertencentes à via *MAP/KINASE*: *CCNA1*, *SFN*, *JUN*, *KSRI*, *MAPK2K6*, *HSPA5*, *MAPK81P2*, *CDKNIC* e *FOS* em amostras de bócio e seus respectivos tecidos normais adjacentes para confirmar o potencial diagnóstico desses genes;
- Analisar pela técnica de RT-qPCR a expressão de genes específicos pertencentes à via *MAP/KINASE*: *CCNA1*, *SFN*, *JUN*, *KSRI*, *MAPK2K6*, *HSPA5*, *MAPK81P2*, *CDKNIC* e *FOS*, em amostras de CPT e bócio para confirmar o potencial diagnóstico desses genes;
- Analisar pela técnica de IHC a expressão da proteína Ciclina A1, codificada pelo gene

CCNAI, em amostras de bécio, CPT e tecidos normais adjacentes ao CPT para avaliar o seu papel no diagnóstico dessas lesões;

- Comparar os dados de expressão do gene *CCNAI* obtidos pela RT-qPCR com

os dados da expressão da proteína por ele codificada Ciclina A1;

- Caracterizar bioquimicamente pela técnica de espectroscopia FT-IR as amostras de CPT, bécio e tecidos normais adjacentes ao bécio por meio da análise dos espectros vibracionais da amostra para a determinação do diagnóstico dessas lesões.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo apresenta três abordagens para identificar marcadores moleculares diagnósticos e de invasão tumoral: análise molecular, análise de IHC e de FTIR. A análise molecular identifica alterações específicas, tais como a expressão de um gene em particular, contudo a técnica exige vários processamentos das amostras e consome um maior tempo comparado a outras técnicas. A análise proteica identifica alterações na expressão de uma proteína em particular, entretanto, também consome um grande tempo e é uma análise subjetiva, não apresentando alta sensibilidade quando comparada com a análise molecular. E espectroscopia por FT-IR é um método rápido e requer preparação mínima da amostra e os resultados são baseados em mudanças na composição das moléculas da amostra, contudo os resultados não são específicos como os resultados da análise molecular.

4.1 Obtenção das amostras

Este estudo é um desdobramento do projeto auxílio pesquisa realizado em nosso laboratório “Caracterização molecular e bioquímica de lesões da tireoide para diagnóstico clínico”, processo Fapesp nº 2013/14464-9 (Parecer 1.806.781/CEP/2016), aprovado pelo Biobanco e Núcleo de Pesquisa do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo - ICESP (Anexo 1) e pelo CEP UNIVAP (Parecer 2.741.302/CEP/2018) (Anexo 2) desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Câncer.

Neste estudo foram utilizadas um total de 70 amostras de tecidos a fresco de tireoide, sendo 32 casos classificados pela análise citopatologia como CPT, 15 casos de amostras normal adjacentes ao CPT, 13 casos diagnosticados citopatologicamente como bócio e 10 amostras normais adjacente ao bócio, provenientes do Biobanco do ICESP (Tabela 1).

Tabela 1. Amostra de CPT, b6cio e seus respectivos normais adjacentes nas an6lises realizadas. CPT:carcinoma papilifero de tireoide. B: b6cio. NAdj: normal adjacente. N: normal de tecido tireoidiano n6o tumoral.(continua76o)

Amostra	Tipo histol6gico	ATR-FTIR	IHC	RT-qPCR
5	CPT	X		X
5N	NAdj			X
10	CPT	X		
11	CPT			X
11N	NAdj			X
13	CPT	X		
16	CPT			X
16N	Nadj			X
17	CPT VF			X
17N	Nadj			X
18	CPT VF			X
18N	Nadj			X
26	CPT	X		
47	CPT			X
47N	Nadj			X
51	CPT			X
51N	Nadj			X
354	CPT		X	
355	CPT	X		
365	CPT			
603	CPT		X	
649	CPT	X	X	
712	CPT	X		
723	CPT		X	
726	CPT	X		
740	CPT			
1409	CPT		X	X
1409N	Nadj			X
1859	CPT			X
1859N	Nadj			X
1874	CPT			X
1874N	Nadj			X
1878	CPT		X	X
1878N	Nadj			X
1882	CPT		X	X
1882N	Nadj			X
1894	CPT		X	
1897	CPT		X	
2948	CPT		X	
3371	CPT		X	X
3371N	Nadj			X
3379	CPT		X	
3380	CPT		X	X
3380N	Nadj			X
3386	CPT		X	X
3386N	Nadj			X
4221	CPT		X	
3	B	X		X
3N	Nadj	X		X
6	B	X		X
6N	Nadj			X
7	B	X		X

Tabela 1: Amostra de CPT, b6cio e seus respectivos normais adjacentes nas an6lises realizadas. CPT:carcinoma papilifero de tireoide. B: b6cio. NAdj: normal adjacente. N: normal de tecido tireoidiano n6o tumoral (conclus6o)

7N	NAdj	X	X
9	B	X	X
9N	Nadj	X	X
14	B	X	X
14N	Nadj	X	X
30	B	X	
41	B		X
41N	Nadj		X
42	B		X
42N	Nadj		X
46	B	X	X
46N	Nadj	X	X
1377	B		X
1864	B		X
1864N	Nadj		X
1883	B		X
1883N	Nadj		X
3377	B		X
35N	N		X
38N	N		X
6N	N		X
14N	N		X

Fonte: O autor.

Na an6lise de express6o g6nica por RT-qPCR foram utilizadas 25 amostras distribu6das nos seguintes grupos: tecido de b6cio (n= 10), tecido normal adjacente ao b6cio (n= 10), amostras de CPT (n=15), tecido normal adjacente ao CPT (n= 15). Para a an6lise de IHC foram utilizadas amostras distribu6das nos seguintes grupos: tecido de b6cio (n= 4) e CPT (n=15). Na an6lise espectral por FTIR foram utilizadas amostras distribu6das nos seguintes grupos: tecido normal adjacente ao b6cio (n= 5), b6cio (n=7) e CPT (n=8). A coleta das amostras, para sua armazenagem em Biobanco, foi realizada por procedimento cir6rgico (tireoidectomia total ou parcial) com bi6psias excepcionais, no momento do diagn6stico conhecido por congel6o. Todas as amostras pertencentes ao estudo obtiveram um laudo histopatol6gico, o qual segue os crit6rios de diagn6stico para c6ncer de tireoide da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP), e cont6m no m6nimo 70% de c6lulas tumorais no fragmento para a inclus6o das mesmas no estudo.

As amostras foram transferidas do Biobanco para o freezer -80°C do Laborat6rio Central An6litica – IP&D/UNIVAP e ficaram armazenadas em tubos criog6nicos *Nalgene*® para as an6lises de ATR-FTIR e RT-qPCR ou acondicionadas em l6minas mantidas a temperatura ambiente para a an6lise de IHC, foram realizados cortes histol6gicos em dezenove amostras selecionadas para a an6lise de imunohistoqu6mica e armazenadas em l6minas mantidas a temperatura ambiente.

4.2 Análise de Expressão gênica

4.2.1 Genes selecionados

Para análise de expressão gênica, nove genes foram escolhidos a partir dos resultados obtidos de um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa (SILVA et al., 2018), onde foi avaliada a expressão gênica de 84 genes representativos da via *MAPK/KINASE* por meio da utilização da plataforma *MAP Kinase Signaling Pathway (PAHS-061ZA-24)* (SA Biosciences, Qiagen), que classificou os tecidos benignos e malignos de tireoide (Apêndice 1).

Os genes diferencialmente expressos detectados por Silva et al. (2018) e que foram selecionados para a análise foram: *CCNA1* e *SFN*, que apresentaram pela técnica de PCR *array* aumento de expressão no CPT em relação amostras benignas (bócio, adenoma e hiperplasia) e diminuição no CPT quando comparado com amostras de CFT; os genes *JUN*, *KSRI*, *MAPK2K6*, *HSPA5* e *MAPK8IP2* que apresentaram diminuição de expressão no CPT quando comparado com as amostras benignas e CFT no caso do gene *JUN*; os genes *CDKNIC* e *FOS* apresentaram diminuição de expressão nas amostras de CFT em relação ao CPT; os genes: *CCNA1* e *SFN* que apresentaram aumento de expressão e os genes *CDKNIC*, *HSPA5*, *KSRI*, *MAP2K6* e *MAPK8IP2* que apresentaram diminuição de expressão nas amostras de CPT comparadas com bócio e os genes: *CDKNIC*, *CREB1*, *FOS*, *JUN*, *KSRI*, *MAP2K6*, *MAPK8IP2* e *HSPA5* que apresentaram diminuição de expressão nos carcinomas malignos (CPT e CFT) em relação ao bócio.

O gene endógeno ou gene *housekeeper*, gene que apresenta expressão constitutiva em tecidos humanos, selecionado foi o *mitochondrial ribosomal protein 19 (MRLP19)*. Portanto, a expressão dos genes alvos foi normalizada com a expressão do gene endógeno *MRLP19*. Este gene tem por função a codificação de proteínas mitocondriais ribossomais, sendo descrito como um gene endógeno mais estável e confiável para análise de expressão gênica por RT-qPCR (McNeil et al., 2007).

4.2.2 Extração, purificação e quantificação do RNA

A extração do RNA foi realizada utilizando três protocolos: *AllPrep DNA RNA Mini Kit* (Qiagen), *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) e *Trizol® Reagent* (Life Technologies), seguindo o protocolo *RNeasy® MinElute™ Cleanup Kit* (Qiagen). Após a purificação do RNA, foi realizada a digestão do DNA utilizando o kit *DNase I Amplification Grade* (1U/μL) para as amostras extraídas pelo método de *Trizol® Reagent* (Life Technologies) ou o kit *RNase-Free DNase Set* (Qiagen) para as amostras extraídas pelo kit *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen). As

caracterizações quantitativas das amostras de RNA extraídas foram realizadas pelo método de espectroscopia de absorção no ultravioleta no equipamento *NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade)* que faz a análise das razões 280/260 e 260/230, onde a leitura de absorbância do RNA a 260 nm avaliando a pureza das amostras em relação à contaminação com proteínas na razão 260/280, que deve estar em torno de 1.8 a 2.0, e em relação à contaminação com reagentes utilizados no processo de extração na razão 260/230, que deve estar entre 1.7 e 2.2.

Para a avaliação da integridade, foi utilizado aproximadamente 500ng de RNA no sistema de eletroforese capilar no equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies Inc.)*. Foi realizado também, a eletroforese em gel de agarose a 1,5% em Tris-Borato-EDTA 1X (TBE) corado com brometo de etídeo, reagente no qual se intercala entre as bases nitrogenadas do RNA permitindo a visualização das bandas cromossômicas 18S e 28S, de acordo com o marcador de peso molecular de 100pb (*Invitrogen*).

4.2.3 Síntese de cDNA

Após a digestão do DNA (*RNase-Free DNase Set, Qiagen*) foi realizada a síntese do cDNA no termociclador (*Biocycler, MJ96G*) por meio do sistema de pré-amplificação *Superscript™ IV*, que inclui *SuperScript® IV / RNaseOUT™ Enzyme Mix, 2X First- Strand Reaction Mix*, e *Buffer* de anelamento (*Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA*). O protocolo consistiu em adicionar 0,5 µL de oligo (*dT*)₂₀, 0,5 µL *random primers*, e 1 µL de *Buffer* de anelamento em 1 µg de RNA. O volume da reação foi completado com água ultrapura livre de RNases para um volume final de 12 µL. Em cada reação foi adicionado 1 µL de *Ribonuclease Inhibitor* que reduziu a atividade da RNase proporcionando maior estabilidade térmica, junto com 4 µL do *5X SSIV Buffer*, 1 µL de 10 mM DTT, e 1 µL da enzima *SuperScript™ IV Reverse Transcriptase*.

4.2.4 Análise Quantitativa pela RT-qPCR

Os iniciadores para amplificação dos genes *CCNA1, SFN, JUN, KSRI, MAPK2K6, HSPA5, CDKN1C, MAPK8IP2, FOS* e do gene endógeno foram desenhados no *software Primer Express* (versão 3.0) (*PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) (Tabela 2).

A detecção da expressão gênica por RT-qPCR foi realizada por meio do equipamento *ABI PRISM 7500 Sequence Detection Systems (Life Technologies, USA)*. Os dados obtidos

serão traduzidos pelo *software* específico (*Sequence Detection System software, versão 2.1, PE Applied Biosystems*) e plotados em um gráfico (intensidade de fluorescência versus o número de ciclos). A concentração-uso dos iniciadores será de 10 μ M. A detecção de fluorescência o corante *Platinum® SYBR® Green RT-qPCRSuper Mix UDG (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA)* por conter todos os componentes necessários para realização do mesmo.

As condições de reações para RT-qPCR foram estabelecidas para cada gene em particular. Por último, uma curva de dissociação foi elaborada para comprovar a especificidade da amplificação e foram utilizadas as seguintes condições para amplificação: desnaturação inicial 95°C 2 minutos, seguido por 40 ciclos com três etapas: desnaturação 95°C por 15 segundos, anelamento 50°C por 30 segundos, extensão 60°C por 1 minuto e resfriamento 4°C.

A análise da curva padrão foi realizada pelos valores de *slope*, calculado pela fórmula: $E=10^{-1/\text{slope}-1}$ e fornecidos pelo *software* específico (*Sequence Detection System software, versão 2.1, PE Applied Biosystems*), os quais os valores de *slope* estiveram próximos ao valor de -3.3. A análise de curva padrão permitiu identificar a melhor diluição a ser utilizada, iniciando com a amostra pura (1000), seguido das diluições 200, 40, 8 e 1,6ng/ μ l. A análise da curva foi realizada em dois ciclos de amplificações (*amplification plot*) e pela disposição em duplicata (*standard curve*), que devem estar o mais próximo da linha. No gráfico, *standard curve* foi comparado à quantidade de cDNA utilizada *versus* ciclo de amplificação e no *amplification plot*, o número de ciclos *versus* intensidade da fluorescência. A curva de dissociação foi obtida para cada gene, onde é possível averiguar se houve a formação de *primer dimers*, amplificação inespecífica e a presença de quaisquer contaminantes na análise. Os *thresholds* definidos foram os mesmos em todas as análises de PCR *arrays*.

Tabela 2. Nove genes alvo e gene endógeno avaliados por RT-qPCR.

Genes	Função	Tamanho do amplicon	Sequência dos iniciadores
<i>CCNA1</i>	Controle do ciclo celular.	62 pb	5'-ACAGCTGCTCGGTCAGAGA-3' 5'-TGTGCCGGTGTCTACTTCAT-3'
<i>CDKN1C</i>	Proliferação celular.	65 pb	5'-GGCCTCTGATCTCCGATTTTC-3' 5'-ATCGCCCGACGACTTCT-3'
<i>FOS</i>	Transdução de sinal, proliferação, diferenciação celular.	60 pb	5'-AGACCGAGATTGCCAACCT-3' 5'-GAGCTGCCAGGATGAACTCT-3'
<i>HSPA5</i>	Tradução celular.	57 pb	5'-AACCATCCCGTGGCATAA-3' 5'-CCTGGACAGCAGCACCATA-3'
<i>JUN</i>	Fator de transcrição.	61 pb	5'-AGCGGACCTTATGGCTACAG-3' 5'-CCAGGTTTCAGGGTCATGCT-3'
<i>KSR1</i>	Regulação celular.	55 pb	5'-AGCCGAACCCCATTTTG-3' 5'-AGGGTGCTCCTTCTTTGTCA-3'
<i>MAP2K6</i>	Transdução, transcrição e apoptose celular.	59 pb	5'-CACCTTTTATGGCGCACTGT-3' 5'-CCATGAGCTCCATGCAGATC-3'
<i>MAPK8IP2</i>	Regulação celular.	63 pb	5'-CAGCCCTGACCTCACTTTCT-3' 5'-GACCGAGATGTGCTGTTGAC-3'
<i>SFN</i>	Regulação, proliferação celular.	72 pb	5'-CATGGAGAGAGCCAGTCTGAT-3' 5'-GCTGCCATGTCTCATAGC-3'
<i>MRPL19</i>	Síntese de proteínas mitocondriais.	70 pb	5'-CAGAGATCAGGAAGAGGACTTGGA-3' 5'-TCTCGACACCTTGTCCTTCGA-3'

Fonte: O autor.

4.2.5 Análise estatística

A análise da expressão relativa para cada gene alvo e a consequente obtenção dos QR (quantificação relativa ou *fold-change*) foi realizada pelo método Delta DeltaCt e curva-padrão (PFAFFL, 2001; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os valores médios dos Cts obtidos para os genes alvos foram comparados com a média dos Cts do gene endógeno e posteriormente normalizados pela média das amostras normais para a obtenção dos valores de QR.

O QR ou *fold-change* ($2^{(-\Delta\Delta Ct)}$), que consiste no valor da expressão do gene normalizado ($2^{(-\Delta Ct)}$) nas amostras do grupo experimental será dividido pela expressão do gene normalizado ($2^{(-\Delta Ct)}$) na amostra do grupo controle (não tumoral), foi calculado para cada gene. Este cálculo é dado pela fórmula: $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Os valores de *fold-change* maior que dois indica um aumento de expressão para o gene alvo, e o *fold-change*

menor que 0.5 demonstra a diminuição de expressão gênica, com grau de significância de p -value $< 0,05$ (teste t de *Mann Whitney*).

Para os dados de RT-qPCR, as análises estatísticas foram realizadas no *software GraphPad In Statversion 5.00* (*GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com*) pelo Teste *Mann Whitney* e Teste T. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos com $p \leq 0.05$.

4.3 Análise de Imunohistoquímica

4.3.1 Amostras e Processamento histológico

Após a obtenção das amostras obtidas em conduta cirúrgica, os fragmentos de tireoide foram imersos em formol tamponado a 10% por 12h. Posteriormente, foram desparafinizados em xilol, desidratados por meio de sequências alcoólicas crescentes e incluídos em *paraplast* (*Paraplast; Oxford, St. Louis, MO, USA*). Os blocos histológicos foram seccionados em um micrótomo semi-automático (*RM2245 – Leica Microsystems*) para obtenção dos cortes histológicos com 4 μ m de espessura, os quais foram colocados em lâminas previamente sinalizadas (*Star Frost Adhäsiv-Silan, Knittel Glass, Alemanha*) mantidas a temperatura ambiente para as reações de IHC.

4.3.2 Anticorpos

Foi possível a identificação proteica atuante no ciclo celular meiótico da linha germinal e no controle do ciclo celular mitótico em células somáticas nas transições G1 /S (início) e G2 / M (mitose) (*ABCAM*). Para essa identificação foi realizado a marcação por meio do anticorpo primário *Anti-Cyclin A1 antibody ab118897 (ABCAM) – Rabbit polyclonal to Cyclin A1* e o anticorpo secundário *Ab80436 (ABCAM) EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Kit* nos tecidos de neoplasias benignas (bócio) e carcinoma tireoidiano.

4.3.3 Procedimento

Após a desparafinização e hidratação dos cortes histológicos, o próximo passo realizado foi a recuperação antigênica em tampão citrato 10mM pH 6.0 a 96°C, por 20 min. Após bloqueio da atividade da peroxidase endógena, e três lavagens em *PBS+0.05%Tween20*, os cortes foram incubados *overnight* em câmara úmida a 4°C com o anticorpo primário

descrito acima. Como anticorpo secundário, foi usado o *EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC (ABCAM)* de acordo com as instruções do fabricante. O *EXPOSE HRP/DAB* é um sistema de visualização livre de biotina, indicado para amostras de carcinoma de tireoide, as quais têm grande quantidade de biotina endógena, o que causaria intensa reação de fundo (*background*) quando comparado aos sistemas de visualização que empregam biotina avidina na sua constituição; este kit já possui o cromógeno DAB que foi utilizado para revelação das reações. Os cortes foram contra corados com hematoxilina de *Harris* por 35s, desidratados em álcool, diafanizados em xilol, montados com *Permount* e secos por 60 min a 58-60°C. A especificidade da reação antígeno-anticorpo foi testada por meio da substituição dos anticorpos primários pelo tampão *PBS + 0.05% Tween20* (controle negativo). Como controle positivo da reação imunohistoquímica foram utilizadas as amostras de testículo humano pela certezada Ciclina A1 nesse tecido.

4.3.4 Análise quantitativa de imagem

A imunexpressão da proteína *Cyclin A1* foi avaliada qualitativamente ao microscópio luz (*Olympus BX-41*). Inicialmente foram avaliados de três a cinco cortes, a fim de calibrar a intensidade de marcação e em seguida, dois examinadores observaram as lâminas separadamente. Foram analisados dez campos em aumento real de 10x e realizada a análise da intensidade da imunomarcação/imunexpressão da Ciclina A1. Os parâmetros dos *scores* utilizados foram: ausência de imunexpressão da proteína – *score 0* (ausente); células com 100% de imunexpressão fraca – *score 1* (fraco); células com 75% de imunomarcação fraca e 25% com marcação moderada – *score 2* (levemente moderado); células com 75% ou mais de imunexpressão moderada – *score 3* (moderado); e células com 100% de imunomarcação forte – *score 4* (forte) (Figura 9). As imagens microscópicas de imunomarcação da Ciclina A1 foram capturadas por meio da câmera digital (*Leica CFC425*) acoplada a um microscópio óptico (*Leica DM2500*) com ampliação total de 100x.

Para avaliação da significância estatística entre os grupos de tecidos analisados por IHC foi realizado o teste de Fisher ($P \leq 0,05$). O Teste de *Kappa* (*k*) foi utilizado para a normalidade de concordância na técnica de IHC.

4.4 Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier - FTIR

4.4.1 Amostras

As amostras obtidas foram armazenadas a -80°C , descongeladas em temperatura ambiente e cortados na espessura de $10\ \mu\text{m}$ no criostato (*Leica® Modelo CM 1100*), entre -15°C a -20°C e aguardadas até secarem. Após o processo, as amostras de tecidos seccionados foram mantidas em uma sala com baixa umidade no Laboratório de Biologia Molecular do Câncer, por 100 minutos (1h 40 min) para retirar o excesso de água presente na amostra após o corte.

Os cortes dos tecidos foram seccionados e colocados sobre janelas de CaF_2 (fluoreto de cálcio), para não ocorrer presença de sinais nos espectros que não fossem das amostras em questão. Para cada amostra, foram obtidos três espectros, totalizando 60 espectros.

4.4.2 Obtenção dos espectros

O equipamento para obtenção dos espectros foi o espectrofotômetro FT-IR (*Spotlight 400 FT-IR Imaging System, Perkin Elmer*) acoplado a unidade de ATR (superfície de diamante) (*Attenuated Total Reflection*). As amostras foram posicionadas na face do cristal de diamante da unidade ATR e a ponta do grampo micrométrico foi comprimida na superfície para permitir o contato adequado para obter um espectro característico. O *background* de 64 *scans* foi realizado antes de cada análise. Então, três espectros de absorbância foram adquiridos por 32 varreduras na faixa do infravermelho médio (comprimento de onda $1000\text{-}4000\ \text{cm}^{-1}$) com uma resolução de $8\ \text{cm}^{-1}$ por amostra. Para cada amostra foram obtidos três espectros, totalizando 60 espectros. Para a realização do cálculo de espectro médio, os espectros de cada grupo foram corrigidos utilizando um polinômio de ordem oito. A normalização utilizada para o mesmo foi a vetorial, sendo os espectros filtrados para remoção de ruídos, realizado utilizando o software *OPUS 8* (*OPUS 8.0, Bruker Optik GmbH, Alemanha*). A avaliação de espectros médios, variações de intensidade e deslocamento dos picos entre os grupos, foi realizado utilizando o software *Origin* (*Origin 7.5 SR6, Origin Lab Corp, EUA*). A Análise de Componentes Principais (PCA – *Principal Components Analysis*) foi realizada utilizando o software *MATLAB®* (*MATLAB, MathWorks Inc., EUA*), aplicado para a classificação dos espectros coletados no infravermelho. Os resultados da PCA foram apresentados por meio do gráfico de *loading plot*, que confronta os PCs (componentes principais) ao deslocamento FT-IR favorecendo a identificação das principais bandas que possibilitaram a classificação entre os espectros das amostras. Os 10 primeiros PCs

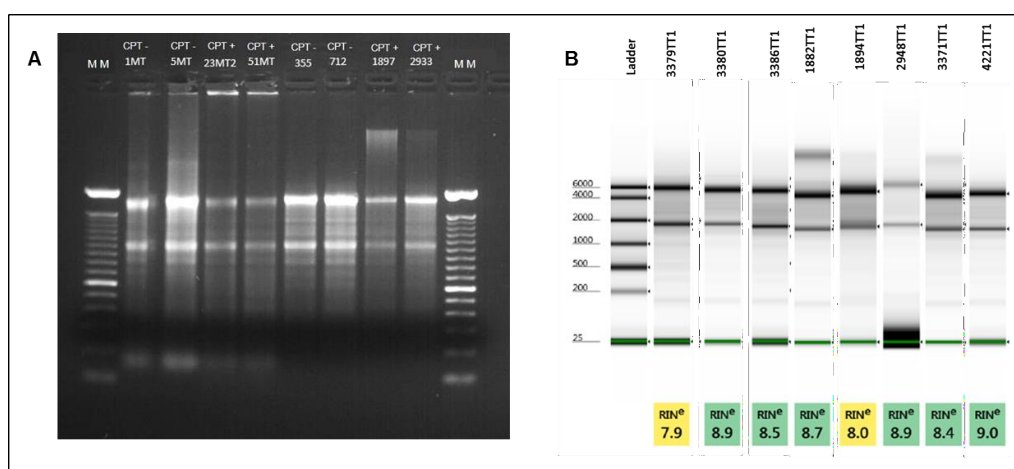
(Componentes Principais) foram utilizados para a realização da Análise Linear Discriminante (LDA) e depois validados utilizando uma validação cruzada de saída única (LOOCV) por meio do *Minitab 16 (MINITAB 16, Statistical Software, USA)*.

5 RESULTADOS

5.1 Expressão gênica

As 25 amostras utilizadas para a análise molecular de expressão gênica apresentaram concentrações (acima de 125 ng/ ng/μL) e razões adequadas (entre 260/280e 260/230 acima de 1.8), variando de acordo com a quantidade de tecido fornecido para a realização da síntese de cDNA. Nesta análise foram utilizadas seis amostras não tumorais obtidas de fragmentos de tecidos de tireoide que não foram comprometidas por lesão e que serviram como padrão da análise. Na Figura 1A e 1B observa-se a alta integridade dos RNAs extraídos de amostras por meio da visualização das bandas 18S e 28S em eletroforese em gel de agarose e do sistema de eletroforese capilar utilizando o *Agilent 2100 Bioanalyzer 2100*, respectivamente, no qual este último foi possível também identificar que todas as amostras de RNAs apresentaram índice de integridade equivalente *RINe* (*RNA integrity number equivalente*) acima de 7.0.

Figura 1: (A) Amostras de RNA visualizadas pelas bandas 18S e 28S em eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. (B) Amostras de RNA visualizadas no sistema de eletroforese capilar utilizando o *Agilent 2100 Bioanalyzer 2100* (B). MN: marcador de peso molecular. RIN: RNA integrity number.



Fonte: O autor.

A curva padrão obtida para cada um dos genes alvo: *CCNA1*, *CDKN1C*, *FOS*, *HSPA5*, *JUN*, *KSRI*, *MAP2K6*, *MAPK8IP2*, *SFN* e para o gene endógeno *MRPL19*, possibilitou o cálculo de eficiência de amplificação dos *primers* para cada gene. As curvas padrões de todos os genes analisados apresentaram valores de *slope* dentro do esperado, próximo a -3.3, indicando a alta eficiência dos iniciadores ($E=10^{-1/slope} - 1$) (Tabela 3). A curva padrão também possibilitou a definição da melhor diluição a ser utilizada, que consistiu de diluição de 1:5. A curva padrão e a curva de amplificação para os genes alvos e o gene endógeno estão

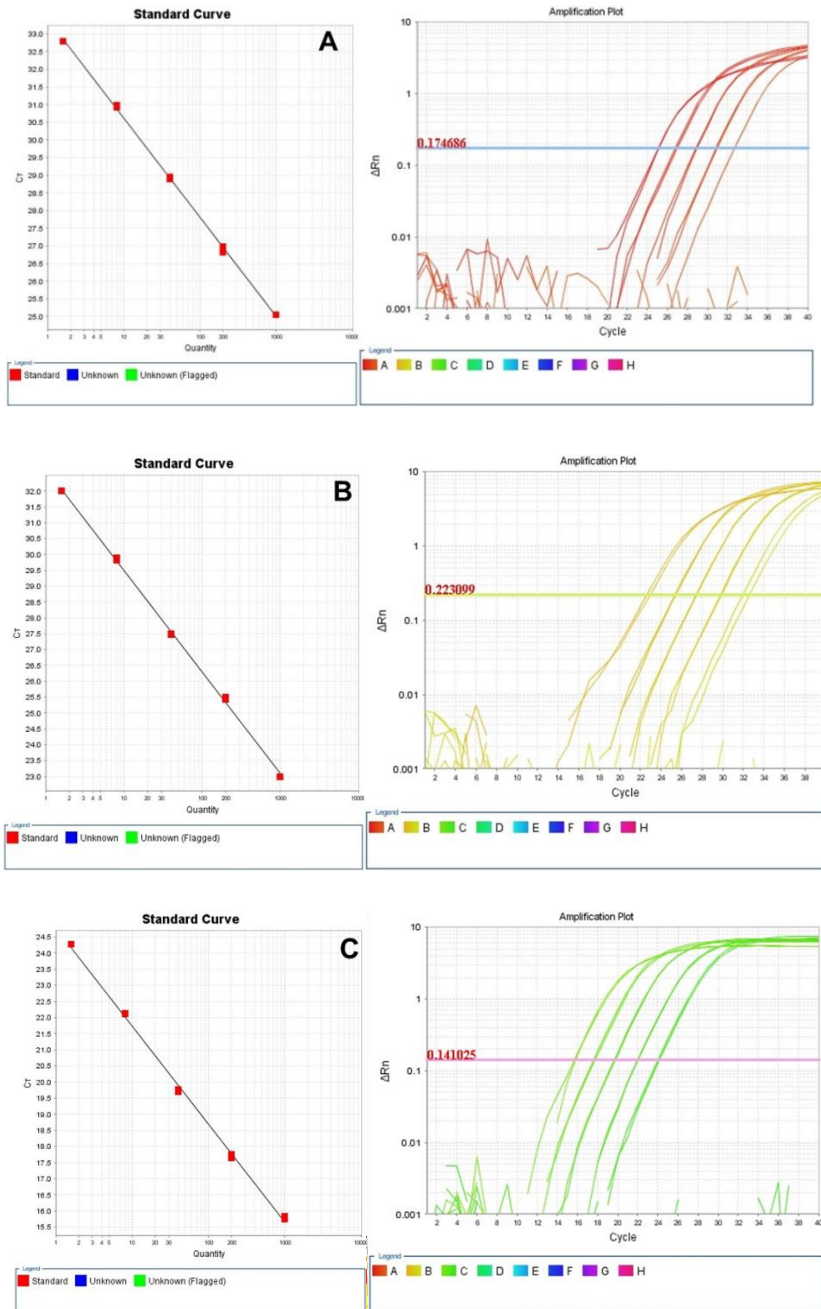
apresentadas na Figura 2 (A-J). A curva de dissociação para os genes alvos e endógeno está representada na Figura 3 (A-J), e demonstrou a alta especificidade dos iniciadores utilizados na amplificação, além de ausência de contaminação, amplificação inespecífica ou formação de *primer dimers*.

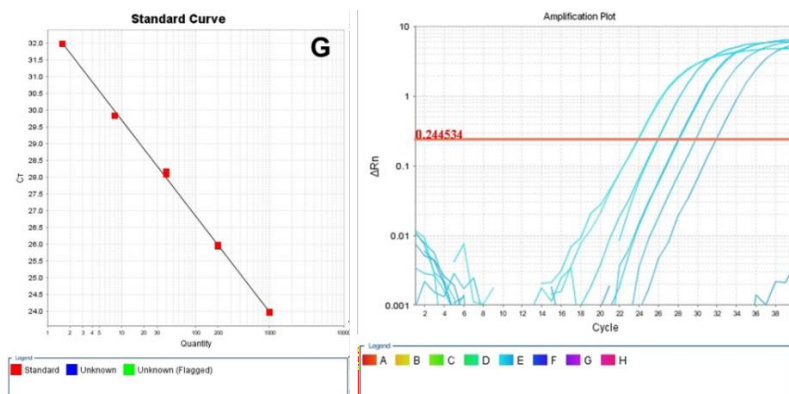
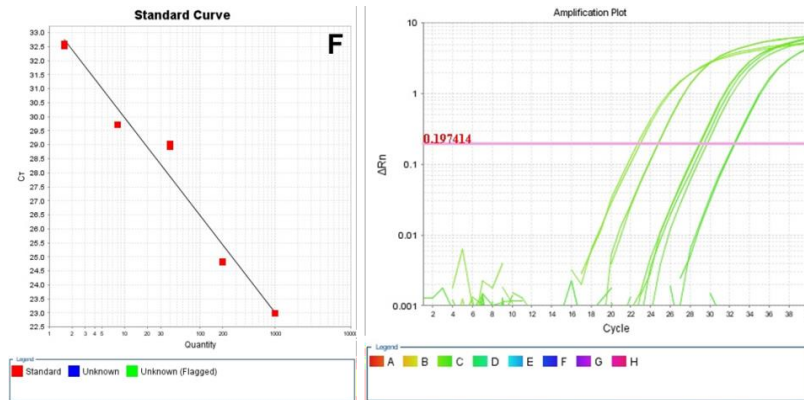
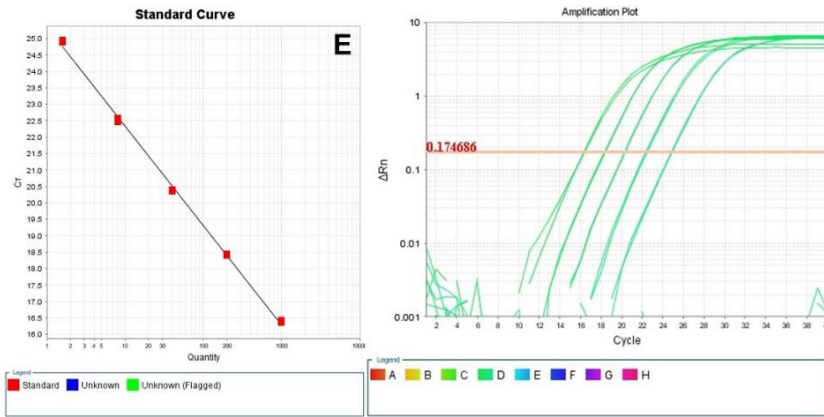
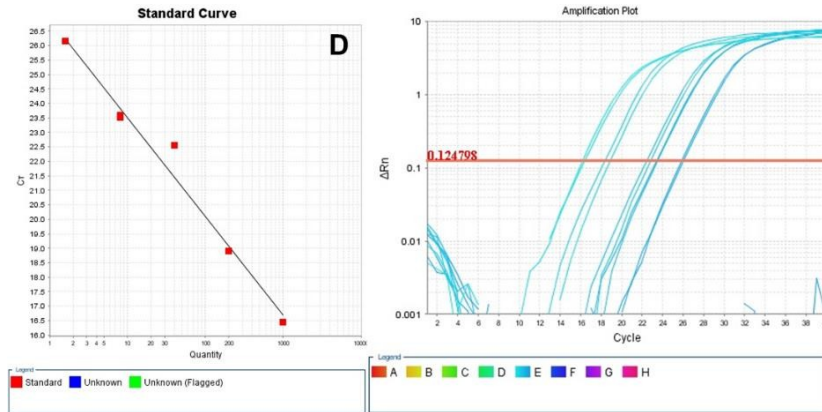
Tabela 3.: Eficiência de amplificação pelos valores de slope, valor de eficiência e coeficiente de linearidade dos primers para a amplificação dos genes alvos CCNA1, CDKN1C, FOS, HSPA5, JUN, KSR1, MAP2K6, MAPK8IP2, SFN e do gene endógeno MRPL19. As concentrações das diluições utilizadas para a obtenção dos valores de slope foram de 1000, 200, 40, 8 e 1,6 ng/μl de cDNA.

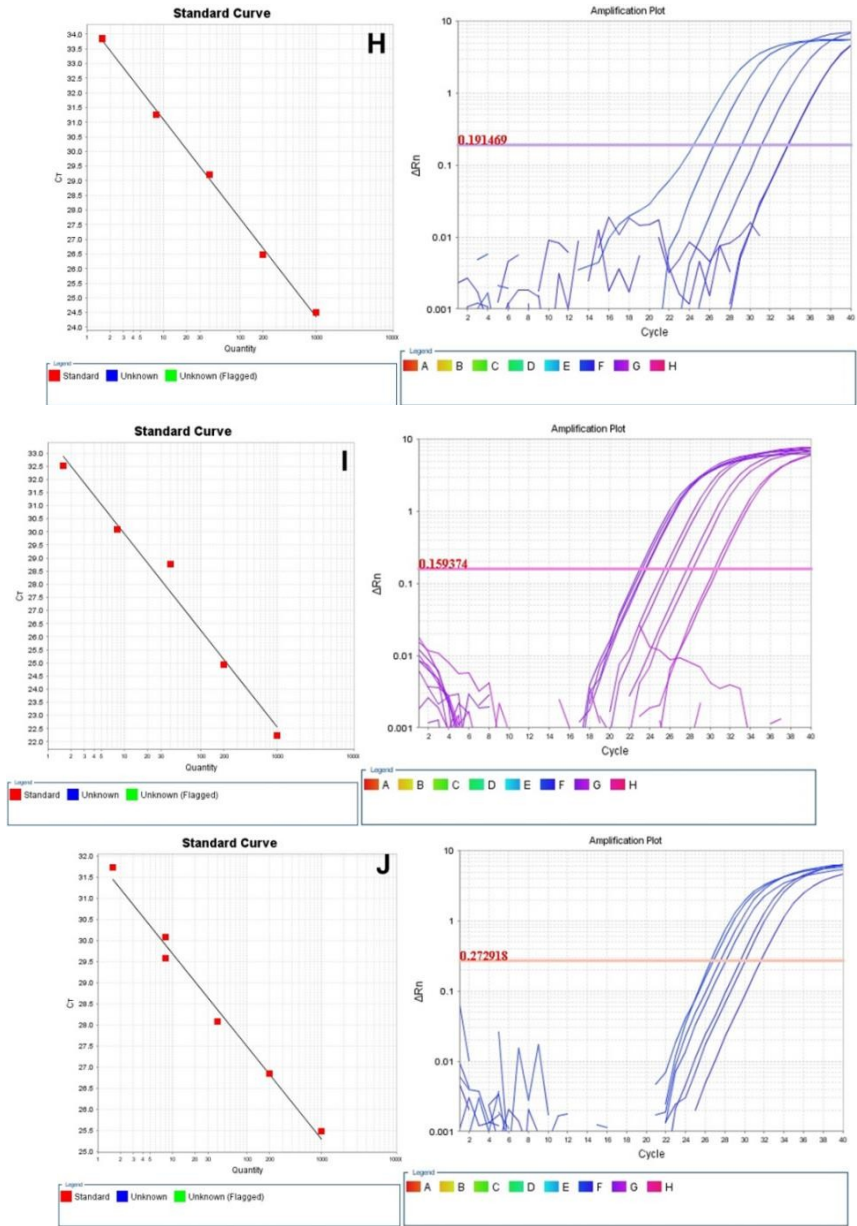
Gene	Slope	Eficiência (%)	Coeficiente de linearidade
<i>CCNA1</i>	-2,80	127	0,99
<i>CDKN1C</i>	-3,19	105	0,99
<i>FOS</i>	-3,04	113	0,99
<i>HSPA5</i>	-3,40	93	0,96
<i>JUN</i>	-3,02	113	0,99
<i>KSR1</i>	-3,33	98	0,98
<i>MAP2K6</i>	-2,86	123	0,99
<i>MAPK8IP2</i>	-3,33	97	0,99
<i>SFN</i>	-3,60	86	0,97
<i>MRPL19</i>	-2,36	164	0,95

Fonte: O autor.

Figura 2: Curvas padrões e curvas de amplificação para os genes alvo CCNA1 (A), CDKN1C (B), FOS (C), (D) Gene HSPA5, (E) Gene JUN, (F) Gene KSR1, (G) Gene MAP2K6, (H) Gene MAPK8IP2, (I) Gene SFN, (J) Gene MRPL19 em amostras de CPT.

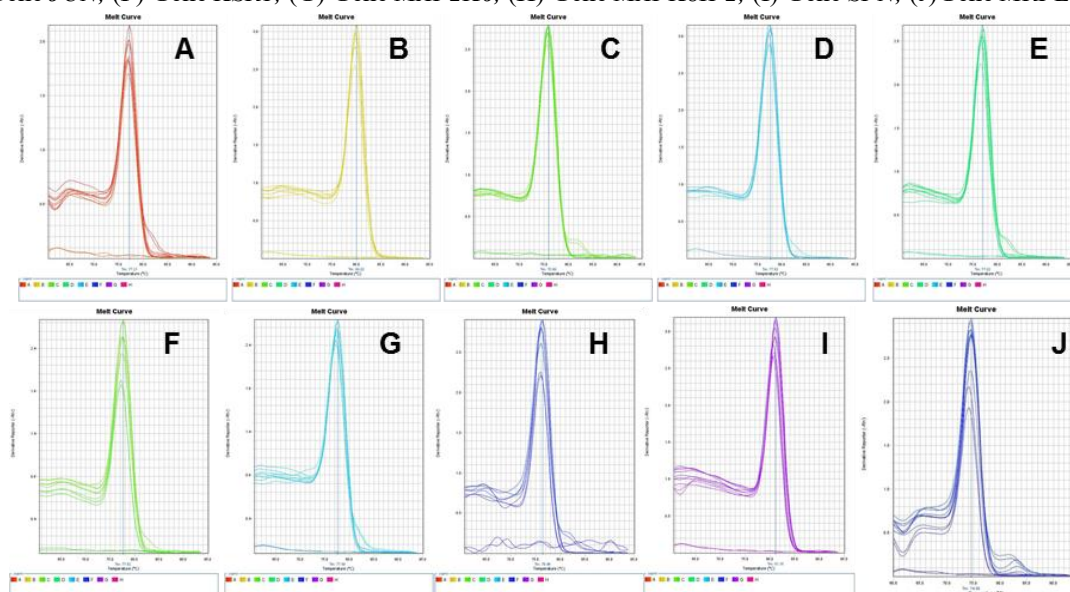






Fonte: O autor.

Figura 3. Curvas de dissociação para os genes *CCNA1* (A), *CDKN1C* (B), (C) Gene *FOS*, (D) Gene *HSPA5*, (E) Gene *JUN*, (F) Gene *KSRI*, (G) Gene *MAP2K6*, (H) Gene *MAPK8IP2*, (I) Gene *SFN*, (J) Gene *MRPL19*.



Fonte: O autor.

Na análise dos valores de QR do gene *CCNA1* em relação ao QR considerado normal (0,5 e 2,0) todas as quinze amostras de CPT apresentaram aumento de expressão (QR= 4,06 a 3423,98). Duas amostras normais apresentaram diminuição de expressão (QR= 0,40 e 0,44) e sete amostras normais de tecido tireoidiano não tumoral apresentaram expressão normal. Nesta análise também foi observado que três amostras de bócio apresentaram diminuição de expressão (QR 0,06 a 0,28), uma amostra apresentou expressão normal e seis amostras apresentaram aumento de expressão (QR 3,07 a 141,99) em relação ao QR considerado normal (0,5 e 2,0). Na comparação com os tecidos normais adjacentes, dez amostras normais adjacentes ao CPT apresentaram aumento de expressão (QR= 2,72 a 216,03) e cinco amostras apresentaram expressão normal. Nas amostras normais adjacentes ao bócio, duas apresentaram diminuição de expressão (QR= 0,38 e 0,44), cinco amostras apresentaram aumento de expressão (QR= 3,09 a 144,31) e três amostras apresentaram expressão normal em comparação com os valores de QR estabelecidos como normais.

Na análise dos valores de QR do gene *CDKN1C* em relação ao QR considerado normal (0,5 e 2), no grupo de paciente acometidos por CPT, oito amostras apresentaram expressão normal e sete amostras apresentaram aumento de expressão (QR= 4,37). Nas amostras normais de tecido tireoidiano não tumoral, onze apresentaram expressão normal e uma amostra apresentou aumento de expressão (QR= 2,11). Nesta análise, foi observado que uma amostra de bócio apresentou diminuição de expressão (QR=0,18), sete amostras apresentaram expressão normal e duas amostras apresentaram aumento de expressão (QR= 4,37). Na

comparação com os tecidos normais adjacentes, nove amostras normais adjacentes ao CPT apresentaram aumento de expressão (QR= 3,46 a 4,37) e seis amostras apresentaram expressão normal. Nas amostras normais adjacentes ao bócio, quatro amostras apresentaram aumento de expressão (QR= 2,53 a 6,16) e seis amostras apresentaram expressão normal em comparação com os valores de QR estabelecidos como normais.

Para a análise dos valores de QR do gene *FOS* em relação ao QR considerado normal (0,5 e 2) sete amostras de CPT apresentaram diminuição de expressão (QR= 0,09 a 0,40) e oito amostras apresentaram expressão normal. Nas amostras normais de tecido tireoidiano não tumoral, uma amostra apresentou diminuição de expressão (QR=0,48) e doze amostras apresentaram expressão normal. Nesta análise também foi observado que cinco amostras de bócio apresentaram diminuição de expressão (QR= 0,01 a 0,40) e cinco amostras apresentaram expressão normal. Na comparação com os tecidos normais adjacentes, duas amostras normais adjacentes ao CPT apresentaram aumento de expressão (QR= 3,11 a 5,47), três amostras apresentaram diminuição de expressão (QR= 0,14 a 0,15) e dez amostras apresentaram expressão normal. Nas amostras normais adjacentes ao bócio, uma amostra apresentou diminuição de expressão (QR= 0,28) e oito amostras apresentaram expressão normal em comparação com os valores de QR estabelecidos como normais.

Na análise dos valores de QR do gene *JUN* em relação ao QR considerado normal (0,5 e 2), sete amostras de CPT apresentaram diminuição de expressão (QR= 0,10 a 0,33) e oito amostras apresentaram expressão normal. Todas as doze amostras normais de tecido tireoidiano não tumoral apresentaram expressão normal. Nesta análise também foi observado que seis amostras de bócio apresentaram diminuição de expressão (QR= 0,03 a 0,49) e quatro amostras apresentaram expressão normal. Na comparação com os tecidos normais adjacentes, cinco amostras normais adjacentes ao CPT apresentaram diminuição de expressão (QR=0,21 a 0,48) e dez amostras apresentaram expressão normal. Nas amostras normais adjacentes ao bócio, uma amostra apresentou diminuição de expressão (QR= 0,22) e nove amostras apresentaram expressão normal em comparação com os valores de QR estabelecidos como normais.

Para a análise dos valores de QR do gene *MAP2K6* em relação ao QR considerado normal (0,5 e 2), dez amostras de CPT apresentaram diminuição de expressão (QR= 0,24 a 0,49) e cinco amostras apresentaram expressão normal. Todas as quinze amostras normais de tecido tireoidiano não tumoral apresentaram expressão normal. Nesta análise também foi observado que uma amostra de bócio apresentou diminuição de expressão (QR=0,37) e nove amostras apresentaram expressão normal. Na comparação com os tecidos normais

adjacentes, duas amostras normais adjacentes ao CPT apresentaram diminuição de expressão (QR= 0,2 a 0,49) e dez amostras apresentaram expressão normal. Nas amostras normais adjacentes ao bócio, dez amostras apresentaram expressão normal em comparação com os valores de QR estabelecidos como normais.

Na análise dos valores de QR do gene *MAPK8IP2* em relação ao QR considerado normal (0,5 e 2), duas amostras de CPT apresentaram diminuição de expressão (QR= 0,43 e 0,44), quatro amostras apresentaram expressão normal e nove amostras apresentaram aumento de expressão (QR= 2,07 a 233,14). Todas as dez amostras normais de tecido tireoidiano não tumoral apresentaram expressão normal. Nesta análise também foi observado que duas amostras de bócio apresentaram diminuição de expressão (QR= 0,02 e 0,41), quatro amostras apresentaram expressão normal e quatro amostras apresentaram aumento de expressão (QR= 2,48 a 7,00). Na comparação com os tecidos normais adjacentes, dez amostras normais adjacentes ao CPT apresentaram aumento de expressão (QR= 2,22 a 30,98) e cinco amostras apresentaram expressão normal. Nas amostras normais adjacentes ao bócio, uma amostra apresentou diminuição de expressão (QR= 0,30), cinco amostras apresentaram aumento de expressão (QR= 2,34 a 9,00) e quatro amostras apresentaram expressão normal em comparação com os valores de QR estabelecidos como normais.

Na análise dos valores de QR do gene *SFN* em relação ao QR considerado normal (0,5 e 2), todas as quinze amostras de CPT apresentaram aumento de expressão (QR= 5,41 a 554,41). Todas as doze amostras normais de tecido tireoidiano não tumoral apresentaram expressão normal. Nesta análise também foi observado que quatro amostras de bócio apresentaram diminuição de expressão (QR= 0,05 a 0,41), três amostras apresentaram expressão normal e três amostras apresentaram aumento de expressão (QR= 2,67 a 8,99). Na comparação com os tecidos normais adjacentes, dez amostras normais adjacentes ao CPT apresentaram aumento de expressão (QR= 2,08 a 45,41), uma amostra apresentou diminuição de expressão (QR= 0,29) e quatro amostras apresentaram expressão normal. Nas amostras normais adjacentes ao bócio, três amostras apresentaram diminuição de expressão (QR= 0,15 e 0,30), quatro amostras apresentaram aumento de expressão (QR= 2,26 a 18,94) e três amostras apresentaram expressão normal em comparação com os valores de QR estabelecidos como normais.

Na análise dos valores de QR do gene *HSPA5* em relação ao QR considerado normal (0,5 e 2), três amostras de CPT apresentaram diminuição de expressão (QR= 0,22 a 0,32), oito amostras apresentaram expressão normal e quatro amostras apresentaram aumento de expressão (QR= 2,23 a 4,02). Todas as seis amostras normais de tecido tireoidiano não tumoral

apresentaram expressão normal. Nesta análise também foi observado que uma amostra de bócio apresentou diminuição de expressão (QR=0,02), três amostras apresentaram expressão normal e seis amostras apresentaram aumento de expressão (QR= 2,03 a 5,09). Na comparação com os tecidos normais adjacentes, uma amostra normal adjacente ao CPT apresentou diminuição de expressão (QR= 0,40), quatro amostras apresentaram aumento de expressão (QR= 3,042 a 12,59) e dez amostras apresentaram expressão normal. Nas amostras normais adjacentes ao bócio, uma amostra apresentou diminuição de expressão (QR= 0,00), seis amostras apresentaram aumento de expressão (QR= 2,06 a 3,47) e três amostras apresentaram expressão normal em comparação com os valores de QR estabelecidos como normais.

Na análise dos valores de QR do gene *KSRI* em relação ao QR considerado normal (0,5 e 2), quatorze amostras de CPT apresentaram aumento de expressão (QR= 2,22 a 3734,97) e uma amostra apresentou expressão normal. Seis amostras normais de tecido tireoidiano não tumoral apresentaram expressão normal. Nesta análise também foi observado que uma amostra de bócio apresentou diminuição de expressão (QR= 0,12) e nove amostras apresentaram expressão normal. Na comparação com os tecidos normais adjacentes, todas as quinze amostras normais adjacentes ao CPT apresentaram aumento de expressão (QR= 4,19 a 34,21). Nas amostras normais adjacentes ao bócio, oito amostras apresentaram aumento de expressão (QR= 5,42 a 17,05) e duas amostras apresentaram expressão normal em comparação com os valores de QR estabelecidos como normais.

Cinco análises diferentes foram realizadas para todos os genes alvo *CCNA1*, *FOS*, *JUN*, *KSRI*, *MAP2K6*, *MAPK8IP2*, *HSPA5*, *SFN* e *CDKN1C*, que consistiram em: amostras de pacientes acometidos por CPT e grupo normal de tecido tireoidiano não tumoral (grupo controle) (Análise 1), pacientes acometidos por bócio e grupo normal de tecido tireoidiano não tumoral (grupo controle) (Análise 2), amostras de CPT e normal adjacente (grupo controle) (Análise 3), amostras de bócio e normal adjacente (grupo controle) (Análise 4) e amostras de CPT e grupo de amostras de bócio (grupo controle) (Análise 5). Os dados referentes a estas análises são descritos em seguida e ilustrados nas Figuras 4 a 8.

Na análise 1, quando comparados o grupo de CPT e grupo de normal de tecido tireoidiano não tumoral constituído como grupo controle, os genes *FOS* (**P = 0,0166**), *JUN* (**P = 0,0006**) e *MAP2K6* (**P = 0,0013**) apresentaram diminuição de expressão significativa nas amostras tumorais quando comparadas com as amostras do grupo controle e os genes *CCNA1* (**P = <0,0001**), *KSRI* (**P = 0,0007**), *SFN* (**P = <0,0001**) e *MAPK8IP2* (**P = 0,0375**) apresentaram expressão aumentada nas amostras tumorais quando comparados com o grupo

controle (Figura 4). Os outros genes não apresentaram expressão diferencial na comparação entre os grupos.

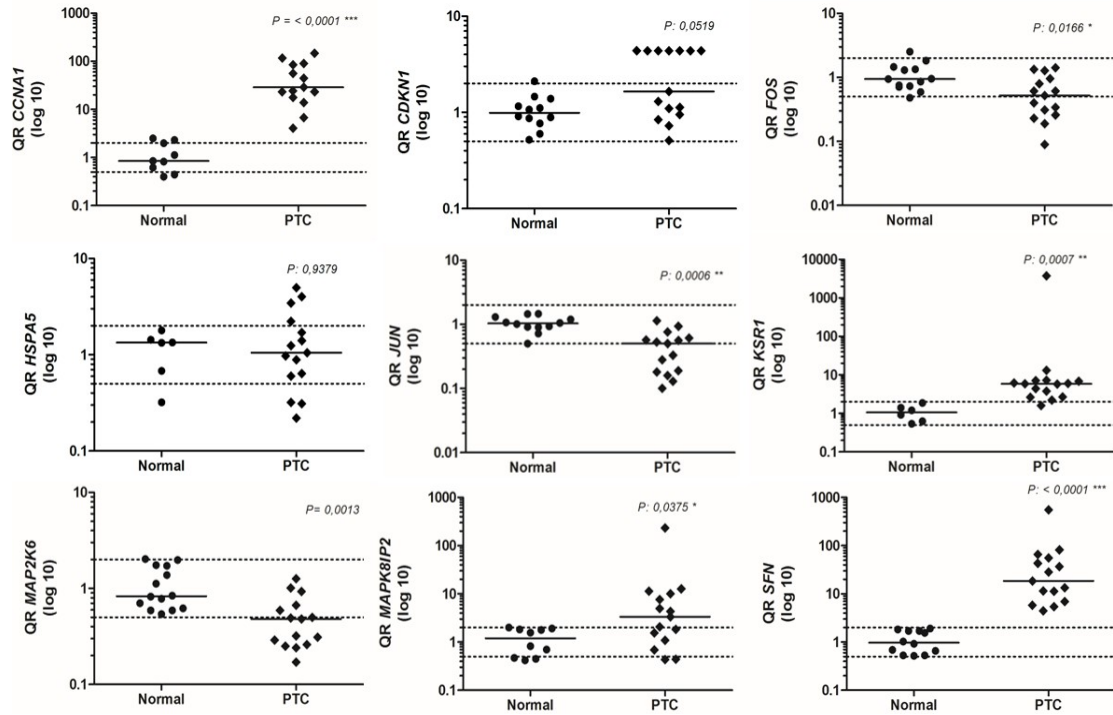
Na análise 2, quando comparados o grupo de bócio e grupo de normal de tecido tireoidiano não tumoral constituído como grupo controle, os genes *FOS* (**P = 0,0277**) e *JUN* (**P = 0,0027**) apresentaram expressão reduzida nas amostras de bócio quando comparado com o grupo controle e o gene *KSR1* (**P = 0,0075**) apresentou expressão aumentada nas amostras de bócio quando comparados com o grupo controle (Figura 5). Os outros genes não apresentaram expressão diferencial na comparação entre os grupos.

Na análise 3, quando comparados o grupo de CPT e grupo normal adjacente como grupo controle, os genes *FOS* (**P = 0,0477**), *JUN* (**P = 0,0242**), *CDKN1C* (**P = 0,0459**) e *MAP2K6* (**P = 0,0188**) apresentaram expressão reduzida nas amostras de CPT quando comparados com o grupo controle (Figura 6). Os outros genes não apresentaram expressão diferencial na comparação entre os grupos.

Na análise 4, quando comparados o grupo de bócio e grupo normal adjacente como grupo controle, o gene *JUN* (**P = 0,0168**) apresentou expressão reduzida nas amostras de bócio quando comparado com o grupo controle (Figura 7). Os outros genes não apresentaram expressão diferencial na comparação entre os grupos.

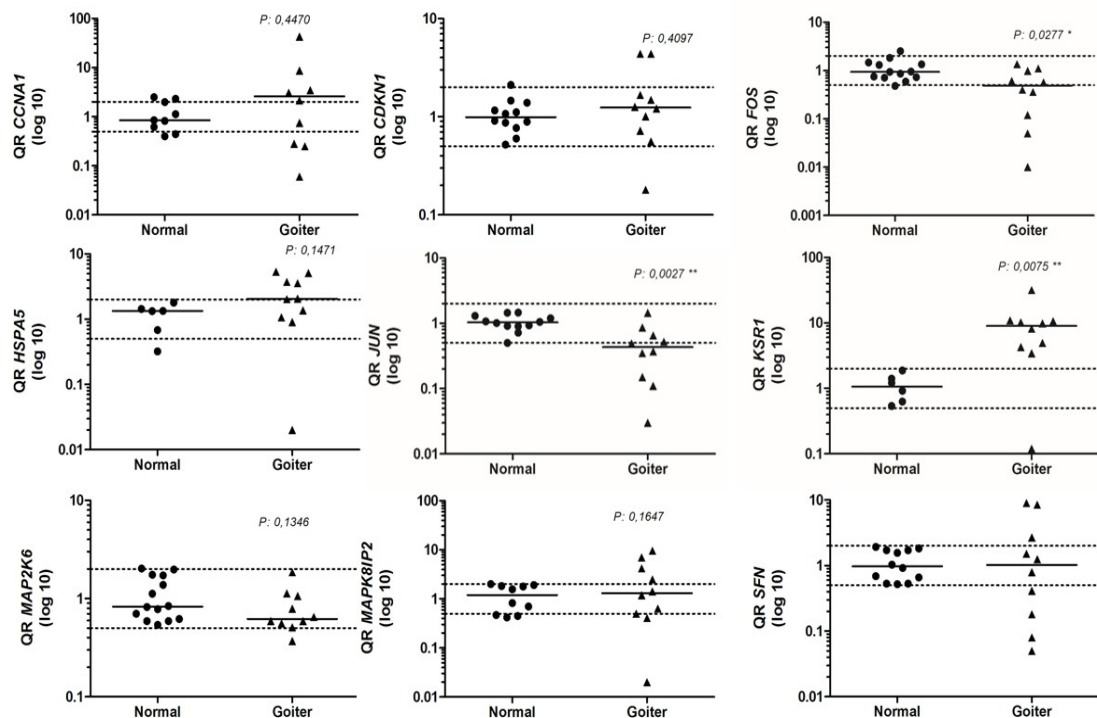
Na análise 5, quando comparados o grupo de CPT e grupo de bócio como grupo controle, os genes *SFN* (**P = 0,0002**) e *CCNA1* (**P = 0,0043**) apresentaram expressão aumentada nas amostras tumorais quando comparados com o grupo controle (Figura 8). Os outros genes não apresentaram expressão diferencial na comparação entre ambos os grupos.

Figura 4. Comparação entre medianas dos níveis de expressão gênica pela técnica RT-qPCR dos genes *CCNA1*, *FOS*, *JUN*, *KSR1*, *MAP2K6*, *MAPK8IP2*, *HSPA5*, *SFN* e *CDKN1C* em amostras de CPT e grupo normal (grupo controle) (Análise 1). QR: quantificação relativa do gene. PTC: carcinoma papilífero de tireoide. NORMAL: amostras não tumorais de tireoide.



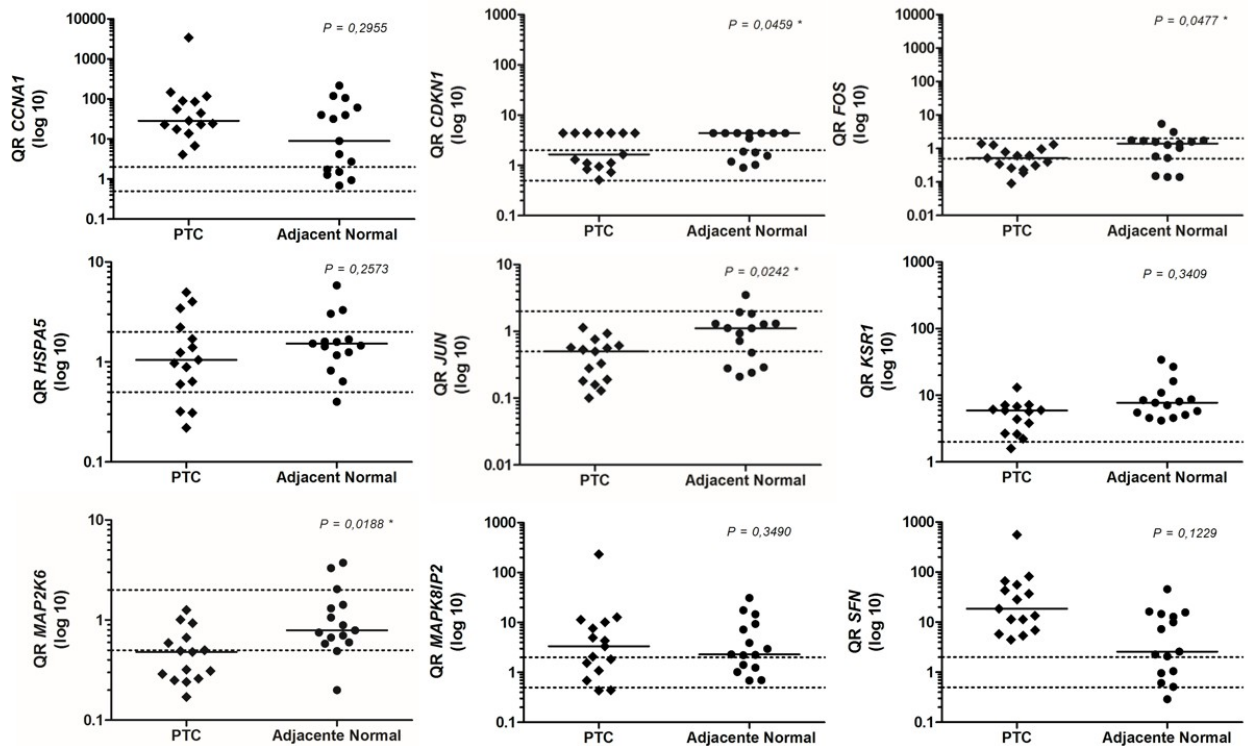
Fonte: O autor.

Figura 5. Comparação entre medianas dos níveis de expressão gênica pela técnica RT-qPCR dos genes *CCNA1*, *FOS*, *JUN*, *KSR1*, *MAP2K6*, *MAPK8IP2*, *HSPA5*, *SFN* e *CDKN1C* em amostras de bócio e grupo normal (grupo controle) (Análise 2). QR: quantificação relativa do gene. GOITER: amostras de bócio. NORMAL: amostras não tumorais de tireoide.



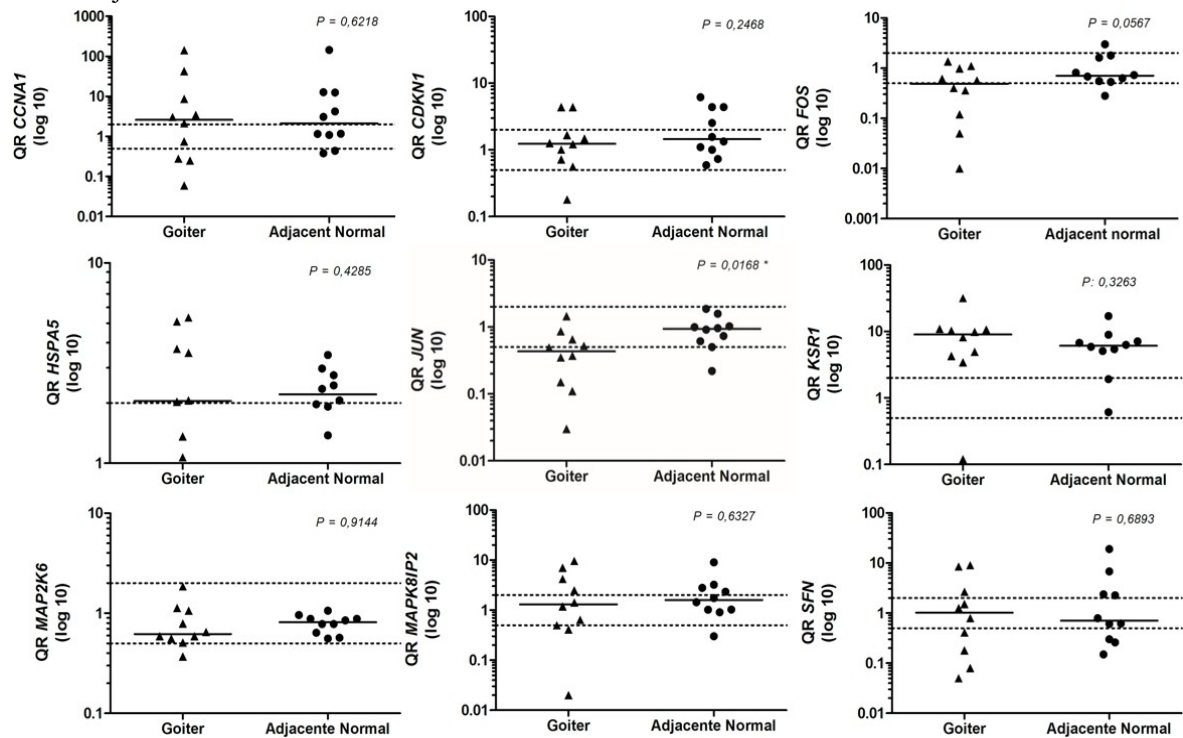
Fonte: O autor.

Figura 6. Comparação entre medianas dos níveis de expressão gênica pela técnica RT-qPCR do genes *CCNA1*, *FOS*, *JUN*, *KSR1*, *MAP2K6*, *MAPK8IP2*, *HSPA5*, *SFN* e *CDKN1C* em amostras de CPT e grupo normal adjacente (grupo controle) (Análise 3). QR: quantificação relativa do gene. PTC: carcinomapiilífero de tireoide. ADJCENTE NORMAL: amostras normais adjacentes.



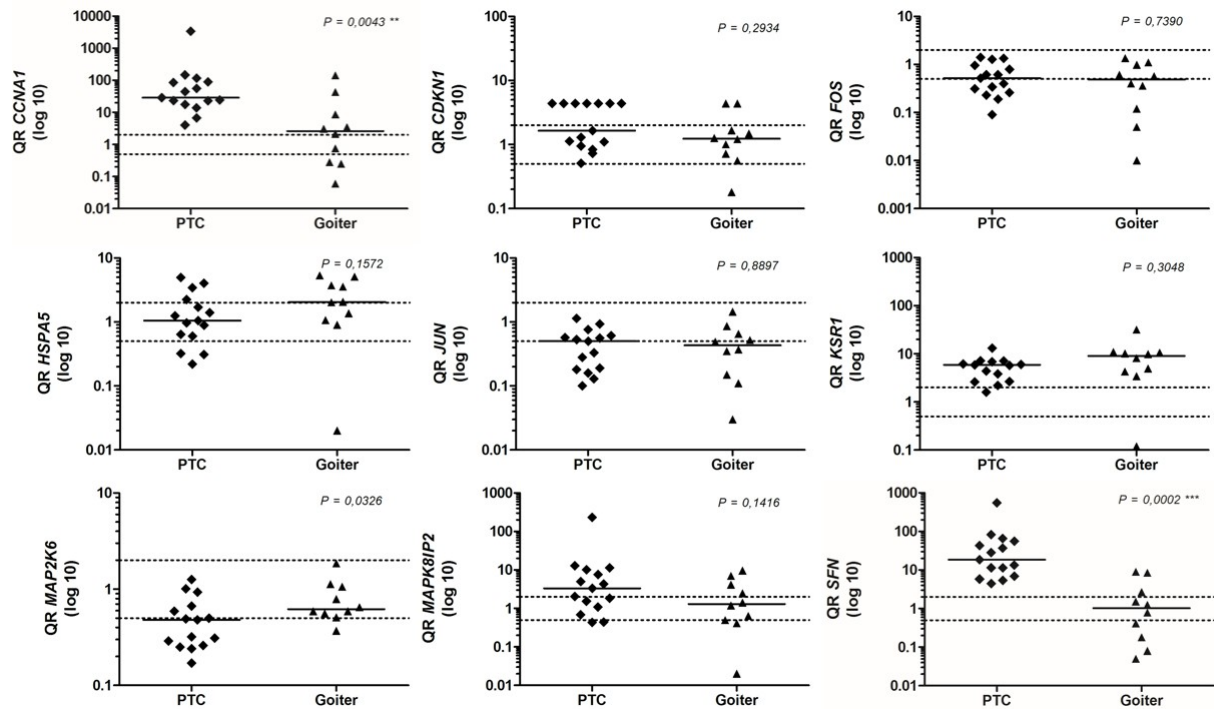
Fonte: O autor.

Figura 7. Comparação entre medianas dos níveis de expressão gênica pela técnica RT-qPCR dos genes *CCNA1*, *FOS*, *JUN*, *KSR1*, *MAP2K6*, *MAPK8IP2*, *HSPA5*, *SFN* e *CDKN1C* em amostras de bócio e grupo normal adjacente (grupo controle) (Análise 4). QR: quantificação relativa do gene. ADJCENTE NORMAL: amostras normais adjacentes. GOITER: amostras de bócio.



Fonte: O autor.

Figura 8. Comparação entre medianas dos níveis de expressão gênica pela técnica RT-qPCR do genes CCNA1, FOS, JUN, KSR1, MAP2K6, MAPK8IP2, HSPA5, SFN e CDKN1C em amostras de CPT e bócio (grupo controle) (Análise 5). QR: quantificação relativa do gene. PTC: carcinoma papilífero de tireoide. GOITER: amostras de bócio.



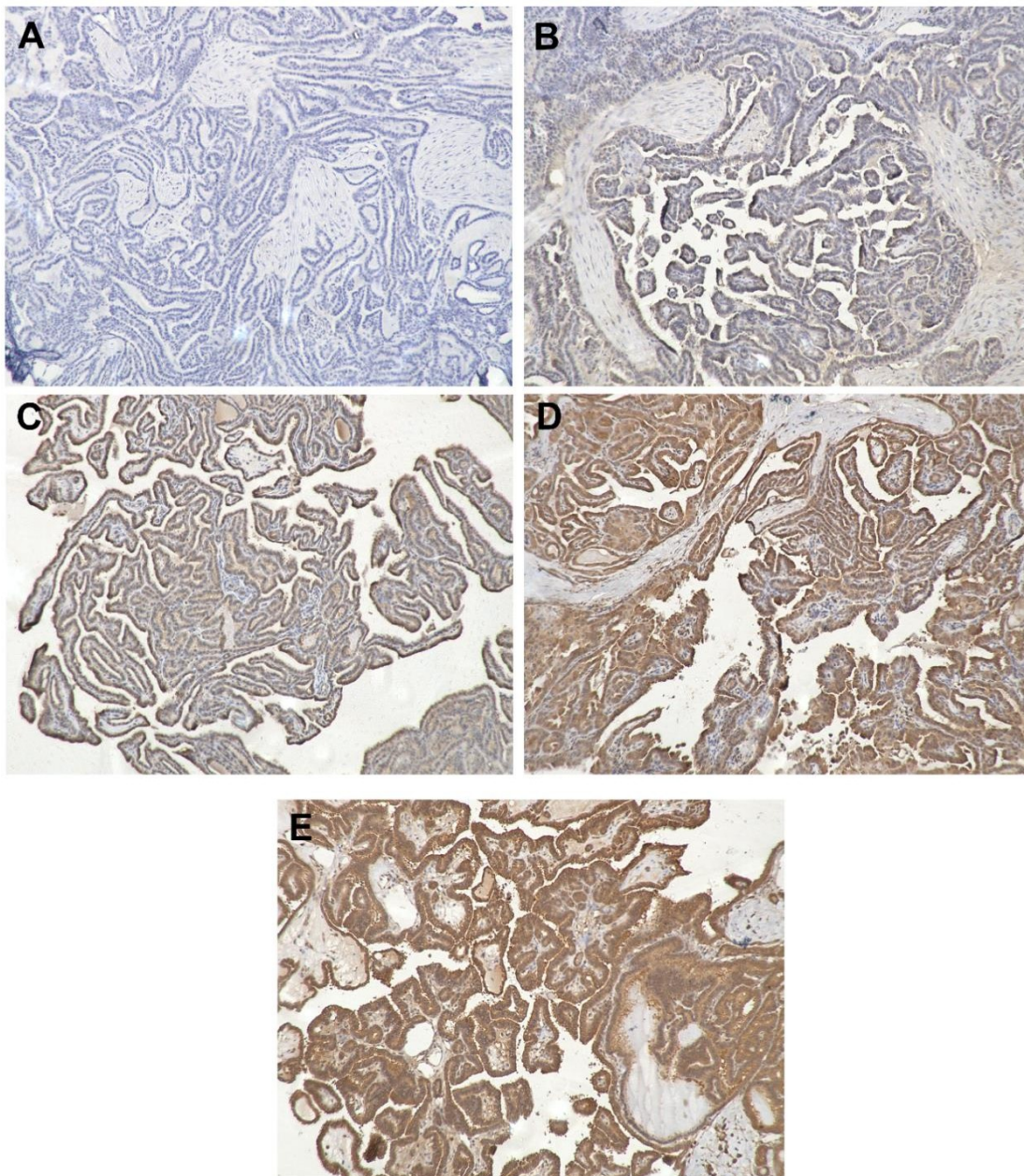
Fonte: O autor.

5.2 Imunoexpressão Ciclina A1

Na avaliação da imunoexpressão da Ciclina A1, todas as amostras de CPT apresentaram imunomarcção citoplasmática em diferentes intensidades, além de a histologia apresentar arquitetura papilífera característica: núcleo fosco e células cuboides ao redor de eixos conjuntivos. A imunomarcção à Ciclina A1 estava ausente em 25% nos tecidos de bócio e em 13% nos tecidos de CPT (Figura 9 e 10, Tabela 4). Em contraste, 87% dos tecidos de CPT ($k = 0,48$) demonstraram imuno marcação positiva para a Ciclina A1 e 75% dos tecidos de bócio exibiram expressão positiva ($k = 0,58$).

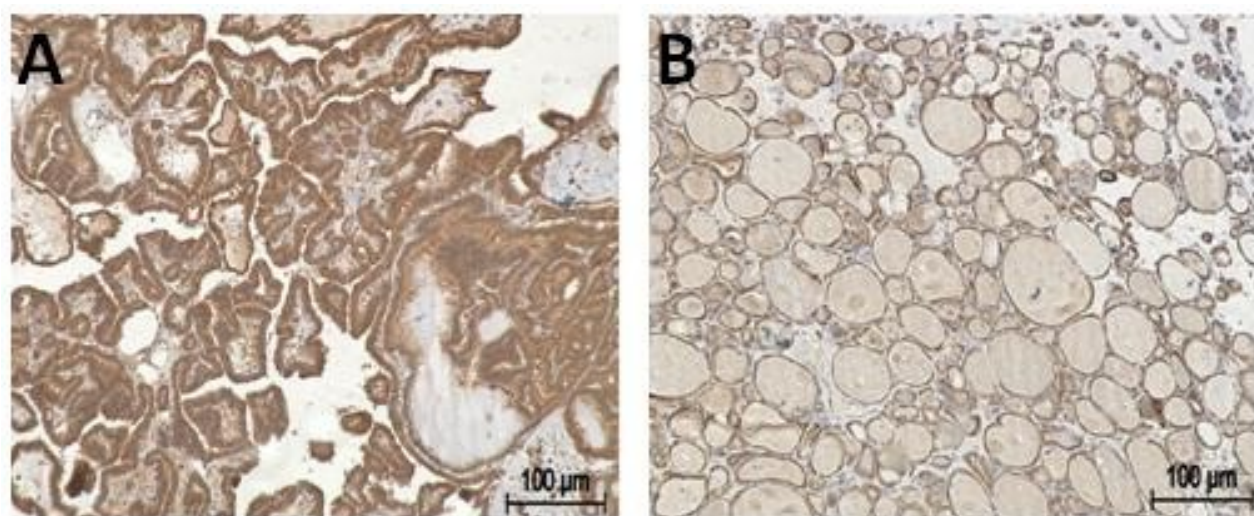
Quando realizado a análise estatística pelo Teste *Fisher's exact* com o objetivo de comprovar o resultado da avaliação por *score* obtido pela análise de IHC, não foi possível obter diferença significativa para a Ciclina A1 na comparação entre os tecidos de CPT versus tecidos de bócio ($P = 0,4424$).

Figura 9. Fotomiografia representativa dos *scores* da intensidade da imunomarcção da Ciclina A1. A: *score* 0 – ausência de marcação. B: *score* 1 – marcação fraca. C: *score* 2 – marcação levemente moderada. D: *score* 3 – marcação moderada. E: *score* 4 – marcação forte. Aumento real 10x.



Fonte: O autor.

Figura 10. Fotomiografia comparativa da expressão da Ciclina A1 por IHC em tecido de CPT (A) e Bócio(B). Aumento real 10x.



Fonte: O autor.

Tabela 4. Análise por imuno expressão da Ciclina A1 em amostras CPT e amostras de bócio.

	Expressão negativa (n)	Incidência negativa (%)	Expressão positiva (n)	Incidência positiva (%)
Tecidos				
Bócio	1	25%	3	75%
CPT	2	13%	13	87%

Fonte: O autor

5.3 Espectroscopia FT-IR

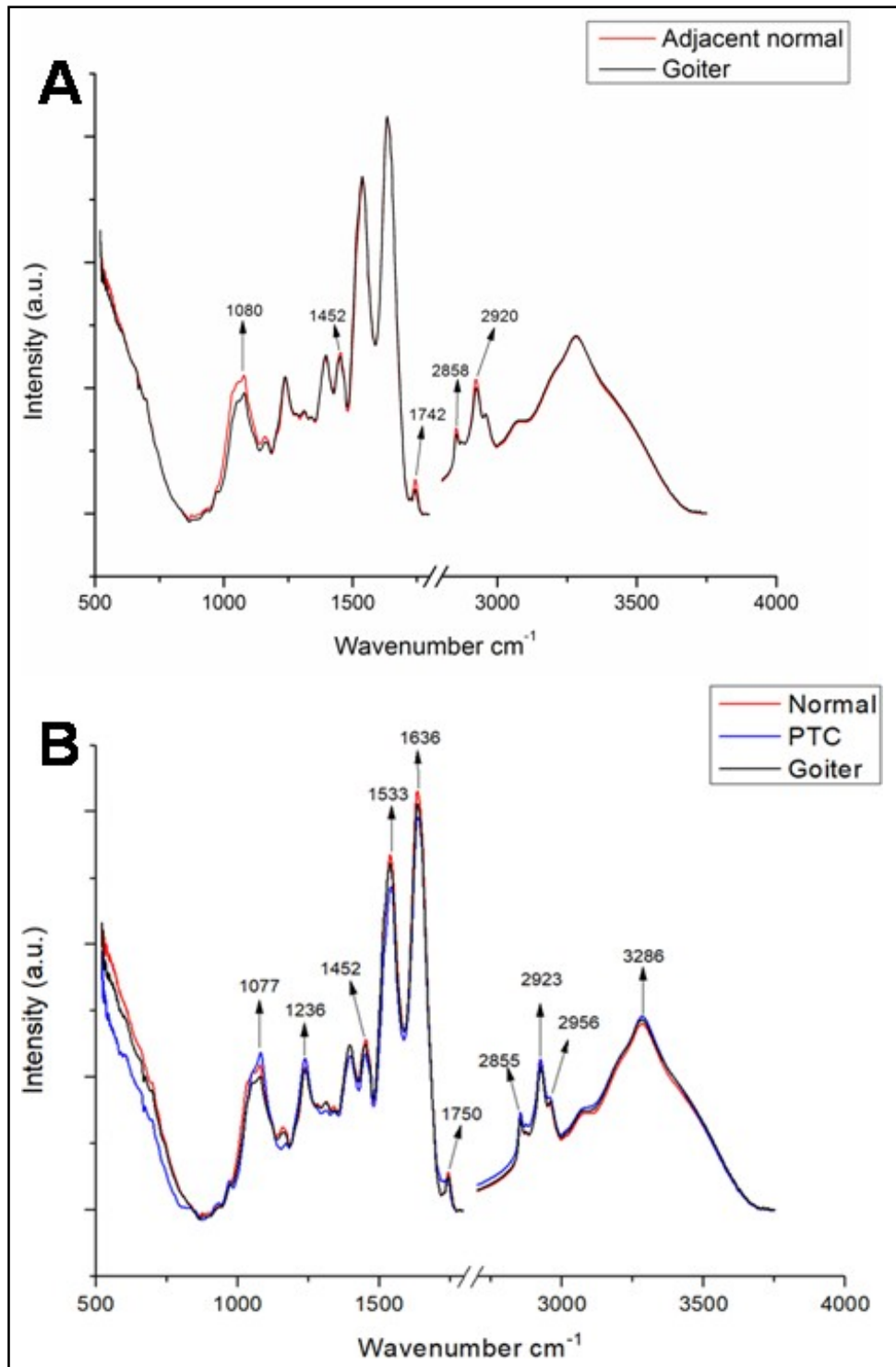
Na avaliação dos tecidos de tireoide por análise de FTIR observou-se no espectro médio dos grupos analisados diferenças de intensidade das bandas de ácido nucleico (1077cm^{-1} , 1080cm^{-1} , 1236cm^{-1}), proteínas (1452cm^{-1} , 1533cm^{-1} , 1636cm^{-1}) e lipídios (1742cm^{-1} , 1750cm^{-1} , 2855cm^{-1} , 2858cm^{-1} , 2920cm^{-1} , 2923cm^{-1} , 2956cm^{-1} , 3286cm^{-1}) (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008; ZHANG *et al.*, 2015; WU *et al.* 2016; DEPCIUCH *et al.* 2018) (Tabela 5). Observou-se aumento de intensidade nas bandas referente ao ácido nucleico (1077cm^{-1} , 1236cm^{-1}) em amostras de CPT quando comparadas com amostras de bócio e seus normais adjacentes (Figura 11).

Tabela 5. Principais modos vibracionais detectados nas amostras de tecido tireoidiano (CPT, bócio e normal adjacente de bócio). *: modo vibracional, vs: modo vibracional de estiramento simétrico, vas: modo vibracional de estiramento assimétrico.

Pico (cm⁻¹)	Modo vibracional*	Molécula
1077	vsPO ₂	Ácido nucleico
1080	vsPO ₂	Ácido nucleico
1236	Amida III and vasPO ₂	Ácido nucleico
1452	vasCH ₃	Proteína
1533	Amida II	Proteína
1636	Amida I	Proteína
1742	C=O de ésteres	Lipídeo
1750	C=O de ésteres	Lipídeo
2855	vasCH ₃	Lipídeo
2858	vasCH ₃	Lipídeo
2920	vasCH ₂	Lipídeo
2923	vasCH ₂	Lipídeo
2956	vasCH ₃	Lipídeo
3286	vsO·H	Lipídeo

Fonte: Movasaghi; Rehman; Rehman, 2008; Zhang *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2016; Depciuch *et al.* 2018.

Figura 11. (A) Espectro médio de amostra de bócio e normais adjacentes avaliados por FTIR. (B) Espectros médio de amostra de CPT, bócio e normais adjacentes avaliados por FTIR. PTC: carcinomapiplífero de tireoide. Goiter: bócio. Adjacent normal: normal adjacente de bócio. Normal: normal adjacente de bócio.



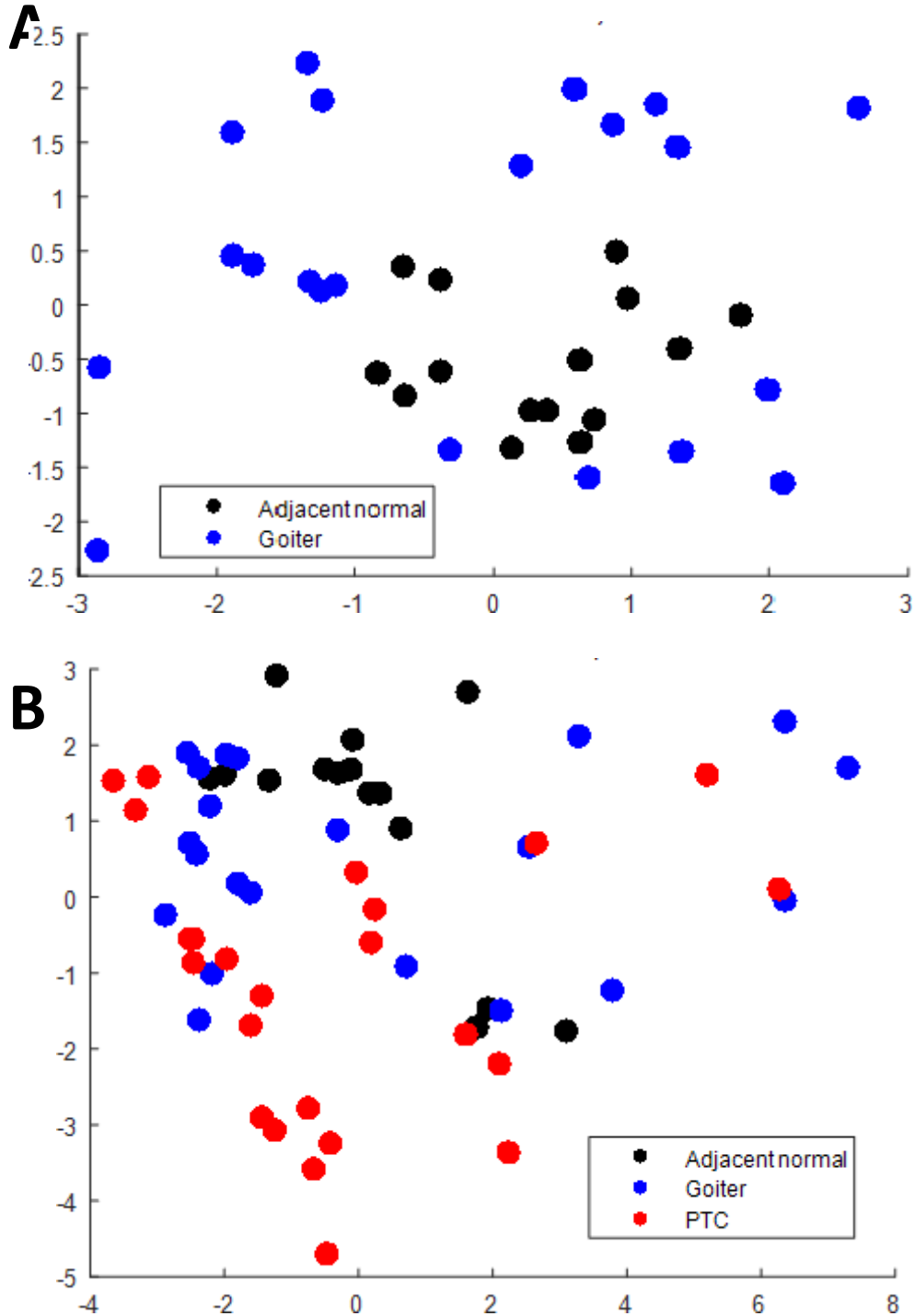
Fonte: O autor.

Duas análises multivariadas PCA foram realizadas: a Análise 1 constituída por amostras de bócio e amostra seus normais adjacentes (Figura 12A) e a Análise 2 constituída por amostras de CPT, amostras de bócio e amostra seus normais adjacentes

(Figura 12B). Os espectros de b33cio e normal mostraram algum agrupamento, embora houvesse sobreposi33es. Uma tend33ncia semelhante foi observada na PCA para normal, b33cio e CPT, embora a sobreposi33o entre CPT e b33cio tenha sido maior. Como os resultados da PCA podem ser plotados apenas em dois ou tr33s eixos, foi realizada a an33lise PC-LDA, que leva em considera33o as dimens33es. Em ambas as an33lises de PCA, n33o foi poss33vel observar uma boa separa33o entre as amostras avaliadas. No entanto, foi realizada a an33lise discriminante do componente linear principal (LDA) e LDA usando LOOCV para se obter uma classifica33o e obter uma melhor valida33o.

Na an33lise multivariada 1, pela avalia33o LDA e LOOCV observou-se que 100% dos espectros dos espectros normais adjacentes puderam ser distinguidos dos espectros das amostras de b33cio, 90.47% dos espectros de amostras de b33cio puderam ser distinguidos dos espectros das amostras de seus respectivos normal adjacentes e 9.52% dessas amostras de b33cio, foram classificadas como normal adjacente (Figura 12A, Tabelas 6 e 7). Na an33lise multivariada 2 pela an33lise de LDA observou-se que 93.3% dos espectros de tecido normal adjacente de b33cio puderam ser distinguidos e 6.6% dos espectros puderam ser classificadas como espectro de b33cio, dentre os espectros de b33cio 85.71% puderam ser classificadas conforme a histologia, 9.52% puderam ser classificadas como normal adjacente e 4.76% puderam ser classificadas como amostras de CPT. Dentre os espectros de CPT 95.83% puderam ser classificadas conforme a histologia e 12.5% dos espectros puderam ser classificadas como espectros de b33cio (Figura 12B, Tabelas 6 e 7). Pela an33lise LOOCV observou-se que 80% dos espectros normais adjacentes puderam ser distinguidos dos espectros das amostras de b33cio e 20% dos espectros normais adjacentes puderam ser classificadas como espectros das amostras de b33cio. Dentre os espectros de b33cio, 80.9% puderam ser classificadas conforme a histologia, 14.28% puderam ser classificadas como espectro de tecido normal adjacente e 4.76% dos espectros puderam ser classificadas como CPT, 87.5% dos espectros de CPT puderam ser distinguidos de b33cio e seu normal adjacente e 12.5% dos espectros de CPT puderam ser classificadas como espectros de b33cio (Tabela 6 e 7). Desta forma, podemos observar que a t33cnica FTIR 33 capaz de distinguir com alta sensibilidade tecidos tireoidianos normais, benignos e malignos.

Figura 12. Análise multivariada PCA. (A) Análise multivariada PCA em amostra de bócio e amostra seus normais adjacentes. Goiter: espectro de amostras de bócio. Adjacent normal: espectro de amostras normal adjacente de bócio. (B) Análise multivariada PCA em amostra de CPT, amostras de bócio e amostra seus normais adjacentes. PTC: espectro de amostras de carcinoma papilífero de tireoide. Goiter: espectro de amostras de bócio. Adjacent normal: espectro de amostras normal adjacente de bócio.



Fonte: O autor.

Tabela 6. Análise discriminante de componente linear principal (PC- LDA). Em A: B (bócio) e NA (normal adjacente). Em B: CPT (carcinoma papilífero de tireoide), B (bócio) e NA (normal adjacente).

A			B			
	NA	B	NA	B	PTC	
NA	15 (100%)	0	NA	14 (93.3%)	1 (6.6%)	0
B	0	21 (100%)	B	2(9.52%)	18 (85.71%)	1 (4.76%)
			CPT	0	1 (4.16%)	23 (95.83%)

Fonte: O autor.

Tabela 7. LOOCV. Em A: B (bócio) e NA (normal adjacente). Em B: CPT (carcinoma papilífero de tireoide), B (bócio) e NA (normal adjacente).

A			B			
	NA	B	NA	B	PTC	
N	15	0	NA	12 (80%)	3 (20%)	0
A	(100%)		B	3 (14.28%)	17 (80.95%)	1 (4.76%)
B	2 (9.52%)	19 (90.47%)	CP	0	3 (12.5%)	21 (87.5%)
			T			

Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

A pesquisa de novos métodos diagnósticos em carcinomas de tireoide para a aplicação em rotina clínica é extremamente relevante, considerando o aumento da incidência destes tumores nos últimos anos e a sua elevada taxa de metástases linfonodais (MEDAS *et al.*, 2020; PARDO *et al.*, 2020). No presente estudo, a expressão dos genes *CCNA1*, *CDKN1C*, *FOS*, *HSPA5*, *JUN*, *KSRI*, *MAP2K6*, *MAPK8IP2* e *SFN* foi avaliada pela técnica de RT-qPCR em amostras de CPT e bócio nodular e comparados com seus tecidos normais adjacentes com o objetivo de identificar marcadores moleculares diagnósticos nestas lesões.

Embora estes nove genes já terem sido propostos como marcadores diagnósticos em um estudo prévio do nosso grupo que avaliou pela PCR *array* a via de sinalização *MAPK/KINASE* utilizando amostras não tumorais como grupo controle (SILVA *et al.*, 2020a), no presente estudo apenas os genes *FOS*, *JUN*, *MAP2K6*, *CCNA1* e *SFN* foram eficazes na identificação de lesões da tireoide, com potencial para serem marcadores tumorais, sendo os genes *FOS* e *JUN* propostos como marcadores moleculares com potencial para identificar lesões tireoidianas e os genes *MAP2K6*, *CCNA1* e *SFN* marcadores moleculares com potencial para a identificação de amostras de CPT.

Os genes *FOS* e *JUN* apresentaram expressão diferencial entre os tecidos de CPT e bócio em relação aos tecidos tireoidianos normais, e na comparação com tecidos tireoidianos normais adjacentes. Os genes *MAP2K6*, *CCNA1* e *SFN* tiveram expressão diferencial entre grupos de amostras de CPT com amostras normais e bócio. Além da via molecular *MAPK/KINASE* estar diretamente envolvida no desenvolvimento do câncer de tireoide, o papel regulador que os genes desta via possuem na proliferação celular, motilidade, apoptose, transcrição, tradução, entre outros, reforçam a importância dos estudos moleculares nesta via (KATZ; ARRIT; YARDEN, 2007; ZABALLOS; SANTISTEBAN, 2017; SILVA *et al.* 2020a).

A expressão reduzida observada em nosso estudo para os genes *FOS* e *JUN* em amostras de CPT e bócio quando comparadas com tecidos normais da tireoide e tecidos normais adjacentes da tireoide indica que ambos são marcadores moleculares promissores para o diagnóstico de alterações da tireoide. A expressão diferencial de *FOS* e *JUN* em amostras de bócio pode indicar um potencial maligno nesses tecidos, sendo necessário o acompanhamento clínico desses pacientes. Além disso, os genes *FOS* e *JUN* são oncogenes e no presente estudo, demonstraram diminuição de expressão em tecidos carcinogênicos, necessitando de uma melhor compreensão de possíveis mutações pontuais que ocasiona a uma regulação

positiva de proto-oncogene e comportamento tumoral agressivo.

FOS e *JUN* são oncogenes e codificam um importante fator de transcrição na via *MAPK/KINASE* chamado AP-1, que participa de processos celulares que incluem crescimento celular, diferenciação e apoptose (XIAO *et al.*, 2019; AMERI *et al.*, 2021). O dímero *FOS-JUN* é a forma mais comum da proteína AP-1 em células humanas, e quando expresso de forma inadequada está relacionado a processos de angiogênese e metástase (XIAO *et al.*, 2019). A superativação de oncogenes é um evento genético crucial em eventos neoplásicos malignos, porém, a regulação positiva de proto-oncogenes devido ao aumento de *copy numbers* ou mutações pontuais parece estar relacionado com um comportamento agressivo (TSIAMBAS *et al.*, 2020). O papel da proteína AP-1 é descrito na via de sinalização de receptores de células T (AMERI *et al.*, 2021), câncer de mama (IVANOVA *et al.*, 2011), porém é pouco explorado em CPT (XIAO *et al.*, 2019). Em carcinomas de tireoide, Liu *et al.* (1999) observaram a expressão reduzida do gene *FOS* em CPT pela técnica de RT-qPCR notando o seu poder como marcador na diferenciação e na manutenção da tireoide. No entanto, Xiao *et al.* (2019) observaram a expressão aumentada da proteína AP-1 em amostras de CPT e relacionaram a expressão desta proteína com o tamanho do tumor, o que pode ser um importante marcador molecular diagnóstico e prognóstico de CPT.

Da mesma forma, foi detectado no presente estudo a redução da expressão dos genes *MAP2K6* em amostras de CPT e bócio em relação aos tecidos normais da tireoide e tecidos normais adjacentes da tireoide. Pertencente à via MAPK, este gene é conhecido por ativar por fosforilação a via p38, que está relacionada a morte celular relacionada ao estresse (RASMUSSEM *et al.*, 2016; KUMAR, PAGE; PETI, 2021). A sua expressão aumentada está relacionada como possível marcador molecular diagnóstico ou prognóstico para diversos tipos de câncer como esofágico, colorretal e a sua expressão reduzida tem sido relacionada com glioblastoma e outros cânceres (PARRAY *et al.*, 2014; RASMUSSEM *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2018). No entanto, estudos envolvendo rearranjos em *MAP2K6* são importantes identificando potenciais alterações da *MAPK* em terapias inibidoras e progressão tumoral (OLSON *et al.*, 2020). Rasmussem *et al.*, (2016) mostram que o gene *MAP2K6* é um alvo para o ativador miR-625-3p e quando este gene foi regulado negativamente promove uma resistência à Oxaplatina. Liu *et al.*, (2018) relataram que a expressão reduzida de *MAP2K6* está significativamente associada a pior sobrevida em glioblastoma, porque esse gene é identificado como um supressor de tumor nesse tipo de câncer. Em lesões de tireóide o nosso estudo foi o primeiro a mostrar expressão reduzida de *MAP2K6* em CPT, indicando que este gene é um marcador molecular promissor para o diagnóstico dessas lesões. Estudos adicionais

devem ser realizados para elucidar a relação desse gene em lesões de tireoide.

O gene *SFN* apresentou expressão aumentada em amostras de CPT em comparação com bócio e tecidos normais, colocando-o como um potencial marcador diagnóstico em CPT. Esse gene codifica uma proteína reguladora da tradução mitótica que pode interromper a progressão do ciclo celular na fase G2/M, desempenhando um papel inibitório nas mutações do DNA na mitose (JIANG *et al.*, 2018; HU *et al.*, 2019). Na literatura, o gene *SFN* é descrito pela regulação de genes-chave que influenciam o início e a progressão do tumor (JIANG *et al.*, 2018). Em vários cânceres tem sido descrita a elevada expressão deste gene, sendo importante biomarcador em adenocarcinomas (SHIBA-ISHII *et al.*, 2015), câncer de mama (BOUDREAU *et al.*, 2013) e câncer de esôfago (REN *et al.*, 2010). Em carcinomas de tireoide, Ito *et al.* (2003) observaram expressão deste gene em CPT agressivo e carcinoma anaplásico. Os autores sugerem que o gene *SFN* está associado à maior agressividade desses carcinomas, sendo um biomarcador de pior prognóstico no CPT. Nossos resultados confirmam os achados de Ito *et al.* (2003) e sugerem o gene *SFN* como marcador diagnóstico desse tipo histológico tumoral, porém, ressaltamos a importância de mais estudos na população brasileira.

Os resultados da análise de expressão do gene *CDKN1C* descartou a hipótese deste gene ser considerado um potencial marcador molecular como sugerido em nosso estudo anterior (Silva *et al.*, 2020a). O gene *CDKN1C*, localizado em humanos no cromossomo 11p15, é descrito como supressor tumoral (LI *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2020a) e associado a regulação negativa da proliferação celular (IMAIZUMI *et al.*, 2020; SUNTHARALINGHAM *et al.*, 2019). O controle da transcrição de *CDKN1C* é associado a mecanismos de metilação do DNA e modificação pós-tradução de acetilação de histonas, contribuindo para o remodelamento da cromatina em seu promotor (STAMPONE *et al.*, 2018). Alteração no *locus* deste gene está associada a Síndrome de Beckwith-Wiedemann, cuja característica inclui macrossomia e risco elevado de câncer infantil, principalmente nas adrenais (IMAIZUMI *et al.*, 2020; SUNTHARALINGHAM *et al.*, 2019). Para o nosso conhecimento, um estudo prévio do nosso grupo foi o único que avaliou a expressão do gene *CDKN1C* em câncer de tireoide e sugeriu este gene como marcador molecular preditivo de acometimento de linfonodo em CPT (SILVA *et al.*, 2020a). Ressalta-se a importância de novos estudos em maior número amostral em carcinomas de tireoide para elucidar o papel desse gene na carcinogênese tireoidiana.

A expressão diferencial observada neste estudo para o gene *CCNA1* na comparação entre CPT com bócio e amostras normais, com aumento de expressão deste gene em amostras

de CPT em relação a ambos os grupos, permitiu relacioná-lo com o papel diagnóstico em CPT. O gene *CCNA1* codifica a proteína Ciclina A1 pertencente à família das proteínas quinases dependentes, importante na regulação e controle da progressão do ciclo celular e essenciais para a replicação do DNA (RADONOVA *et al.*, 2020). Este gene desempenha um papel importante na fase M do ciclo celular e promove a progressão do ciclo celular ativando CDK1 e CDK2 (KHAJA *et al.*, 2013; MUNARI *et al.*, 2015). Em nosso estudo anterior, foi evidenciado o potencial diagnóstico desse gene e da proteína Ciclina A1 em tumores primários de CPT (SILVA *et al.*, 2020b). Na literatura, *CCNA1* é relacionado com progressão e invasão tumoral (KHAJA *et al.*, 2013; MUNARI *et al.*, 2015). Khaja *et al.* (2013) observaram a expressão elevada do gene *CCNA1* em tumores primários de mama e linfonodos quando comparados ao tecido normal adjacente dessas mesmas pacientes. Munari *et al.* (2015) observaram a elevada expressão da proteína Ciclina A1 em carcinoma urotelial de bexiga e esclareceram o papel molecular desta proteína na progressão desses carcinomas. Ressaltamos a importância de novos estudos com o gene *CCNA1* em carcinomas de tireoide com o objetivo de elucidar o papel desse gene na carcinogênese tireoidiana.

Em nosso estudo, também analisamos a expressão da proteína codificada pelo gene *CCNA1*, Ciclina A1, em CPT e lesões de bócio por meio da técnica de IHC para verificar o potencial diagnóstico dessa proteína. Foi possível observar a intensidade da imunexpressão da proteína Ciclina A1 de médio-moderado, tendendo a moderado nas amostras de CPT e imunexpressão média-moderada, tendendo a moderada no grupo do bócio. Os resultados observados não foram estatisticamente significativos provavelmente pelo reduzido número amostral nos grupos analisados, e demonstram a maior sensibilidade da técnica de análise de expressão gênica (RT-qPCR) em relação a análise de IHC, que validou os resultados do nosso estudo prévio (SILVA *et al.*, 2018) em relação ao potencial diagnóstico do gene *CCNA1* (Apêndice 2). Porém, os resultados da análise proteica validam o estudo prévio de nosso grupo (SILVA *et al.*, 2018) e afirmam a validação diagnóstica observada no presente estudo.

A técnica de IHC é a mais utilizada na rotina clínica para a identificação da expressão proteica em tumores, uma vez que as proteínas podem ser utilizadas como alvos de marcadores celulares. Na literatura, existe um único estudo (Liu *et al.*, 2013) que analisou a imunexpressão da Ciclina A1 com o objetivo de avaliar o potencial diagnóstico em linhagem de células em CPT. Neste estudo foi observada a superexpressão da Ciclina A1 em linhagem celular de CPT quando comparada com a linhagem das células *HEK293* pela técnica de IHC. Este resultado foi correlacionado com o aumento da expressão do gene *PITX2*, e os autores sugeriram que o gene *CCNA1* é regulado pelo gene *PITX2*, sendo este um importante

mecanismo de controle celular de genes pertencentes as duas principais vias de sinalização *MAPK/KINASE* e *WNT* dos tumores de tireoide.

A análise por espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier, permite de forma rápida, simples e poderosa a análise de perfis bioquímicos da amostra avaliada, sendo aplicável de forma mais favorável no ambiente clínico quando comparado com astécnicas de expressão gênica e IHC (SILVA *et al.*, 2020b). A técnica FTIR é descrita na literatura pela aplicação em diagnóstico de câncer de ovário (LI *et al.*, 2018), diagnóstico de AIDS (SITOLE *et al.*, 2014) e no diagnóstico de lesões de tireoide (ZENG *et al.*, 2007;ZHANG *et al.*, 2015; MARTINEZ-MARIN *et al.*, 2017).

No presente estudo foi possível observar espectros relativos aos ácidos nucleicos (1077cm^{-1} , 1080cm^{-1} , 1236cm^{-1}), proteínas (1452cm^{-1} , 1533cm^{-1} , 1636cm^{-1}) e lipídios (1742cm^{-1} , 1750cm^{-1} , 2855cm^{-1} , 2858cm^{-1} , 2920cm^{-1} , 2923cm^{-1} , 2956cm^{-1} , 3286cm^{-1}) (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008; ZHANG *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2016; DEPCIUCH *et al.*, 2018), apresentando aumento de intensidade nas bandas referente aos ácidos nucleicos em amostras de CPT quando comparadas com amostras de bócio e seus normais adjacentes. A maioria dos espectros das amostras normal adjacente de bócio (93.3%), espectros de bócio (85.71%) e espectros de CPT (95.83%) puderam ser distinguidos e classificados conforme a histologia. O fato dos tecidos benignos não terem sido distinguidos em sua totalidade com 100% na classificação pode ser em razão da presença de infiltrado tumoral nos tecidos benignas.

Estudos anteriores mostraram aplicações biomédicas do FTIR (SILVA *et al.*, 2020a; SITOLE *et al.*, 2014), incluindo o diagnóstico de lesões da tireoide (ZENG *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2015; MARTINEZ-MARIN *et al.*, 2017). Zeng *et al.* (2007) diferenciaram carcinomas de tireoide de tecidos benignos usando FTIR e observaram que o tecido maligno apresenta variação nas bandas amida I e amida II correspondentes devido à alteração estrutural da proteína e que a quantidade de lipídios foi reduzida nos tecidos malignos. Os autores concluíram que a análise por espectroscopia FTIR foi uma abordagem confiável e prática para o diagnóstico dessa malignidade. Zhang *et al.*, (2015) analisaram o perfil espectral pré-operatório por espectroscopia FTIR em amostras de CPT com o objetivo de comparar e confirmar o diagnóstico histológico. Para realizar o estudo, os autores utilizaram 111 tecidos de pacientes submetidos à operação cirúrgica (41 CPT, 70 de bócio e 50 amostras de voluntários saudáveis) e observaram diferença espectral nas bandas correspondentes a lipídios, DNA e proteínas, discriminando CPT com 88,8 % precisão. Os resultados concluíram que a análise de FTIR é viável para rastreamento rápido e não invasivo dessas

lesões, podendo auxiliar no diagnóstico desses tumores.

Martinez-Marin *et al* (2017) usaram a espectroscopia FTIR para analisar em 20 pacientes a diferença espectral do CFT e CPT variante folicular e demonstraram o potencial desta técnica como uma nova ferramenta para auxiliar a histopatologia na distinção entre CFT e CPT variante folicular, além de ressaltar a importância criteriosa para a seleção da área de interesse na análise espectral, maximizando o poder da metodologia, possibilitando que seja uma abordagem focada e eficiente quando aliada ao método histopatológico.

Nosso estudo contribui para as evidências que apoiam o desenvolvimento da espectroscopia por FTIR como uma ferramenta de diagnóstico em câncer de tireoide, além de explorar pela técnica de RT-qPCR diagnósticos moleculares precisos para confirmação dos resultados da técnica FTIR, entretanto, é necessário estudos adicionais com maior número amostral para confirmar estes resultados.

7 CONCLUSÃO

A expressão dos genes *CCNA1*, *SFN*, *JUN*, *KSRI*, *MAPK2K6*, *HSPA5*, *MAPK81P2*, *CDKN1C* e *FOS* foram analisados pela técnica de RT-qPCR em cinco análises para confirmar o potencial diagnóstico desses genes. No qual os genes *FOS* e *JUN* foram eficazes na identificação de lesões tireoidianas e os genes *MAP2K6*, *CCNA1* e *SFN* são propostos como marcadores moleculares com potencial para a identificação de amostras de CPT.

Os resultados obtidos pela análise da Ciclina A1 demonstra o seu potencial para o diagnóstico de CPT, entretanto, é necessário estudos adicionais com maior número amostral para confirmar estes resultados.

A comparação entre os resultados da expressão do gene *CCNA1* obtidos pela RT-qPCR com os obtidos pela expressão da proteína Ciclina A1, confirmam o potencial como marcadores moleculares para a identificação de amostras de CPT.

A análise por espectroscopia FTIR foi capaz de distinguir tecidos normais, bócio e CPT com alta sensibilidade. Assim, o presente estudo indica que a análise molecular dos genes *FOS*, *JUN*, *MAP2K6*, *CCNA1* e *SFN* e a espectroscopia FTIR possuem potencial para aplicações clínicas no diagnóstico de câncer e lesões de tireoide.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, Mardiaty Iryani *et al.* Papillary thyroid cancer: genetic alterations and molecular biomarker investigations. **International journal of medical sciences**, v. 16, n. 3, p. 450, 2019.
- AHN, S. H.; PARK, S. Y.; CHOI, S. I. Comparison of Consecutive Results from Fine Needle Aspiration and Core Needle Biopsy in Thyroid Nodules. **Endoc Pathol**, v.28, n. 4, p. 332-338, 2017.
- ALLEN, Evan; FINGERET, Abbey. Anatomy, head and neck, thyroid. **StatPearls [Internet]**, 2020.
- AL-SUHAIMI, E. *et al.* Functions of stem cells of thyroid glands in health and disease. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 20, n. 2, p. 187-195, 2019.
- AMERI, M *et al.* A network-based approach to identify key genes between follicular thyroid cancer and follicular thyroid adenoma. **Gene Reports**, v. 23, p. 101075, 2021.
- BIAN, S. miR-4319 inhibited the development of thyroid cancer by modulating FUS-stabilized SMURF1. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 121, n. 1, p. 174–182, 2020.
- BOUDREAU, Aaron *et al.* 14-3-3 σ stabilizes a complex of soluble actin and intermediate filament to enable breast tumor invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.110, n. 41, p. E3937-E3944, 2013.
- BRITO, J. P.; HAY, I. D. Management of Papillary Thyroid Microcarcinoma. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 48, n. 1, p. 199–213, 2019.
- BU, R. *et al.* Telomerase reverse transcriptase mutations are independent predictor of disease-free survival in Middle Eastern papillary thyroid cancer. **International Journal of Cancer**, v. 142, n.10, p. 2028–2039, 2018.
- BUROTTO, M. *et al.* The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. **Cancer**, v.120, n.22, p.3446-3456, 2014.
- CAO, L. Z. *et al.* The relationship between iodine intake and the risk of thyroid cancer: A meta- analysis. **Medicine (Baltimore)**, v.96, n. 20, 2017.
- CAN, *et al.* Goiter. **StatPearls [Internet]**, 2020.
- CHAN, Y. X. *et al.* Lower TSH and higher free thyroxine predict incidence of prostate but not breast, colorectal or lung cancer. **Eur J Endocrinol.**, v. 177, n. 4, p. 297-308, 2017.
- CHANG, Young Woo *et al.* Significance of micrometastases in the calculation of the lymph node ratio for papillary thyroid cancer. **Annals of surgical treatment and research**, v. 92, n. 3, p. 117-122, 2017.
- CHMIELIK, Ewa *et al.* Heterogeneity of thyroid cancer. **Pathobiology**, v. 85, n. 1-2, p. 117-129, 2018.

- CHOU, C. K. et al. IRAK1, a Target of miR-146b, Reduces Cell Aggressiveness of Human Papillary Thyroid Carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, v.101, n.11, p.4357-4366, 2016.
- CITTERIO, C. *et al.* The role of thyroglobulin in thyroid hormonogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 6, p. 323-338, 2019.
- DAI, X. et al. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. **J Cancer**, v.7, n.10, p.1281-94, 2016.
- DAS, K. et al. FTIR of touch imprint cytology: A novel tissue diagnostic technique. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.92, p.160-164, 2008.
- DEPCIUCH, Joanna et al. Spectroscopic analysis of normal and neoplastic (WI-FTC) thyroid tissue. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 204, p. 18-24, 2018.
- DO, S. I. et al. Predictive Value of Sphingosine Kinase 1 Expression in Papillary Thyroid Carcinoma. **Anticancer Res**, v.37, n.10, p.5399-5405, 2017.
- ELMI, F. et al. Application of FT-IR spectroscopy on breast cancer serum analysis. **SpectrochimActa A Mol Biomol Spectrosc**, v.5, n.187, p.87-91, 2017.
- FU, X. M. et al. The expression and function of long noncoding RNA lncRNA-ATB in papillarythyroid cancer. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v.21, n.14, p. 3239-3246, 2017.
- FUZIWARA, C. S. et al. The highly expressed FAM83F protein in papillary thyroid cancer exerts a pro-oncogenic role in thyroid follicular cells. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. MAR, p. 1–13, 2019.
- GUNDA, Viswanath et al. Inhibition of MAPKinase pathway sensitizes thyroid cancer cells to ABT-737 induced apoptosis. **Cancer letters**, v. 395, p. 1-10, 2017.
- HAUGEN, B. R. et al. 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.
- HE, L. et al. Effects of insulin analogs and glucagon-like peptide-1 receptor agonists on proliferation and cellular energy metabolism in papillary thyroid cancer. **Onco Targets Ther**, v.24, n.10, p. 5621-5631, 2017.
- HOLZER, K.; BARTSCH, D. K. Nodular goiter. **Chirurg.** , v. 91, n. 9, p. 712-719, 2020.
- HSU, Y. C. et al. Is papillary thyroid microcarcinoma a biologically different disease? A propensity score-matched analysis. **Journal of Surgical Oncology**, v. 120, n. 6, p. 1023–1030, 2019.
- HU, Y. J. *et al.* Characterization and significance of MUC1 and c-myc expression in elderly patients with papillary thyroid carcinoma. **Genet Mol Res**, v.14, n.4, p.15325-30, 2015.
- HU, Y. et al. Expression profile and prognostic value of SFN in human ovarian cancer.

Biosciencereports, v. 39, n. 5, 2019.

HU, J. et al. Expressions of miRNAs in papillary thyroid carcinoma and their associations with the clinical characteristics of PTC. **Cancer Biomarkers**, v. 18, n. 1, p. 87–94, 2017.

HUK, D. J. et al. Deletion of Rap1b, but not Rap1a or Epac1, Reduces Protein Kinase A-Mediated Thyroid Cancer. **Thyroid**, v. 28, n. 9, p. 1153–1161, 2018.

IMAIZUMI, Y. et al. Role of the imprinted allele of the Cdkn1c gene in mouse neocortical development. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2020**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2019.

IVANOVA, M. et al. Tamoxifen increases nuclear respiratory factor 1 transcription by activating estrogen receptor β and AP-1 recruitment to adjacent promoter binding sites. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 4, p. 1402-1416, 2011.

ITO, Y. *et al.* 14-3-3 σ possibly plays a constitutive role in papillary carcinoma, but not in follicular tumor of the thyroid. **Cancer Letters**, v. 200, p. 161-166, 2003.

JIANG, X. et al. Chemopreventive activity of sulforaphane. **Drug design, development and therapy**, v. 12, p. 2905, 2018.

JASIN, S.; OZSARI, L.; HABRA, M.A. Multikinase inhibitors use in differentiated thyroid carcinoma. **Biologics: Targets and Therapy**, v.8, p. 281-291, 2014.

KATZ, M.; ARRIT, I.; YARDEN, Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. **Biochim Biophys Acta**, v.1773, n.8, p.1161-1176, 2007.

KHAJA, A. S. et al. Cyclin A1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor and promotes hormone-dependent growth and angiogenesis of breast cancer. **PLoS One**, v. 8, n.8, p. e72210, 2013.

KIM, S-W.; ROH, J.; PARK, C-S. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. **Journal of Pathology and Translational Medicine**, v. 50, p. 411-418, 2016.

KONDROTIENÉ, A. et al. Plasma-Derived miRNA-222 as a candidate marker for papillary thyroid cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6445, 2020.

KRAVCHENKO, Victor I. *et al.* Association between thyroid hormone status and trace elements in serum of patients with nodular goiter. **Biological trace element research**, v.196, n. 2, p. 393–399, 2020.

KUMAR, G. S.; PAGE, R.; PETI, W. The interaction of p38 with its upstream kinase MKK6. **Protein Science**, v. 4, p.908-913, 2021.

KURE, S.; WADA, R.; NAITO, Z. Relationship between genetic alterations and clinicopathological characteristics of papillary thyroid carcinoma. **Medical Molecular**

- Morphology**, v. 52, n. 4, p. 181–186, 2019.
- KYRILLI, A. et al. Commentary: Thyrotropin Stimulates Differentiation Not Proliferation of Normal Human Thyrocytes in Culture. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v.25, p.8-214, 2017.
- LA, Y. et al. Single nucleotide polymorphisms in SLC5A1, CCNA1, and ABCC1 and the association with litter size in small-tail Han sheep. **Animals**, v. 9, n. 7, p. 432, 2019.
- LAN, X. et al. Downregulation of long noncoding RNA H19 contributes to the proliferation and migration of papillary thyroid carcinoma. **Gene**, v. 646, p. 98–105, 2018.
- LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. **Elsevier**, v.141, n.7, p.1117-34, 2010.
- LEWIS, P. D. et al. Evaluation of FTIR Spectroscopy as a diagnostic tool for lung cancer using sputum. **BMC Cancer**, v.23, n.10, p.640, 2010.
- LI, et al. Characterization of ovarian cancer cells and tissues by Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of ovarian research**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2018.
- LI, Q. B. et al. In vivo and in situ detection of colorectal cancer using Fourier transform infrared spectroscopy. **World J Gastroenterol**, v.11, n.3, p.327-30, 2005.
- LI, X. et al. TBX3 promotes proliferation of papillary thyroid carcinoma cells through facilitating PRC2-mediated p57 KIP2 repression. **Oncogene**, v. 37, n. 21, p. 2773-2792, 2018.
- LIN, P. et al. The role of TAK1 expression in thyroid cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 11, p. 14449, 2015.
- LIU, G et al. Screening of Specific Changes in mRNAs in Thyroid Tumors by Sequence Specific Differential Display Decreased Expression of c-fos mRNA in Papillary Carcinoma. **Endocrine journal**, v. 46, n. 3, p. 459-466, 1999.
- LIU, Y. et al. Cyclin A1 a transcriptional target of PITX2 and overexpressed in papillary thyroid carcinoma. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 384, p. 221-227, 2013.
- LIU, H. et al. Comparison of red blood cells from gastric cancer patients and healthy persons using FTIR spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v.1130, p.33-37, 2017.
- LIU, C. et al. Correction: Mixed subtype thyroid cancer: A surveillance, epidemiology, and end results database analysis. **Oncotarget**, v. 9, n. 22, p. 16274–16274, 2018.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.
- LÓPEZ, J. I.; ZABALA, R.; CURA, J. D. del. Histological Diagnosis of Thyroid Disease Using Ultrasound-Guided Core Biopsies. **European Thyroid Journal**, v.2, n.1, p.29-36, 2013.
- MARINA, M. et al. Size of thyroid carcinoma by histotype and variants: A population-based

study in a mildly iodine-deficient area. **Head Neck**, v.39, n.10, p.2095-2103, 2017.

MANSOUR, J. *et al.* Prognostic value of lymph node ratio in metastatic papillary thyroid carcinoma. **Journal of Laryngology and Otology**, v. 132, n. 1, p. 8–13, 2018.

MARTINEZ-MARIN, D. *et al.* Accounting for tissue heterogeneity in infrared spectroscopic imaging for accurate diagnosis of thyroid carcinoma subtypes. **Vibrational Spectroscopic**, v. 91, p.77-82, 2017.

MAYSON, S. E. *et al.* Molecular diagnostic evaluation of thyroid nodules. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, v. 48, n. 1, p. 85-97, 2019.

MCNEILL, R. E. *et al.* Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer. **BMC molecular biology**, v. 8, p. 1-13, 2007.

MEDAS, Fabio *et al.* Predictive factors of lymph node metastasis in patients with papillary microcarcinoma of the thyroid: Retrospective analysis on 293 cases. **Frontiers in Endocrinology**, v.11, p. 551, 2020.

MEDEIROS-NETO, G.; RUBO, I. G. S. Multinodular goiter. *In*: FEINGOLD, K.R. *et al.* **Endotext. s.l**: MDText, 2016.

MELO, D. H. Y. *et al.* Expression of cancer/testis antigens MAGE-A, MAGE-C1, GAGE and CTAG1B in benign and malignant thyroid diseases. **Oncol Lett**, v.14, n.6, p.6485-6496, 2017.

MISIAKOS, E. P. *et al.* Cytopathologic diagnosis of fine needle aspiration biopsies of thyroid nodules. **World J Clin Cases**, v.4, n.2, p.38-48, 2016.

MOGHADDAM, P.A. *et al.* Five Top Stories in Thyroid Pathology. **Arch Pathol Lab Med**, v.140, n.2, p.158-70, 2016.

MOVASAGHI, Z; REHMAN, S; REHMAN, I. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 134-179, 2008.

MUNARI, E. *et al.* Cyclin A1 expression predicts progression in pT1 urothelial carcinoma of bladder: a tissue microarray study of 149 patients treated by transurethral resection. **Histopathology**, v. 66, n. 2, p. 262-269, 2015.

MUSA, I. R. *et al.* Predictors of a follicular nodule (Thy3) outcome of thyroid fine needle aspiration cytology among Saudi patients. **BMC Res Notes**, v.10, n.1, p.612, 2017.

NAMBRON, Rajasree; ROSENTHAL, Richard; BAHL, Deepti. Diagnosis and Evaluation of Thyroid Nodules-the Clinician's Perspective. **Radiologic Clinics**, v. 58, n. 6, p. 1009-1018, 2020.

NIMMAGADDA, A. *et al.* Unusual Metastases in Papillary Microcarcinoma of Thyroid. **Indian Journal of Nuclear Medicine**, n. 4, p. 359–362, 2019.

OLSON, Nicholas et al. Molecular Characterization of a Rare Dedifferentiated Liposarcoma With Rhabdomyosarcomatous Differentiation in a 24 Year Old. **International journal of surgical pathology**, v. 28, n. 4, p. 454-463, 2020.

OSPINA, N. S. *et al.* Thyroid nodules: diagnostic evaluation based on thyroid cancer risk assessment. **BMJ**, v. 368, 2020.

PARDO, J. R. *et al.* Risk Factors of Metastatic Lymph Nodes in Papillary Thyroid Microcarcinoma. **Cirugía Española**, v. 98, n. 4, p. 219–225, 2020.

PARRAY, A. A et al. MKK6 is upregulated in human esophageal, stomach, and colon cancers. **Cancer Investigation**, v. 8, p. 416-22, 2014.

PAN, D. H. *et al.* The diagnostic and prognostic values of Ki-67/MIB-1 expression in thyroid cancer: a meta-analysis with 6,051 cases. **Onco Targets Ther**, v.10, p.3261-3276, 2017.

PENNA, G. C. Molecular Markers Involved in Tumorigenesis of Thyroid Carcinoma: Focus on Aggressive Histotypes. **Cytogenetic an Genome Research**, v. 150, p. 194-207, 2017.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time rt-pcr. **NucleicAcids Res**, v.29, n.9, p.45, 2001.

RAMÍREZ-MOYA, J. et al. ADAR1-mediated RNA editing is a novel oncogenic process in thyroid cancer and regulates miR-200 activity. **Oncogene**, v. 39, n. 18, p. 3738–3753, 2020.

RANGEL-POZZO, Aline *et al.* Genetic landscape of papillary thyroid carcinoma and nuclear architecture: An overview comparing pediatric and adult populations. **Cancers**, v. 12, n. 11, p. 3146, 2020.

RASMUSSEN, M. H. et al. MiR-625-3p regulates oxaliplatin resistance by targeting MAP2K6-p38 signalling in human colorectal adenocarcinoma cells. **Nature Communications**, v. 7, p. 1-7, 2016.

RAZAVI, S. A. et al. Circulating levels of PTEN and KLLN in papillary thyroid carcinoma: can they be considered as novel diagnostic biomarkers? **Endocrine**, v. 57, n. 3, p. 428-435, 2017.

RADONOVA, L. et al. Cyclin A1 in Oocytes Prevents Chromosome Segregation And AnaphaseEntry. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.

REN, H. et al. Reduced stratifin expression can serve as an independent prognostic factor for poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Digestive diseases and sciences**, v. 55, n. 9, p. 2552-2560, 2010.

RYMSZA, T. et al. Human papillomavirus detection using PCR and ATR-FTIR for cervical cancer screening. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 196, p. 238-246, 2018.

RONEN, Ohad *et al.* Case for staged thyroidectomy. **Head & Neck**, v. 42, n. 10, p. 3061-3071, 2020.

SAKR, H. I. et al. cMYC expression in thyroid follicular cell derived carcinomas: a role in thyroidtumorigenesis. **Diagn Pathol**, v.12, n.1, p.17, 2017.

SANCISI, V. et al. Runx2 Isoform I Controls a Panel of Proinvasive Genes Driving Aggressiveness of Papillary Thyroid Carcinomas. **J Clin Endocrinol Metab**, v.97, n.10, p.2006-15, 2012.

SHAO, L. et al. Lon non-coding RNA AGAP2-AS1 increases the invasiveness of papillary thyroid cancer. **Aging (Albany NY)**, v.12, n.18, p. 18019-18032, 2020.

SHEIKHOLESLAMI, S. et al. NOL4 is downregulated and hyper-methylated in papillary thyroid carcinoma suggesting its role as a tumor suppressor gene. **International Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n. 4, 2020.

SHIBA-ISHII, A. et al. Stratifin accelerates progression of lung adenocarcinoma at an early stage. **Molecular cancer**, v. 14, n. 1, p. 1-6, 2015.

SILVA, Raissa Monteiro et al. ATR-FTIR spectroscopy and CDKN1C gene expression in the prediction of lymph nodes metastases in papillary thyroid carcinoma. **Spectrochimica Acta PartA: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 228, p. 117693, 2020a.

SILVA, et al. CCNA1 gene as a potential diagnostic marker in papillary thyroid cancer. **Acta Histochemica**, v. 122, 2020b.

SILVA, et al. Poder diagnóstico de genes da via MAPK/ERK em lesões de tireoide. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 22; ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 18; ENCONTRO DE INICIAÇÃO À DOCÊNCIA, 8. São José dos Campos, 2018. **Anais...**, São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2018, p. 1-6.

SIQUEIRA, L. F. S.; LIMA, K. M. G. A decade (2004 – 2014) of FTIR prostate cancer spectroscopy studies: An overview of recent advancements. **Trends in Analytical Chemistry**, v.82, p.208-221, 2016.

SITOLE, et al. Mid-ATR-FTIR spectroscopic profiling of HIV/AIDS sera for novel systems diagnostics in global health. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 18, n. 8, p. 513-523, 2014.

STAMPONE, E. et al. Genetic and epigenetic control of CDKN1C expression: importance in cellcommitment and differentiation, tissue homeostasis and human diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 4, p. 1055, 2018.

SUNTHARALINGHAM, Jenifer P. et al. Analysis of CDKN1C in fetal growth restriction and pregnancy loss. **F1000Research**, v. 8, 2019.

SURACE, M. et al. Automated Multiplex Immunofluorescence Panel for Immuno-oncology Studies on Formalin-fixed Carcinoma Tissue Specimens. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 143, 2019.

- TANG, Haili et al. Growth factor receptor bound protein-7 regulates proliferation, cell cycle, and mitochondrial apoptosis of thyroid cancer cells via MAPK/ERK signaling. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 472, n. 1, p. 209-218, 2020.
- TSIAMBAS, Evangelos et al. c-Jun/c-Fos complex in laryngeal squamous cell carcinoma. **J BUON**, v. 252, n. 2, p. 618-620, 2020.
- UPADHYAYA, A. et al. Effects of first radioiodine ablation on functions of salivary glands in patients with differentiated thyroid cancer. **Medicine (Baltimore)**, v. 96, n. 25, p. 1-9, 2017.
- WANG, J. R. et al. Expression of MMP-13 is associated with invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v.17, n.4, p.427-35, 2013.
- WANG, L. et al. Overexpression miR-211-5p hinders the proliferation, migration, and invasion of thyroid tumor cells by downregulating SOX 11. **J Clin Lab Anal**, v. 32, n. 3, p. e22293, 2018.
- WANG, Y. et al. MicroRNA-384 Inhibits the Progression of Papillary Thyroid Cancer by Targeting PRKACB. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.
- WALD, Noémie et al. Identification of melanoma cells and lymphocyte subpopulations in lymph node metastases by FTIR imaging histopathology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Basis of Disease**, v. 1862, n. 2, p. 202-212, 2016.
- WU, M. et al. Intraoperative diagnosis of thyroid diseases by fourier transform infrared spectroscopy based on support vector machine. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 9, p. 2351–2358, 2016.
- XIA, Lu *et al.* Identifying benign and malignant thyroid nodules based on blood serum surface-enhanced Raman spectroscopy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 32, p. 102328, 2021.
- XIAO, C et al. Expression of activator protein-1 in papillary thyroid carcinoma and its clinical significance. **World journal of surgical oncology**, v. 17, n. 1, p. 1-5, 2019.
- XING, M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. **Nat Rev Cancer**, v.13, n.3, p. 184-99, 2013.
- XUE, G. et al. Identification of key genes of papillary thyroid carcinoma by integrated bioinformatics analysis. **Bioscience Reports**, v. 40, n. 8, 2020.
- YAEGGER, R.; CORCORAN, R. B. Targeting alterations in the RAF–MEK pathway. **Cancer Discovery**, v. 9, n. 3, p. 329–341, 2019.
- YILDIRIM, I. *et al.* Review of Factors Contributing to Nodular Goiter and Thyroid Carcinoma. **Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre**, v. 29, n.1, p. 1–5, 2020.
- YIN, Y. et al. MiR-195 Inhibits Tumor Growth and Metastasis in Papillary Thyroid Carcinoma Cell Lines by Targeting CCND1 and FGF2. **Int J Endocrinol**, 2017.

- YU, Shi-Tong et al. CRLF1 promotes malignant phenotypes of papillary thyroid carcinoma by activating the MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways. **Cell death & disease**, v. 9, n. 3, p. 1-13, 2018.
- YU, Jinhua *et al.* Lymph node metastasis prediction of papillary thyroid carcinoma based on transfer learning radiomics. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2020.
- ZABALLOS, M. A.; SANTISTEBAN, P. Key signaling pathways in thyroid cancer. **J Endocrinol**, v.235, n.2, 2017.
- ZANCLA, Andrea et al. Micro-FTIR spectroscopy as robust tool for psammoma bodies detection in papillary thyroid carcinoma. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 229, p. 117984, 2020.
- ZELLA, M. A. K. et al. Prognostic significance of CD133 and ABCB5 expression in papillary carcinoma. **European Journal of Histochemistry**, v. 64, n. 4, 2020.
- ZENG, X. T. *et al.* FTIR spectroscopic explorations of freshly resected thyroid malignant tissues. **Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi**, v. 12, p. 2422-6, 2007.
- ZHAN, S. et al. Quantitative Proteomics Analysis of Sporadic Medullary Thyroid Cancer Reveals FN1 as a Potential Novel Candidate Prognostic Biomarker. **The Oncologist**, v. 23, n. 12, p. 1415–1425, 2018.
- ZHANG, W. *et al.* Noninvasive surface detection of papillary thyroid carcinoma by Fourier transform infrared spectroscopy. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 31, p. 198-202, 2015.
- ZHANG, X. et al. Intraoperative Detection of Thyroid Carcinoma by Fourier Transform Infrared Spectrometry. **Journal of Surgical Research**, v. 171, p.650-656, 2011.
- ZHANG, Y. Positive Feedback Loops between NrCAM and Major Signaling Pathways Contribute to Thyroid Tumorigenesis. **J Clin Endocrinol Metab**, v.102, n.2, p. 6013-624, 2016.
- ZHANG, H. et al. Clinical significance of eukaryotic translation initiation factor 5A2 in papillary thyroid cancer. **Bioengineered**, v. 11, n. 1, p. 1325-1333, 2020.
- ZHANG, D. et al. Plasma lncRNA GAS8-AS1 as a Potential Biomarker of Papillary Thyroid Carcinoma in Chinese Patients. **Int J Endocrinol**, doi: 10.1155/2017/2645904. Epub 2017 Jul 11, 2017.
- ZHOU, C. et al. Association of BRAF gene and TSHR with cervical lymph node metastasis of papillary thyroid microcarcinoma. **Oncology Letters**, v. 17, n. 1, p. 183–194, 2019.

ANEXO 1



São Paulo, 10 de janeiro de 2018

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o Instituto do Câncer do Estado de São Paulo está ciente e concorda em participar do estudo colaborando com a transferência de amostras armazenadas em Biobanco da Rede Acadêmica de Pesquisa sobre o Câncer da Universidade de São Paulo (USP) para o estudo "SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO DE GENES DA VIA *MAPK/KINASE* NO DESENVOLVIMENTO DOS TUMORES DE TIREOIDE" do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D, Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP, sob responsabilidade da pesquisadora, Prof. Dr. Renata de Azevedo Canevari.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Roger Chammas", is written over a horizontal line.

Prof. Dr. Roger Chammas

Coordenador

Centro de Investigação Translacional em Oncologia

Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

Prof. Dr. Roger Chammas

Coordenador

Centro de Investigação Translacional em Oncologia

Instituto do Câncer do Estado de São Paulo



ANEXO 2

UNIVERSIDADE DO VALE DO
PARAÍBA - UNIVAP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO DE GENES DA VIA MAPK/KINASE NO DESENVOLVIMENTO DOS TUMORES DE TIREÓIDE

Pesquisador: Renata de Azevedo Canevari

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 91586318.7.1001.5503

Instituição Proponente: Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.741.302

Apresentação do Projeto:

Este projeto trata-se de uma parte do estudo intitulado "Caracterização molecular e bioquímica de lesões da tireóide para diagnóstico clínico", já avaliado e aprovado pelo CEP. Busca analisar marcadores como ferramenta para diagnóstico e tratamento de lesões da tireóide. É de enorme importância na área.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos estão bem claros e definidos como primário e secundários, de acordo com a proposta apresentada. Objetivo primário: "Este estudo tem como objetivo melhorar a competência clínica na identificação de CPT e bócio multinodular pela análise da expressão de genes da via MAPK/KINASE, detectados previamente estar diferencialmente expressos nestas lesões, e correlacioná-los com as características clinicopatológicas dos pacientes."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos, em especial referentes a quebra de sigilo e confidencialidade, foram bem descritos. Os benefícios foram delineados de forma adequada ao estudo proposto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto trata de uma importante medida que pode auxiliar no diagnóstico de carcinoma

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911

Bairro: Urbanova

CEP: 12.244-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-1111

Fax: (12)3947-1149

E-mail: cep@univap.br

UNIVERSIDADE DO VALE DO
PARAÍBA - UNIVAP



Continuação do Parecer: 2.741.302

papilífero da tireóide, que quando correlacionado às características clinicopatológicas pode determinar o potencial de invasibilidade tumoral, ajudando no diagnóstico e tratamento desses pacientes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A documentação necessária foi apresentada. Solicitou dispensa de TCLE tendo como justificativa: "Na metodologia e no desenho da pesquisa descreve-se que serão utilizadas apenas amostras obtidas do Biobanco do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo. Deste modo, a projeto submetido a esta análise dispensa o TCLE."

Recomendações:

O projeto foi bem descrito. Sua proposta atende as exigências éticas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto foi bem descrito. Sua proposta atende as exigências éticas.

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP-Univap alerta que, segundo a Resolução 466/12 (item XI), cabe ao pesquisador "elaborar e apresentar os relatórios parciais e final", sendo esta uma responsabilidade "indelével e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais". A Resolução 510/16, no art. 28, V, reforça que cabe ao pesquisador "apresentar no relatório final que o projeto foi desenvolvido conforme delineado, justificando, quando ocorridas, a sua mudança ou interrupção."

Segundo a carta circular n. 0226/CONEP/CNS, de 2010, o relatório final deve incluir:

- Dados do projeto: Registro CONEP e
- Título do Projeto e Dados dos participantes: total de participantes recrutados, incluídos, selecionados, excluídos, retirados/descontinuados, concluintes (em cada centro, se for o caso, e no total). Ocorrendo participantes retirados/descontinuados, indicar principais razões disto. Ocorrendo "eventos sérios", indicar as condutas adotadas. Se houve pedido de indenização por danos causados por este estudo, indicar qual o dano e conduta tomada.

CEP-Univap - (12) 3947-1111 - <http://web.univap.br/cep/>

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Declaração de Pesquisadores	Carta_projetoguardachuva2018.docx	26/06/2018 10:00:25	Mauricio Martins Alves	Aceito

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911
 Bairro: Urbanova CEP: 12.244-000
 UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS
 Telefone: (12)3947-1111 Fax: (12)3947-1149 E-mail: cep@univap.br

UNIVERSIDADE DO VALE DO
PARAÍBA - UNIVAP



Continuação do Parecer: 2.741.302

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1144367.pdf	08/06/2018 16:33:47		Aceito
Parecer Anterior	ParecerCEPProjetoTireoide2016.pdf	08/06/2018 16:33:01	Renata de Azevedo Canevari	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_SignificadoDiagnostico.pdf	08/06/2018 16:32:51	Renata de Azevedo Canevari	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	JustificativadedispensaTCLE.pdf	08/06/2018 16:32:41	Renata de Azevedo Canevari	Aceito
Declaração do Patrocinador	Termodeoutorgaaditivo.pdf	08/06/2018 16:32:30	Renata de Azevedo Canevari	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	ViaNucleoPesquisalCESP.pdf	08/06/2018 16:32:20	Renata de Azevedo Canevari	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	CartadeanuenciaPatologia.pdf	08/06/2018 16:32:11	Renata de Azevedo Canevari	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	CartadeanuencialCESP.pdf	08/06/2018 16:32:05	Renata de Azevedo Canevari	Aceito
Cronograma	ORCAMENTO_PROJETO.pdf	08/06/2018 16:31:57	Renata de Azevedo Canevari	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	08/06/2018 16:31:41	Renata de Azevedo Canevari	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 27 de Junho de 2018

Assinado por:
Mauricio Martins Alves
(Coordenador)

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911

Bairro: Urbanova

CEP: 12.244-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

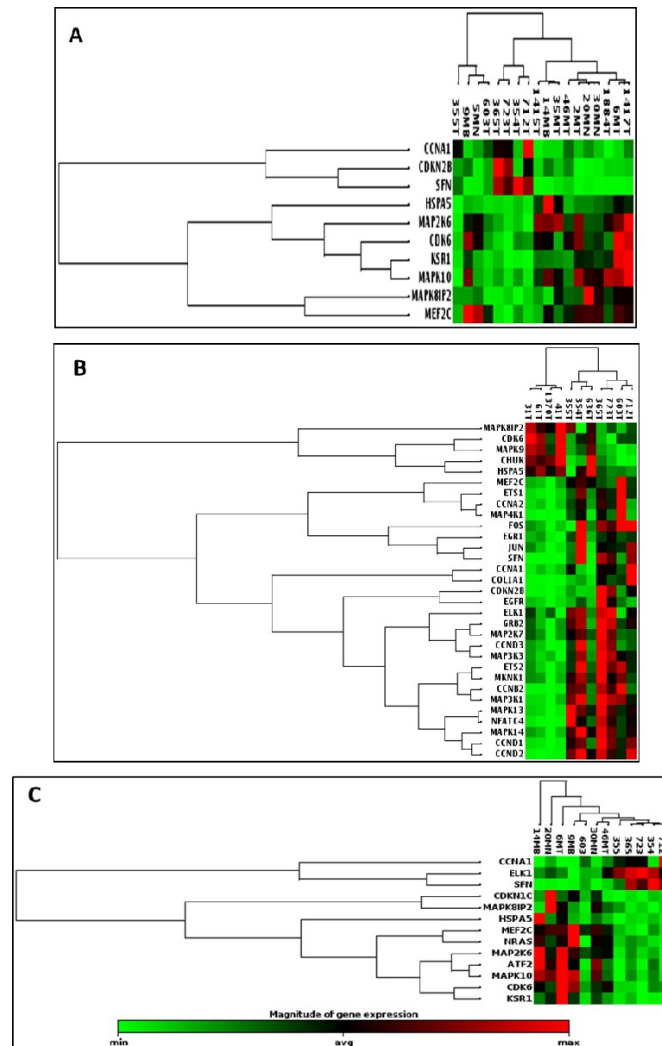
Telefone: (12)3947-1111

Fax: (12)3947-1149

E-mail: cep@univap.br

APÊNDICE 1

Análise de *cluster* pela PCR *array* referente aos genes, pertencentes à via *MAPK/KINASE*, que apresentaram expressão diferencial significativa na comparação entre diferentes tipos histológicos de tireoide. A. Análise 1: CPT com amostras benignas (10 genes ***CCNA1***, ***CDKN2B***, ***SFN***, ***HSPA5***, ***MAP2K6***, ***CDK6***, ***KSRI***, ***MAPK10***, ***MAPK8IP2*** e ***MEF2C***). B. Análise 2: CPT com amostras de CFT (31 genes: ***MAPK8IP2***, ***CDK6***, ***MAPK9***, ***CHUK***, ***HSPA5***, ***MEF2C***, ***ETS1***, ***CCNA2***, ***MAP4K1***, ***FOS***, ***EGR1***, ***JUN***, ***SFN***, ***CCNA1***, ***COL1A1***, ***CDKN2B***, ***EGFR***, ***ELK1***, ***GRB2***, ***MAP2K7***, ***CCND3***, ***MAP3K3***, ***ETS2***, ***MKMK1***, ***CCNB2***, ***MAP3K1***, ***MAPK13***, ***NFATC4***, ***MAPK14***, ***CCND1*** e ***CCND2***). C. Análise 3: CPT com bócio (13 genes: ***CCNA1***, ***ELK1***, ***CDKN1C***, ***MAPK8IP2***, ***HSPA5***, ***MEF2C***, ***NRAS***, ***MAP2K6***, ***ATF2***, ***MAPK10***, ***CDK6*** e ***KSRI***). Em negrito: genes selecionados para análise de RT-qPCR do presente estudo.



Fonte: Silva et al, 2018.

APÊNDICE 2

Silva et al. CCNA1 gene as a potential diagnostic marker in papillary thyroid cancer. *Acta Histochemica*, v. 122, n. 8, p. 151635, 2020.

Acta Histochemica 122 (2020) 151635



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Histochemica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/acthis



CCNA1 gene as a potential diagnostic marker in papillary thyroid cancer



Raissa Monteiro da Silva^a, Joyce Nascimento Santos^a, Miyuki Uno^b, Roger Chammas^b, Marco Aurélio Vamondes Kulcsar^c, Luciana Barros Sant'Anna^d, Renata de Azevedo Canevari^{a,*}

^a Laboratório de Biologia Molecular do Câncer, Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi 2911, Urbanova, São José dos Campos, 12244-000, São Paulo, SP, Brazil

^b Centro de Investigação Translacional em Oncologia, Departamento de Radiologia e Oncologia, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo - ICESP, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP, Avenida Dr. Arnaldo 251, Cerqueira César, São Paulo, 01246-000, São Paulo, Brazil

^c Serviço de Cirurgia de cabeça e Pescoço, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo - ICESP, Av. Doutor Arnaldo, 251, Cerqueira César, CEP 01246-000 São Paulo, SP, Brazil

^d Laboratório de Histologia e Terapia Regenerativa, Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi 2911, Urbanova, São José dos Campos, 12244-000, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Papillary thyroid cancer
Diagnostic
Protein expression
Cyclin A1
CCNA1 gene
Molecular marker

ABSTRACT

The malignancy that most affects the endocrine system is thyroid neoplasm, with an increasing incidence over the years. The most prevalent histological type of the carcinomas that affect the thyroid gland is papillary carcinoma with a prevalence of 80 % worldwide. The current diagnostic methodology may present inconclusive results, emphasizing the need for new effective and sensitive techniques to aid the diagnosis. For this, it is necessary to understand molecular and protein mechanisms in the identification of diagnostic and predictive markers in the lesions. The Cyclin A1 protein, encoded by the CCNA1 gene, is an important cell cycle regulator, belonging to the MAPK/ERK signaling pathway directly involved with thyroid cancer. The aim of this study was to evaluate the CCNA1 gene and Cyclin A1 protein expression in papillary thyroid carcinoma, follicular thyroid carcinoma, and benign thyroid lesions, by real time quantitative PCR and immunohistochemistry analysis, respectively, to verify their roles as potential diagnostic and predictive markers to future applications in the clinical routine. Overexpression of CCNA1 gene was observed in the papillary carcinoma group compared to the normal group ($P = 0.0023$), benign lesions ($P = 0.0011$), colloid goiter ($P = 0.0124$), and follicular carcinoma ($P = 0.0063$). No differential expression was observed in the papillary primary tumor group from negative lymph nodes compared with the one from positive lymph nodes ($P = 0.3818$). Although an increased expression of Cyclin A1 was observed in the PTC group compared to the other one in the IHC analysis, no significant difference was observed (Fisher's exact Test). A Cyclin A1 overexpression was detected with weak to mid-moderate immunoreactivity in the benign group ($k = 0.56$), (score 1.5); mid-moderate to moderate in the goiter group ($k = 0.58$); weak in the FTC group ($k = 0.33$); and mid-moderate to moderate in the PTC group ($k = 0.48$). Due to the small sample size in the IHC analysis and to the fact that not all RNA is translated into protein, the diagnostic potential of Cyclin A1 could not be assessed. However, these findings highlight the potential of the CCNA1 gene as a diagnostic marker for papillary thyroid carcinoma.

1. Introduction

Thyroid cancer is the most prevalent endocrine malignancy worldwide, affecting mainly women (Moghaddam et al., 2016; Nguyen et al., 2015; Upadhyaya et al., 2017). The major benign pathologies that affect the gland include nodules, goiter, and adenomas (Moghaddam et al., 2016). Malignancies are represented by carcinomas and most of these

primary tumors are epithelial with follicular origin (Fuzio et al., 2015; Hiroshi et al., 2018). The most prevalent histological type of carcinomas that affect this gland is the papillary thyroid carcinoma (PTC) with 80 % prevalence due to its slow and asymptomatic clinic, favoring metastasis to cervical lymph nodes (Schwaiger et al., 2019; Subha et al., 2018). Actually 70 % of the PTC cases present cervical lymph node metastasis, therefore affecting negatively the survival rate of the patients,

* Corresponding author at: Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório de Biologia Molecular do Câncer, Avenida Shishima Hifumi 2911 - Urbanova, São José dos Campos, 12244-000, Brazil.

E-mail address: rcanevari@univap.br (R.A. Canevari).

<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151635>

Received 6 December 2019; Received in revised form 3 September 2020; Accepted 23 September 2020

Available online 30 September 2020

0065-1281/© 2020 Elsevier GmbH. All rights reserved.