

# UFBA

Universidade Federal da Bahia  
Instituto de Ciências da Saúde

Joaquim Custódio da Silva Júnior

PROCESSOS INTERATIVOS  
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA



Associação entre Expressão do  
*Homeobox* Gene *HOPX* e Aspectos  
Clínico-Patológicos do Carcinoma  
Diferenciado de Tireoide

Salvador  
2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS  
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**



**JOAQUIM CUSTÓDIO DA SILVA JÚNIOR**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DO *HOMEOBOX* GENE *HOPX* E ASPECTOS  
CLÍNICO-PATOLÓGICOS DO CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIREOIDE**

Salvador

2014

**JOAQUIM CUSTÓDIO DA SILVA JÚNIOR**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DO *HOMEOBOX* GENE *HOPX* E ASPECTOS  
CLÍNICO-PATOLÓGICOS DO CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIREOIDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientador: Prof. Dr. Helton Estrela Ramos

Salvador

2014

Ficha catalográfica elaborada por Marcos A. N. Ferreira – Bibliotecário Documentalista CRB  
5/1758

S586a

Silva Júnior, Joaquim Custódio

Associação entre expressão do *Homeobox* gene *HOPX* e aspectos clínico-patológicos do carcinoma diferenciado de tireóide. / Joaquim Custódio Silva Júnior. - Salvador, 2014.

92p. Il.: color.

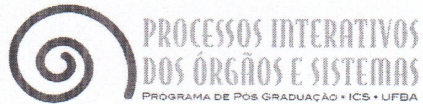
Orientação: Prof. Dr. Helton Estrela Ramos.

Trabalho de conclusão de curso (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, 2014.

1. *Homeobox* gene *hopx*. 2. Tireóide - carcinoma diferenciado. 3. Câncer de tireóide. I – Título.

CDD – 616.44

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO  
PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

Aos vinte e dois dias do mês de dezembro de dois mil e catorze, reuniu-se em sessão pública o Colegiado do Programa de Pós- Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas com a finalidade de apreciar a **Defesa Pública da Dissertação** do Mestrando **Joaquim Custódio da Silva Júnior**, através da Comissão Julgadora composta pelos **Professores Helton Estrela Ramos, Luciana Mattos Barros Oliveira e Hans Graf**. O título da Dissertação apresentada foi **Associação entre Expressão do Homeobox Gene HOPX e Aspectos Clínico-Patológicos do Carcinoma Diferenciado de Tireoide**. Ao final dos trabalhos, os membros da mencionada Comissão Examinadora emitiram os seguintes pareceres:

Prof. Dr. Helton Estrela Ramos \_\_\_\_\_ APROVADO

Profa. Dra. Luciana Mattos Barros Oliveira \_\_\_\_\_ APROVADO

Prof. Dr. Hans Graf \_\_\_\_\_ APROVADO

Franqueada a palavra, como não houve quem desejasse fazer uso da mesma lavrou-se a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada por todos.

Salvador, 22 de dezembro de 2014

Prof. Dr. Helton Estrela Ramos \_\_\_\_\_ [Assinatura]

Profa. Dra. Luciana Mattos Barros Oliveira \_\_\_\_\_ [Assinatura]

Prof. Dr. Hans Graf \_\_\_\_\_ [Assinatura]

*Dedico este trabalho a Joaquim, Antonia, Virgínia e Alessandro*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Joaquim e Antonia, pelo estímulo constante à educação de qualidade, desde a mais tenra idade;

À minha esposa Virgínia, pela dedicação à família e paciência com as múltiplas tarefas do dia-a-dia;

Ao meu pequeno Alessandro, fonte permanente de alegria;

Aos meus irmãos Leila, Lélia, Jean, aos primos Ulisses, Lílian, Liane, aos tios e tias, aos meus sogros, aos avós que nos deixaram no plano físico, mas continuam zelando por nós no plano espiritual;

Aos diversos amigos e amigas das mais diversas épocas, pela contribuição, grande ou pequena, simples ou complexa, naquilo que sou hoje;

Ao Prof. Helton Estrela Ramos, pela confiança em mim depositada para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas do PPgPIOS, que tornaram uma tarefa aparentemente pesada em uma convivência mais do que agradável;

À equipe do Laboratório de Estudo da Tireoide da UFBA, em especial a Taíse Lima e Danielle Pessôa, pela disponibilidade e auxílio nos caminhos da Biologia Molecular;

Aos colaboradores do Hospital São Rafael, notadamente Dr. Cláudio Rogério Lima, Dr. Luciano Espinheira, Dr. Igor Campos e Dr. Luiz José Lobão, pela significativa ajuda para que este trabalho rendesse frutos;

Ao grupo de Biologia Molecular em Tireoide da UNIFESP (Profa. Ileana Rubió, Ana Luiza Galvão, Erika Urbano), pela oportunidade de compartilhar sua vasta experiência no tema;

À FAPESB – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, pelo apoio financeiro a este projeto;

Aos pacientes, fonte de inspiração para a prática harmoniosa do cuidado.

*Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, sou como um bronze que soa ou um címbalo que retine.*

*Ainda que eu tenha o dom da profecia e conheça todos os mistérios e toda a ciência, ainda que eu tenha tão grande fé que transporte montanhas, se não tiver amor, nada sou.*

*Ainda que eu distribua todos os meus bens e entregue o meu corpo para ser queimado, se não tiver amor, de nada me aproveita.*

*O amor é paciente, o amor é prestável, não é invejoso, não é arrogante nem orgulhoso, nada faz de inconveniente, não procura o seu próprio interesse, não se irrita nem guarda ressentimento. Não se alegra com a injustiça, mas rejubila com a verdade. Tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.*

*O amor jamais passará. As profecias terão o seu fim, o dom das línguas terminará e a ciência vai ser inútil. Pois o nosso conhecimento é imperfeito e também imperfeita é a nossa profecia. Mas, quando vier o que é perfeito, o que é imperfeito desaparecerá. Quando eu era criança, falava como criança, pensava como criança, raciocinava como criança. Mas, quando me tornei homem, deixei o que era próprio de criança.*

*Agora, vemos como num espelho, de maneira confusa; depois, veremos face a face. Agora, conheço de modo imperfeito; depois, conhecerei como sou conhecido. Agora permanecem estas três coisas: a fé, a esperança e o amor; mas a maior de todas é o amor.*

Primeira Epístola de São Paulo aos Coríntios, Capítulo 13, Versículos 1 ao 13



## RESUMO

**Introdução:** Apesar de bom prognóstico na maioria dos casos, o manejo do câncer diferenciado de tireoide (CDT) ainda carece de avanços em situações de doença mais agressiva. O uso crescente da Biologia Molecular na Oncologia vem ganhando força como ferramenta útil no manejo de diversos tipos de câncer. Além da abordagem tradicional de busca de mutações relacionadas a tipos específicos de câncer, o estudo de características epigenéticas emerge como uma nova modalidade de análise e predição do comportamento dos tumores. *HOPX* é um gene *homeobox* com função de supressão tumoral, cuja hipermetilação e consequente redução de expressão gênica foi estudada em diversos tipos de câncer (pulmão, esôfago, estômago, pâncreas, cólon e útero). Em câncer colorretal, gástrico, pulmonar e de esôfago, a redução de expressão gênica de *HOPX* confere fenótipo mais agressivo e piora do prognóstico. *HOPX* possui papel controlador de diversas onco-proteínas (Cyr61, EMP1, EphA2, c-Fos, c-Jun, EGR1 e GLUT-3) e interage com fatores de transcrição tais como HDAC2/GATA4, SRF e EPC1. **Objetivos:** Analisar o perfil de expressão do gene *homeobox HOPX* em amostras de CDT, comparando com o tecido não-tumoral adjacente e com tecidos benignos, e buscar associação com aspectos clínico-patológicos. **Metodologia:** Estudo prospectivo envolvendo 32 pacientes submetidos à tireoidectomia total, dos quais 26 tiveram confirmação de diagnóstico de CDT e 6 com tumores benignos. Realizada dissecação de amostra de tecido tumoral (T) e tecido não-tumoral (NT) adjacente ao tumor. Extração de RNA das amostras pelo método Trizol<sup>®</sup> e conversão em cDNA. Análise de expressão gênica através da reação em cadeia da polimerase em tempo real utilizando aparelho *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems<sup>®</sup>). O gene *S8* foi utilizado como controle interno para normalização da expressão. Dados clínicos e patológicos foram obtidos através de entrevista com os pacientes e revisão de prontuários eletrônicos. Para cálculo da expressão gênica foi empregado o método  $\Delta\Delta C_T$ . A comparação da expressão gênica entre tecidos NT e T foi realizada utilizando testes de Wilcoxon. Para comparar os grupos benigno e maligno foi utilizado o teste ANOVA. As análises considerando os aspectos clínico-patológicos foram realizadas com o teste do Qui-Quadrado e o teste de Kruskal-Wallis. **Resultados:** A expressão de *HOPX* demonstrou marcada redução em amostras de CDT, quando comparado a neoplasias benignas de tireoide ( $p = 0,024$ ). Verificou-se significativa redução (65,6%) da expressão gênica de *HOPX* nas amostras T quando comparadas com as NT ( $3,49 \pm 8,3$  vs.  $10,14 \pm 27,8$ ) ( $p = 0,009$ ). Em pacientes com CDT sem tireoidite associada, a redução da

expressão de *HOPX* esteve associada a estádios mais iniciais de neoplasia (I e II, classificação TNM), em comparação com estádios mais avançados (III e IV) ( $p = 0,021$ ). Redução de expressão de *HOPX* também esteve associada com idade menor que 45 anos ( $p = 0,048$ ).

**Conclusão:** Este é o primeiro estudo da literatura que evidencia redução da expressão de *HOPX* em câncer de tireoide, tanto em comparação com tecidos benignos, quanto comparado a tecido não-tumoral. Por outro lado, os achados de associação com estádios mais precoces e pacientes mais jovens sugerem uma possível especificidade dos mecanismos de controle da expressão gênica de *HOPX* em CDT, mediante influências microambientais e genéticas ainda não identificadas. Estudos adicionais permitirão confirmar estes achados em maior tamanho amostral, bem como definir o papel de *HOPX* como marcador de prognóstico clínico e risco de recorrência tumoral em câncer de tireoide.

Palavras-chave: Câncer de tireoide. Expressão gênica. Genes homeobox

## ABSTRACT

**Background:** Despite good prognosis in majority of cases, differentiated thyroid cancer (DTC) management still lacks advances in more aggressive disease. Growing use of Molecular Biology in Oncology has emerged as useful tool in management of several types of cancer. In addition to the traditional approach of search tissue-specific related mutations, the study of epigenetic pattern constitutes a new way to analysis and prediction of tumor's behavior. *HOPX* is a homeobox gene with tumor-suppressing function, whose hypermethylation and consequent reduction of gene expression was studied in several cancer types (lung, esophagus, stomach, pancreas, colorectal and uterus). In colorectal, gastric, lung and esophageal cancer, reduction of *HOPX* gene expression gives more aggressive phenotype and worse prognosis. *HOPX* acts controlling various oncoproteins (like Cyr61, EMP1, EphA2, c-Fos, c-Jun, EGR1 and GLUT-3) and interacts with transcription factors such as HDAC2/GATA4, SRF and EPC1. **Objectives:** Analysis of *HOPX* gene expression profile in DTC samples, comparing with the adjacent non-tumor tissue and benign thyroid samples, and looking for association with clinical-pathologic features. **Methods:** Prospective study enrolling 32 patients who undergone thyroidectomy, of which 26 has confirmed DTC diagnosis and 6 with benign tumors. Held sample dissection of tumor tissue (T) and non-tumor tissue (NT) adjacent to the tumor. RNA extraction from samples with Trizol<sup>®</sup> method, and then converted in cDNA. Gene expression analysis with real time PCR method, using 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems<sup>®</sup>). *S8* ribosomal gene was used as housekeeping to normalize expression. Clinical and pathological data was obtained interviewing patients and reviewing electronic medical records.  $\Delta\Delta C_T$  method was used to calculate gene expression. Gene expression comparison between T and NT tissues was done with Wilcoxon's test. ANOVA test was used to compare malign and benign tumors. Clinical-pathologic features analysis were done with qui-square test and Kruskal-Wallis's test. **Results:** *HOPX* expression markedly reduced in DTC samples, when compared to benign thyroid tissues ( $p = 0.024$ ). There was a significant reduction (65.6%) of *HOPX* gene expression in tumor samples compared to non-tumoral ( $3.49 \pm 8.3$  vs.  $10.14 \pm 27.8$ ) ( $p = 0.009$ ). In DTC patients without thyroiditis, *HOPX* reduced expression was associated with earlier tumor stages (I and II, TNM staging system) compared with advanced stages (III and IV) ( $p = 0.021$ ). *HOPX* reduced expression was also associated with age below 45 years ( $p = 0.048$ ). **Conclusion:** This is the first study that evidences *HOPX* reduced expression in

thyroid cancer, compared with benign thyroid tumors and non-tumoral tissues. However, finding of association with earlier stages and lower age suggests specific mechanisms controlling *HOPX* gene expression in DTC, mediated by microenvironmental and genetic influences, yet not identified. Additional studies may confirm these findings in larger samples, and establish the utility of *HOPX* use as prognostic and tumor recurrence marker in thyroid cancer.

Keywords: Thyroid cancer. Gene expression. Genes homeobox

## LISTA DE TABELAS

|           |                                                                                                                                        |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1  | Classificação histológica dos tumores primários da tireoide.....                                                                       | 22 |
| Tabela 2  | Sistema de Bethesda para laudo citopatológico da tireoide.....                                                                         | 24 |
| Tabela 3  | Sistema TNM de classificação para o carcinoma diferenciado de tireoide.....                                                            | 26 |
| Tabela 4  | Comparação dos sistemas de estratificação de risco de doença recorrente/persistente.....                                               | 28 |
| Tabela 5  | Prevalência média de mutações no carcinoma diferenciado de tireoide.....                                                               | 32 |
| Tabela 6  | Alterações epigenéticas no câncer de tireoide.....                                                                                     | 35 |
| Tabela 7  | Relação entre o gene <i>HOPX</i> e os diferentes tipos de câncer em humanos...                                                         | 39 |
| Tabela 8  | Relação entre o gene <i>HOPX</i> e a função de supressão tumoral em células de câncer em humanos.....                                  | 40 |
| Tabela 9  | Critérios de classificação de ilhas CpG.....                                                                                           | 50 |
| Tabela 10 | Sequência de iniciadores utilizados na reação de RT-PCR.....                                                                           | 54 |
| Tabela 11 | Estudo piloto: dados clínicos dos pacientes.....                                                                                       | 61 |
| Tabela 12 | Comparação entre redução da expressão de <i>HOPX<math>\beta</math></i> e presença da mutação BRAF <sup>V600E</sup> .....               | 63 |
| Tabela 13 | Estudo prospectivo: dados clínicos dos pacientes (geral).....                                                                          | 64 |
| Tabela 14 | Estudo prospectivo: dados clínicos dos pacientes com diagnóstico confirmado de neoplasia maligna da tireoide.....                      | 65 |
| Tabela 15 | Estratificação de risco de recorrência de neoplasia maligna da tireoide.....                                                           | 66 |
| Tabela 16 | Estudo prospectivo: dados clínicos dos pacientes com diagnóstico confirmado de neoplasia benigna da tireoide.....                      | 67 |
| Tabela 17 | Análise de associação entre a expressão de <i>HOPX<math>\beta</math></i> e aspectos clínico-patológicos em CDT (N = 26 pacientes)..... | 70 |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|           |                                                                                                                                                                                              |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1  | Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide.....                                                                                                                                                       | 20 |
| Figura 2  | Principais sítios de alterações de vias de sinalização intracelular relacionadas com os diferentes tipos histológicos de câncer de tireoide.....                                             | 30 |
| Figura 3  | Processo de silenciamento gênico através da hipermetilação de região promotora.....                                                                                                          | 34 |
| Figura 4  | Localização genômica de <i>HOPX</i> , no braço longo do cromossomo 4 (4q12).....                                                                                                             | 37 |
| Figura 5  | Localização das ilhas CpG na região 5' do gene <i>HOPX</i> .....                                                                                                                             | 38 |
| Figura 6  | Modelos de interação de <i>HOPX</i> com genes relacionados com diferenciação, crescimento e ciclo celular.....                                                                               | 41 |
| Figura 7  | Modelo celular dos efeitos da repressão epigenética de <i>HOPX</i> levando a expressão aumentada de fatores relacionados com angiogênese, invasividade tumoral e metástases à distância..... | 42 |
| Figura 8  | Fórmula para cálculo amostral.....                                                                                                                                                           | 48 |
| Figura 9  | Gel de agarose a 1,5% contendo o produto de amplificação de cDNA do fragmento (151 pb) do gene <i>HOPX</i> .....                                                                             | 53 |
| Figura 10 | Resultado da identificação de ilha CpG na região promotora de <i>HOPXβ</i> .....                                                                                                             | 56 |
| Figura 11 | Identificação da ilha CpG na região promotora de <i>HOPXβ</i> e sequência de iniciadores para QMSP.....                                                                                      | 59 |
| Figura 12 | Sequência de iniciadores para etapa de sequenciamento pós-tratamento com bissulfito.....                                                                                                     | 60 |
| Figura 13 | Resultados do estudo piloto: expressão de mRNA de <i>HOPXβ</i> em amostras tumorais e não-tumorais de CDT.....                                                                               | 62 |
| Figura 14 | Expressão de mRNA de <i>HOPXβ</i> em amostras tumorais e não-tumorais de CDT.....                                                                                                            | 69 |
| Figura 15 | Diferença de expressão de <i>HOPXβ</i> em tecido T e NT entre neoplasias malignas e benignas de tireoide.....                                                                                | 70 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|              |                                                                                                                  |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A260         | absorbância no comprimento de onda de 260 nm (corresponde aos ácidos nucleicos – DNA e RNA)                      |
| A280         | absorbância no comprimento de onda de 280 nm (corresponde às proteínas)                                          |
| AJCC         | <i>American Joint Committee on Cancer</i> – Comitê Conjunto Norte-americano sobre Câncer                         |
| AKT          | proteína Ak do timoma                                                                                            |
| API          | fator de transcrição de resposta rápida (junção de c-Fos e c-Jun)                                                |
| ATA          | Associação Americana de Tireoide                                                                                 |
| BMP4         | gene que codifica a proteína morfogenética óssea 4                                                               |
| BRAF         | RAF (acrônimo para <i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i> fibrosarcoma rapidamente acelerado) quinase do tipo B |
| CALCA        | gene que codifica o polipeptídeo alfa relacionado com a calcitonina                                              |
| CASP8        | gene que codifica a proteína caspase 8                                                                           |
| CAT          | carcinoma anaplásico de tireoide                                                                                 |
| CCDC6        | gene que codifica a proteína 6 contendo domínio espiral enrolado (também chamado de H4)                          |
| CDH1         | gene que codifica a proteína caderina-1                                                                          |
| CDH4         | gene que codifica a proteína caderina-4                                                                          |
| CDK          | quinase dependente de ciclina                                                                                    |
| cDNA         | ácido desoxirribonucleico complementar                                                                           |
| CDT          | carcinoma diferenciado de tireoide                                                                               |
| <i>c-Fos</i> | gene que codifica o homólogo do oncogene retroviral <i>v-fos</i>                                                 |
| CFT          | carcinoma folicular de tireoide                                                                                  |
| CIMP         | fenótipo metilador de ilha CpG                                                                                   |
| CITED1       | gene que codifica o transativador da interação Cpb/p300 tipo 1                                                   |
| c-Jun        | proteína codificada pelo gene <i>JUN</i>                                                                         |
| CMT          | carcinoma medular de tireoide                                                                                    |
| CpG          | dinucleotídeo citosina-guanina                                                                                   |
| CpGobs       | quantidade de sítios CpG observados                                                                              |
| CpGesp       | quantidade de sítios CpG esperados                                                                               |
| CPT          | carcinoma papilífero de tireoide                                                                                 |
| cT           | <i>cycle threshold</i> – ciclo limiar                                                                            |

|                  |                                                                              |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Cyr61            | indutor de angiogênese rico em cisteína 61                                   |
| <i>DAPK</i>      | gene que codifica a proteína quinase associada à morte celular               |
| DEPC             | dietilpirocarbonato                                                          |
| <i>DKK3</i>      | gene que codifica a proteína relacionada ao <i>Dickkopf</i> tipo 3           |
| DNA              | ácido desoxirribonucleico                                                    |
| DNMT             | DNA metiltransferase                                                         |
| dNTP             | desoxirribonucleotídeos fosfatados                                           |
| E <sub>2</sub>   | estradiol                                                                    |
| EDTA             | ácido etilendiamino tetra-acético                                            |
| ELK1             | proteína contendo domínio ETS (E26 transformação-específico) tipo 1          |
| EMP1             | proteína epitelial de membrana 1                                             |
| EGR1             | proteína de resposta ao crescimento precoce 1                                |
| EphA2            | efrin tipo-A receptor 2                                                      |
| ETA              | Associação Europeia de Tireoide                                              |
| <i>FGF8</i>      | gene que codifica o fator de crescimento de fibroblastos 8                   |
| GATA4            | proteína de ligação à sequência genômica "G-A-T-A" tipo 4                    |
| GATA6            | proteína de ligação à sequência genômica "G-A-T-A" tipo 6                    |
| GDP              | guanosina difosfato                                                          |
| GEC              | <i>gene expression classifier</i> – sistema de classificação gênica          |
| GLUT3            | transportador de glicose tipo 3                                              |
| <i>GSTpi</i>     | gene que codifica a glutathione S-transferase P                              |
| GTP              | guanosina trifosfato                                                         |
| GTPase           | guanosina trifosfatase                                                       |
| H2A.X            | membro X da família H2A de histonas                                          |
| HDAC2            | deacetilase de histona tipo 2                                                |
| <i>HOPX</i>      | gene que codifica a proteína X de homeodomínio único                         |
| <i>hMLH1</i>     | gene que codifica a proteína de reparo de incompatibilidade, homólogo tipo 1 |
| <i>H-RAS</i>     | variante H do gene <i>RAS</i>                                                |
| I                | iodo (elemento químico)                                                      |
| I <sup>131</sup> | isótopo 131 do iodo                                                          |
| ICS              | Instituto de Ciências da Saúde                                               |
| INCA             | Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva                     |
| KLF4             | fator "tipo Kruppel" 4                                                       |
| <i>K-RAS</i>     | variante K do gene <i>RAS</i>                                                |



|                      |                                                                                                                |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>LAGY</i>          | gene Y associado ao câncer de pulmão (denominação alternativa para o gene <i>HOPX</i> )                        |
| LATS                 | Sociedade Latinoamericana de Tireoide                                                                          |
| LET                  | Laboratório de Estudo da Tireoide, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia               |
| LN                   | linfonodo                                                                                                      |
| MAPK                 | proteína quinase ativada por mitógenos                                                                         |
| MEK                  | quinase da proteína quinase ativada por mitógenos                                                              |
| MGMT                 | O-6-metilguanina-DNA metiltransferase                                                                          |
| mg                   | micrograma ( $10^{-3}$ grama)                                                                                  |
| ml                   | mililitro ( $10^{-3}$ litro)                                                                                   |
| $\mu$ L              | microlitro ( $10^{-6}$ litro)                                                                                  |
| mm                   | milímetro ( $10^{-3}$ metro)                                                                                   |
| mRNA                 | ácido ribonucleico mensageiro                                                                                  |
| miRNA                | microRNA                                                                                                       |
| <i>NCOA4</i>         | gene que codifica o coativador4 do receptor nuclear                                                            |
| <i>NECC1</i>         | clone 1 não-expresso no coriocarcinoma (denominação alternativa para o gene <i>HOPX</i> )                      |
| ng                   | nanograma ( $10^{-9}$ grama)                                                                                   |
| NIS                  | simportador de sódio-iodo                                                                                      |
| <i>NKX2.1</i>        | gene que codifica o NK2 homeobox 1, também conhecido como fator de transcrição da tireoide 1 (TTF-1)           |
| <i>NPC1</i>          | gene que codifica a proteína da doença de Niemann-Pick tipo C1                                                 |
| <i>N-RAS</i>         | variante N do gene <i>RAS</i>                                                                                  |
| <i>OBI</i>           | rara proteína homeobox 1 (denominação alternativa para o gene <i>HOPX</i> )                                    |
| OMS                  | Organização Mundial da Saúde                                                                                   |
| p16 <sup>INK4A</sup> | proteína supressora tumoral 16; também conhecida como CDKN2A (quinase dependente de ciclina inibidora tipo 2A) |
| PAAF                 | punção aspirativa por agulha fina                                                                              |
| <i>PAX8</i>          | gene box pareado 8                                                                                             |
| pb                   | pares de bases                                                                                                 |
| PCI                  | pesquisa de corpo inteiro                                                                                      |
| PCR                  | reação em cadeia da polimerase                                                                                 |
| PI3K                 | fosfatidilinositol 3 quinase                                                                                   |

|                                |                                                                                                                                 |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>PPAR<math>\gamma</math></i> | gene que codifica o receptor ativado por proliferadores de peroxissomo gama                                                     |
| PPFP                           | proteína de fusão PAX8–PPAR $\gamma$                                                                                            |
| pRB                            | proteína do retinoblastoma                                                                                                      |
| PRKAR1A                        | proteína quinase regulatória, dependente de AMP cíclico, tipo 1                                                                 |
| PTC                            | <i>papillary thyroid cancer</i> - carcinoma papilífero de tireoide                                                              |
| <i>PTEN</i>                    | gene que codifica a fosfatase homóloga à tensina                                                                                |
| QMSP                           | reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real, específica para metilação                                            |
| qPCR                           | reação em cadeia da polimerase em tempo real ( <i>real time PCR</i> )                                                           |
| ®                              | marca registrada                                                                                                                |
| <i>Rap1GAP</i>                 | gene que codifica a proteína ativadora de GTPase Rap1 (proteína da superfamília RAS)                                            |
| <i>RAR<math>\beta</math>2</i>  | gene que codifica o receptor de ácido retinoico tipo $\beta$ 2                                                                  |
| <i>RAS</i>                     | acrônimo para “ <i>rat sarcoma</i> ” (sarcoma de rato) – família de genes que inclui <i>H-RAS</i> , <i>K-RAS</i> e <i>N-RAS</i> |
| <i>RASSF1A</i>                 | família de domínio associado ao RAS 1, forma de <i>splicing A</i>                                                               |
| <i>RET</i>                     | acrônimo para “ <i>rearranged during transfection</i> ” (rearranjo durante transfecção)                                         |
| rhTSH                          | TSH recombinante (tireotropina alfa)                                                                                            |
| RNA                            | ácido ribonucleico                                                                                                              |
| RNAi                           | RNA interferente                                                                                                                |
| ROC                            | <i>Receiver Operating Characteristic</i> - Características de Operação do Receptor                                              |
| RT-PCR                         | reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase                                                      |
| <i>S8</i>                      | gene que codifica a proteína ribossomal S8                                                                                      |
| <i>S100</i>                    | gene que codifica proteína envolvida em regulação da fosforilação proteica e fatores de transcrição                             |
| SAHA                           | ácido hidroxâmico suberoilânida                                                                                                 |
| SAP1                           | proteína acessória ao SRF tipo 1                                                                                                |
| SAP2                           | proteína acessória ao SRF tipo 2                                                                                                |
| siRNA                          | pequeno RNA interferente                                                                                                        |
| <i>SLC5A8</i>                  | gene que codifica o transportador de monocarboxilato acoplado ao sódio tipo 1                                                   |
| <i>SMAP31</i>                  | gene que codifica a pequena proteína 31 (denominação alternativa para o gene <i>HOPX</i> )                                      |
| SRE                            | elemento de resposta sérica                                                                                                     |

|               |                                                                   |
|---------------|-------------------------------------------------------------------|
| SRF           | fator de resposta ao soro                                         |
| T3            | triiodotironina                                                   |
| T4            | tiroxina ou tetraiodotironina                                     |
| TCF           | fator complexo ternário                                           |
| <i>TERT</i>   | gene que codifica a transcriptase reversa da telomerase           |
| Tg            | tireoglobulina                                                    |
| TGF- $\beta$  | fator de crescimento tumoral beta                                 |
| <i>TIMP3</i>  | gene que codifica o inibidor de metaloproteinases tissular tipo 3 |
| <sup>TM</sup> | <i>trade mark</i> (marca registrada)                              |
| TNM           | sistema de estadiamento tumoral (tumor, linfonodo e metástase)    |
| TPO           | tireoperoxidase                                                   |
| TRAb          | anticorpo anti-receptor do TSH                                    |
| TRH           | hormônio liberador de tireotrofina                                |
| TSH           | hormônio estimulante da tireoide                                  |
| <i>TSHR</i>   | gene que codifica o receptor do hormônio estimulante da tireoide  |
| TTF-1         | fator de transcrição da tireoide tipo 1                           |
| UFBA          | Universidade Federal da Bahia                                     |
| UICC          | União Internacional contra o Câncer                               |
| UNIFESP       | Universidade Federal de São Paulo                                 |
| USG           | ultrassonografia                                                  |
| USP           | Universidade de São Paulo                                         |
| VEGFR         | receptor do fator de crescimento do endotélio vascular            |

## SUMÁRIO

|              |                                                                                                                           |           |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                    | <b>19</b> |
| 1.1          | ASPECTOS GERAIS DA TUMORIGÊNESE TIREOIDIANA.....                                                                          | 20        |
| 1.2          | CARCINOMA DIFERENCIADO DA TIREOIDE - EPIDEMIOLOGIA,<br>CLASSIFICAÇÃO, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.....                       | 22        |
| 1.3          | BASES MOLECULARES DO CARCINOMA DIFERENCIADO DE<br>TIREOIDE.....                                                           | 29        |
| 1.4          | EPIGENÉTICA E CÂNCER DE TIREOIDE.....                                                                                     | 33        |
| 1.5          | O PAPEL DO GENE <i>HOPX</i> COMO SUPRESSOR TUMORAL.....                                                                   | 37        |
| <b>2</b>     | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                                                     | <b>44</b> |
| 2.1          | OBJETIVO GERAL.....                                                                                                       | 44        |
| 2.2          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                                                                                | 44        |
| <b>3</b>     | <b>HIPÓTESES.....</b>                                                                                                     | <b>45</b> |
| <b>4</b>     | <b>CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                | <b>46</b> |
| 4.1          | DESENHO DO ESTUDO.....                                                                                                    | 46        |
| 4.2          | AMOSTRA.....                                                                                                              | 46        |
| <b>4.2.1</b> | <b>Estudo piloto.....</b>                                                                                                 | <b>46</b> |
| <b>4.2.2</b> | <b>Estudo prospectivo.....</b>                                                                                            | <b>46</b> |
| 4.3          | CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....                                                                                                | 47        |
| 4.4          | CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....                                                                                                | 47        |
| 4.5          | CÁLCULO AMOSTRAL.....                                                                                                     | 47        |
| 4.6          | COLETA DE DADOS E ANÁLISE.....                                                                                            | 48        |
| <b>4.6.1</b> | <b>Coleta de amostra de tecido tumoral fresco.....</b>                                                                    | <b>48</b> |
| <b>4.6.2</b> | <b>Identificação da ilha CpG.....</b>                                                                                     | <b>49</b> |
| <b>4.6.3</b> | <b>Extração do DNA de tecido fresco.....</b>                                                                              | <b>50</b> |
| <b>4.6.4</b> | <b>Quantificação do DNA total.....</b>                                                                                    | <b>50</b> |
| <b>4.6.5</b> | <b>Extração de RNA total de tecido.....</b>                                                                               | <b>51</b> |
| <b>4.6.6</b> | <b>Quantificação do RNA total.....</b>                                                                                    | <b>51</b> |
| <b>4.6.7</b> | <b>Síntese de DNA complementar (cDNA).....</b>                                                                            | <b>52</b> |
| <b>4.6.8</b> | <b>Quantificação da expressão gênica por <i>real time</i> PCR (reação em cadeia da<br/>polimerase em tempo real).....</b> | <b>53</b> |
| <b>4.6.9</b> | <b>Revisão de prontuários.....</b>                                                                                        | <b>54</b> |

|          |                                                                                        |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.7      | ASPECTOS ESTATÍSTICOS.....                                                             | 55        |
| 4.8      | ASPECTOS ÉTICOS.....                                                                   | 55        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                 | <b>56</b> |
| 5.1      | IDENTIFICAÇÃO DA ILHA CPG.....                                                         | 56        |
| 5.2      | ESTUDO PILOTO DE ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>HOPXB</i> EM AMOSTRAS TUMORAIS..... | 60        |
| 5.3      | CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS PACIENTES DO BRAÇO PROSPECTIVO.....            | 63        |
| 5.4      | RESULTADOS DA EXTRAÇÃO DE RNA TUMORAL E NÃO TUMORAL E CONVERSÃO PARA CDNA.....         | 67        |
| 5.5      | PCR EM TEMPO REAL.....                                                                 | 68        |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÃO.....</b>                                                                  | <b>74</b> |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÃO.....</b>                                                                  | <b>81</b> |
| <b>8</b> | <b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>                                                       | <b>82</b> |
| <b>9</b> | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                | <b>83</b> |

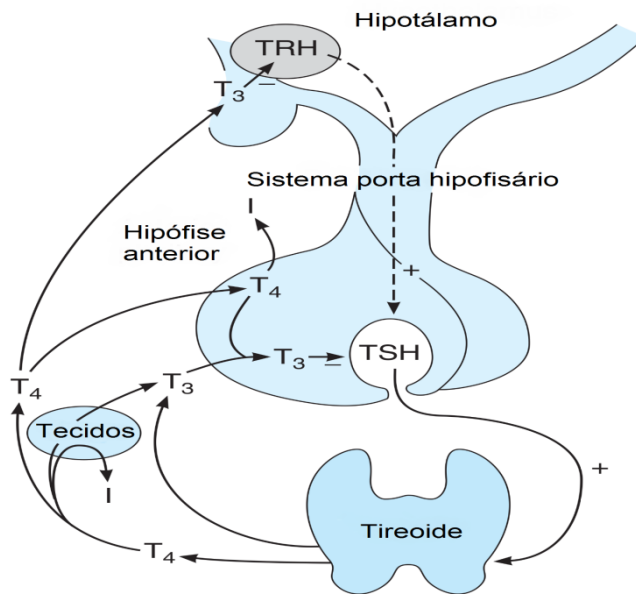
## 1 INTRODUÇÃO

A tireoide é uma glândula endócrina situada na região cervical anterior do pescoço, com massa de aproximadamente 15 a 20 gramas, composta por tecido de origem predominantemente epitelial. Os tireócitos têm por característica grande avidéz pelo iodo, o que não se evidencia em outras células do organismo humano. O iodo, por sua vez, constitui elemento essencial para a formação dos hormônios tireoidianos, incluindo as formas metabolicamente ativas, denominadas de T3 (triiodotironina) e T4 (tetraiodotironina ou tiroxina). Estes hormônios regulam diversas ações metabólicas do organismo, tais como gasto calórico basal, ritmo cardíaco, desenvolvimento neurológico, dentre outras; praticamente todas as células do corpo humano possuem receptores de hormônios tireoidianos, localizados dentro do núcleo celular (SALVATORE et al, 2011). A síntese dos hormônios tireoidianos envolve diversas etapas, desde a captação do iodeto pelo tireócito, a oxidação do iodo pela enzima tireoperoxidase (TPO) e a posterior organificação, etapa dependente de proteína exclusiva da tireoide, a tireoglobulina (Tg).

Além das células foliculares produtoras de T3 e T4, a tireoide também é composta pelas células parafoliculares (também chamadas de células C), embriologicamente distintas (originárias da crista neural) e produtoras de calcitonina, hormônio que participa do metabolismo do cálcio e do fósforo (MACIEL, 2007).

O equilíbrio dos hormônios tireoidianos é mantido por um sistema de retroalimentação (*feedback*) que envolve a glândula hipófise (que, dentre outros hormônios, produz o TSH – hormônio estimulante da tireoide) e o núcleo paraventricular do hipotálamo (que produz o TRH – hormônio liberador de tireotrofina). Este sistema permite manter níveis estáveis de hormônio tireoidiano circulante, mesmo em situações de oscilação da ingestão de iodo (Figura 1) (SALVATORE et al, 2011). Alterações deste equilíbrio caracterizam as disfunções de aumento da produção de hormônios tireoidianos (hipertireoidismo) ou queda de sua síntese (hipotireoidismo).

Figura 1 – Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide



Fonte: adaptado de Cooper, Greenspan, e Ladenson (2007)

A glândula tireoide possui grande plasticidade, podendo aumentar várias vezes de tamanho, sob influência de estímulos como a ação do TSH ou de anticorpo que simula a ação deste hormônio (denominado de TRAb – anticorpo anti-receptor do TSH). O crescimento focal e anormal de um grupo de células da tireoide é denominado de nódulo tireoidiano (SCHLUMBERGER, FILETTI e HAY, 2011).

### 1.1 ASPECTOS GERAIS DA TUMORIGÊNESE TIREOIDIANA

O entendimento sobre a prevalência do nódulo tireoidiano na população em geral mudou consideravelmente nos últimos anos, especialmente com o advento da ultrassonografia. Do ponto de vista do exame clínico (inspeção e palpação), são detectados nódulos tireoidianos em cerca de 4% das mulheres e 1% dos homens em idade adulta, em regiões onde há adequada ingestão de iodo (ROSARIO et al, 2013). Entretanto, estudos utilizando ultrassonografia demonstram prevalências variando de 19% a até 67% da população estudada (COOPER et al, 2009). Estes dados demonstram um importante impacto da tumorigênese tireoidiana sobre as políticas públicas de saúde, haja vista que a grande maioria destes nódulos requer investigação adicional, dado que 5% a 15% destes nódulos

apresentam critérios para malignidade, conforme a população estudada (MORRIS et al, 2013).

Atualmente, acredita-se que o surgimento do nódulo tireoidiano decorre da combinação entre estímulos ambientais (dentre eles, o nível de consumo de iodo da população) e aspectos genéticos. O consumo deficiente de iodo tem o potencial de estimular a secreção hipofisária de TSH; por sua vez, o TSH é considerado um dos principais estímulos para o crescimento do tecido tireoidiano. Entretanto, a maioria dos indivíduos com bócio nodular apresenta níveis normais de TSH, o que sugere a participação de outros fatores de crescimento TSH-independentes na patogênese destes nódulos (SCHLUMBERGER, FILETTI e HAY, 2011). Um aspecto que contribui para o surgimento de nódulos em alguns pacientes é a baixa concentração intracelular de iodo, em virtude de fatores que impedem sua adequada captação pelo tireócito. Por exemplo, a alteração na expressão de TGF- $\beta$  (fator de crescimento tumoral beta), que tem papel inibitório sobre a proliferação celular do tireócito e outros tecidos epiteliais; mecanismos de resistência à ação de TGF- $\beta$  parecem favorecer a tumorigênese tireoidiana (KIMURA, MATSUO e RICARTE-FILHO, 2007). Outro mecanismo envolve a ação do tiocianato derivado do consumo do tabaco por fumantes (KROHN et al, 2005).

O Brasil, atualmente, tem sido considerado área com excesso de consumo de iodo, tendo por base estudos realizados principalmente no Sul-Sudeste do País (PEARCE, ANDERSSON e ZIMMERMANN, 2013). Entretanto, estudos de autópsia confirmam elevada prevalência de nódulos tireoidianos na população brasileira, com taxas em torno de 54% (MATOS, FERREIRA e WARD, 2006). O consumo excessivo de iodo tem o potencial de aumentar a incidência de tireoidite (processo inflamatório da tireoide de caráter crônico), mas a relação entre tireoidite e surgimento de nódulos tireoidianos e câncer permanece incerta (JANKOVIC, LE e HERSHMAN, 2013). Estudo de Veiga e colaboradores demonstrou maior incidência de câncer de tireoide na população da cidade de São Paulo em comparação a casuística representativa da população dos Estados Unidos da América; o consumo excessivo de iodo na população paulistana pode ser um fator contribuinte para este dado (VEIGA et al, 2013).

A maior prevalência dos nódulos tireoidianos e câncer de tireoide na população feminina tem sido objeto de investigação, com o estradiol (hormônio feminino) sendo identificado como um potente fator de crescimento para tecidos benignos e malignos de tireoide. Os mecanismos envolvem ativação de vias genômicas clássicas e não-genômicas, com efeitos na cascata de sinalização de MAPK e PI3K (DERWAHL e NICULA, 2014).



A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os tumores de tireoide em carcinomas, adenomas e outros tumores da tireoide (Tabela 1) (DELELLIS et al, 2004). A utilização do termo “carcinoma diferenciado da tireoide” (CDT) engloba as variantes papilífera e folicular, que juntas perfazem 95% dos casos de câncer de tireoide (COOPER et al, 2009).

Tabela 1 – Classificação histológica dos tumores primários da tireoide

| <b>Classificação histológica dos tumores primários da tireoide</b> |
|--------------------------------------------------------------------|
| <b>Carcinomas da Tireoide:</b>                                     |
| Carcinoma papilífero                                               |
| Carcinoma folicular                                                |
| Carcinoma pouco diferenciado                                       |
| Carcinoma indiferenciado (anaplásico)                              |
| Carcinoma de células escamosas                                     |
| Carcinoma mucoepidermoide                                          |
| Carcinoma mucoepidermoide esclerosante com eosinofilia             |
| Carcinoma mucinoso                                                 |
| Carcinoma medular da tireoide                                      |
| Carcinoma misto de células medulares e foliculares                 |
| Tumor de células fusiformes com diferenciação semelhante ao timo   |
| Carcinoma de tireoide com diferenciação semelhante ao timo         |
| <b>Adenomas da tireoide e tumores relacionados:</b>                |
| Adenoma folicular                                                  |
| Tumor trabecular hialinizante                                      |
| <b>Outros tumores da tireoide:</b>                                 |
| Teratoma                                                           |
| Linfoma primário e plasmocitoma                                    |
| Timoma ectópico                                                    |
| Angiossarcoma                                                      |
| Tumores de músculo liso                                            |
| Tumores periféricos de bainha nervosa                              |
| Paraganglioma                                                      |
| Tumor fibroso solitário                                            |
| Tumor folicular de células dendríticas                             |
| Histiocitose de células de Langerhans                              |

Fonte: adaptado de Delellis et al (2004)

## 1.2 CARCINOMA DIFERENCIADO DA TIREOIDE - EPIDEMIOLOGIA, CLASSIFICAÇÃO, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O carcinoma de tireoide representa a mais comum das neoplasias endócrinas (SCHLUMBERGER, FILETTI e HAY, 2011). Sua incidência vem crescendo de forma importante nos últimos anos, sendo o terceiro tipo de câncer com maior aumento de diagnóstico nos Estados Unidos da América (MORRIS et al, 2013). No Brasil, o câncer de

tireoide ocupa o quinto lugar dentre as neoplasias mais diagnosticadas em mulheres. Para o ano de 2014, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima a ocorrência de 9.200 novos casos de câncer de tireoide no Brasil, sendo 360 casos no Estado da Bahia (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2014). Atribui-se esta expansão do diagnóstico do câncer de tireoide à maior disponibilidade de exames diagnósticos, em especial a ultrassonografia, embora a influência ambiental não possa ser totalmente descartada (DAVIES e WELCH, 2006; MORRIS et al, 2013). Estudo recém-publicado revisou a influência de outros fatores na tumorigênese tireoidiana, dentre eles: mecanismos relacionados à resistência insulínica, ação de vírus, bem como disruptores endócrinos, tais como xenobióticos utilizados como pesticidas (MARCELLO et al, 2014). Em 95% dos casos, o diagnóstico do câncer de tireoide revela um carcinoma diferenciado da glândula (ROSARIO et al, 2013).

Alguns aspectos clínicos, tais como sexo masculino, histórico de irradiação cervical, idade menor que 20 ou maior que 70 anos, histórico familiar de câncer de tireoide ou síndromes genéticas associadas à doença (por exemplo: neoplasia endócrina múltipla tipo 2, síndrome de Cowden), nódulos de crescimento rápido ou endurecido à palpação, aumentam a chance de malignidade do nódulo tireoidiano. A ultrassonografia permite avaliar a composição, tamanho e características do nódulo, bem como o comprometimento de estruturas adjacentes à tireoide e linfonodos cervicais. Achados como acentuada hipocogenicidade, presença de microcalcificações, margens irregulares, vascularização predominantemente ou exclusivamente central ao Doppler são sugestivos de malignidade (ROSARIO et al. 2013).

O método de escolha para o diagnóstico da neoplasia maligna de tireoide é a punção aspirativa por agulha fina (PAAF), cuja evolução qualitativa contribuiu para reduzir o número de cirurgias consideradas desnecessárias (CIBAS e ALI, 2009). A PAAF está indicada em nódulos tireoidianos com diâmetro maior ou igual a 10 mm ao ultrassom, ou com diâmetro entre 5 e 10 mm associado a características clínicas ou ultrassonográficas que aumentem a suspeita de malignidade (ROSARIO et al, 2013). Com o advento da classificação de Bethesda (Tabela 2), a descrição citopatológica tornou-se mais consensual entre os diversos centros, possibilitando maior uniformidade de condutas (CIBAS e ALI, 2009). Considera-se que citologia tireoidiana com padrão Bethesda II tem risco estimado de malignidade entre 0 a 3%, enquanto que citologias com padrão Bethesda V e VI têm, respectivamente, risco de malignidade de 60-75% e 97-99% (CIBAS e ALI, 2009). Em 15 a 30% dos casos, o laudo citopatológico indica resultado inconclusivo para malignidade (categorias III e IV)

(ALEXANDER et al, 2012). Nestes casos, a análise de dados clínicos ou realização de exames adicionais (por exemplo: cintilografia) podem auxiliar na decisão terapêutica. O uso de técnicas de imuno-histoquímica e/ou testes moleculares envolvendo pesquisa de mutações ou rearranjos gênicos têm ganhado espaço, mas com impacto ainda incerto na definição de condutas (ROSARIO et al, 2013).

Tabela 2 – Sistema de Bethesda para laudo citopatológico da tireoide: risco de malignidade e manejo clínico recomendado

| <b>Sistema de Bethesda para laudo citopatológico da tireoide</b>                         |                                 |                                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>Categorias Diagnósticas</b>                                                           | <b>Risco de Malignidade (%)</b> | <b>Conduta usual<sup>1</sup></b>                  |
| I. Não-diagnóstica ou insatisfatória                                                     | 1-4%                            | Repetir PAAF, guiada por USG                      |
| II. Benigna                                                                              | 0-3%                            | Seguimento clínico                                |
| III. Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado | 5-15%                           | Repetir PAAF                                      |
| IV. Neoplasia folicular ou suspeita de neoplasia folicular                               | 15-30%                          | Lobectomia                                        |
| V. Nódulo suspeito de malignidade                                                        | 60-75%                          | Tireoidectomia total ou quase-total ou lobectomia |
| VI. Nódulo maligno                                                                       | 97-99%                          | Tireoidectomia total ou quase-total               |

Fonte: Adaptado de Cibas e Ali (2009).

A abordagem cirúrgica da glândula é considerada o tratamento inicial de escolha para o carcinoma diferenciado de tireoide (CDT). Ainda que exista alguma controvérsia na literatura, advoga-se atualmente a tireoidectomia total na maioria dos casos, com opções cirúrgicas que preservam parte da glândula (lobectomia) reservadas para casos excepcionais (ROSARIO et al, 2013). A retirada completa da glândula tem a vantagem de permitir o uso da tireoglobulina como marcador prognóstico do CDT, e da pesquisa de corpo inteiro (PCI) com radioiodo como método diagnóstico no seguimento clínico (COOPER et al, 2009).

O estadiamento do câncer de tireoide proposto pelo *American Joint Committee on Cancer/International Union against Cancer (AJCC/UICC)*, conhecido como sistema TNM (*tumor, node and metastasis*; tumor, linfonodo e metástase), permite adequada predição da mortalidade pela doença; entretanto, não tem boa correlação com a recorrência da neoplasia

<sup>1</sup> A conduta pode variar conforme outros fatores (características clínicas e/ou ultrassonográficas), além da citologia

(Tabela 3) (COOPER et al, 2009). O MACIS (*Metastases, Age, Complete Resection, Invasion, Size* – Metástase, Idade, Ressecção Completa, Invasão, Tamanho) da Mayo Clinic (EUA) (HAY et al, 1993) é outro sistema utilizado para avaliação prognóstica.

Diversos sistemas de predição de recorrência do câncer de tireoide, como o da Associação Americana de Tireoide (ATA) (COOPER et al, 2009), o da Associação Europeia de Tireoide (ETA) (PACINI et al, 2006), o da Sociedade Latinoamericana de Tireoide (LATS) (PITOIA et al, 2009) e o do Consenso Brasileiro de Tireoide (ROSARIO et al, 2013) têm sido propostos, sem evidências, até o momento, de superioridade de um sobre o outro (Tabela 4) (WONG, BRESEE e BRAUNSTEIN, 2013).

Para a maioria dos casos, está indicada a complementação terapêutica, após a abordagem cirúrgica, através da ablação com  $I^{131}$  (iodo radioativo). Em casos selecionados de muito baixo risco de recorrência, a radioiodoterapia pode ser dispensada (ROSARIO et al, 2013). A pesquisa de corpo inteiro (PCI), realizada após a ablação com  $I^{131}$ , auxilia na complementação do estadiamento dos pacientes com CDT (COOPER et al, 2009).

Tabela 3 – Sistema TNM de Classificação para o Carcinoma Diferenciado de Tireoide

| Sistema TNM de Classificação para o Carcinoma Diferenciado de Tireoide                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Tumor Primário (T)</b><br/>(todas as categorias podem ser subdivididas em (s) tumor solitário e (m) tumor multifocal; neste caso, o maior tumor determina a classificação)</p> <p><b>T0</b> sem evidência de tumor primário<br/> <b>T1a</b> tumor de 1 cm ou menos (maior diâmetro), limitado à tireoide<br/> <b>T1b</b> tumor maior que 1 cm mas até 2 cm (maior diâmetro), limitado à tireoide<br/> <b>T2</b> tumor maior que 2 cm mas até 4 cm (maior diâmetro), limitado à tireoide<br/> <b>T3</b> tumor maior que 4 cm (maior diâmetro) limitado à tireoide ou tumor de qualquer tamanho, com mínima extensão extratireoidiana (ex.: músculo esternotireoideo ou tecidos peritireoidianos)<br/> <b>T4a</b> doença moderadamente avançada - tumor de qualquer tamanho, com extensão além da cápsula tireoidiana e invadindo tecidos subcutâneos, laringe, traqueia, esôfago ou nervo laringeo recorrente.<br/> <b>T4b</b> doença muito avançada - tumor invadindo fáscia prevertebral, envolvendo a artéria carótida ou vasos mediastinais<br/> <b>TX</b> tumor primário não pode ser avaliado</p> | <p><b>Linfonodos Regionais (N)</b></p> <p><b>N0</b> sem metástases para linfonodos regionais<br/> <b>N1a</b> metástase para o nível VI (compartimento central)<br/> <b>N1b</b> metástase para o compartimento cervical lateral (níveis I, II, III, IV ou V) unilateral, bilateral ou contralateral ou para linfonodos mediastinais superiores (nível VII)<br/> <b>NX</b> linfonodos regionais não podem ser avaliados</p> | <p><b>Metástase à Distância (M)</b></p> <p><b>M0</b> ausência de metástase à distância<br/> <b>M1</b> presença de metástase à distância</p> |
| <b>Estádio Clínico</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>Idade Abaixo de 45 Anos</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>Idade Maior ou Igual a 45 Anos</b>                                                                                                       |
| Estádio I                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Qualquer T Qualquer N M0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | T1 N0 M0                                                                                                                                    |
| Estádio II                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Qualquer T Qualquer N M1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | T2 N0 M0                                                                                                                                    |
| Estádio III                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | T3 N0 M0                                                                                                                                    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | T1 N1a M0                                                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | T2 N1a M0                                                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | T3 N1a M0                                                                                                                                   |
| Estádio IVA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | T4a N0 M0                                                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | T4a N1a M0                                                                                                                                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | T1 N1b M0                                                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | T2 N1b M0                                                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | T3 N1b M0                                                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | T4a N1b M0                                                                                                                                  |
| Estádio IVB                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | T4b Qualquer N M0                                                                                                                           |
| Estádio IVC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Qualquer T Qualquer N M1                                                                                                                    |

Fonte: (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2010), adaptado.

A terapia de reposição com doses elevadas de levotiroxina, visando a supressão do TSH, objetiva limitar o trofismo do TSH sobre eventuais remanescentes tireoidianos; esta estratégia comprovadamente reduz a recorrência a longo prazo, devendo ser iniciada logo após a tireoidectomia, caso não haja contra-indicações (ROSARIO et al, 2013). Indica-se supressão mais importante (TSH abaixo de 0,1 mU/L) em pacientes com risco elevado ou intermediário de recorrência da doença e níveis mais brandos (TSH entre 0,1 e 0,5 mU/L) em pacientes de baixo risco (COOPER et al, 2009). Entretanto, atualmente sugere-se que pacientes com evolução clínica favorável tenham a indicação da terapia supressiva reavaliada

constante ao longo do seguimento, haja vista evidências de aumento de risco de comprometimento da massa óssea (ROSARIO et al, 2013) e de alterações cardiovasculares a longo prazo (KLEIN HESSELINK et al, 2013). O impacto combinado da abordagem cirúrgica associada à ablação com  $I^{131}$  e à supressão do TSH na redução de mortalidade já foi demonstrado em seguimento de longo prazo (MAZZAFERRI e JHIANG, 1994).

A despeito das taxas crescentes de diagnóstico do carcinoma diferenciado de tireoide, a mortalidade relacionada à doença permanece estável, o que indica que a maior parte dos casos detectados atualmente corresponde a neoplasias de baixa agressividade, com evolução subclínica na maior parte dos pacientes (ESSERMAN, THOMPSON e REID, 2013). Entretanto, mesmo carcinomas diferenciados inicialmente estratificados como de baixo risco (por exemplo: microcarcinomas) podem evoluir com comportamento mais agressivo (NIKIFOROV, 2011). Neste contexto, o avanço das técnicas de Biologia Molecular abre um novo campo na estratégia diagnóstica e terapêutica do CDT.

Tabela 4 – Comparação dos sistemas de estratificação de risco de doença recorrente/persistente

| <b>Risco</b>         | <b>ATA</b><br>(Associação Americana de Tiroide)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <b>ETA</b><br>(Associação Europeia de Tiroide)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <b>LATS</b><br>(Sociedade Latinoamericana de Tiroide)                                                                                                                                                                                                                                                | <b>SBEM</b><br>(Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Muito baixo</b>   | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Todos os seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Unifocal</li> <li>• &lt; 1 cm</li> <li>• N0M0, sem extensão extra-tireoidiana</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                          | Todos os seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Unifocal</li> <li>• &lt; 1 cm</li> <li>• N0M0, sem extensão extra-tireoidiana</li> </ul>                                                                                                                                      | Todos os seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none"> <li>• ≤ 1 cm sem extensão extra-tireoidiana (pT1a) ou 1-2 cm unifocal sem extensão extra-tireoidiana (pT1b)</li> <li>• Ressecção tumoral completa</li> <li>• Sem subtipo histológico agressivo<sup>2</sup></li> <li>• Sem invasão vascular</li> <li>• cN0<sup>§§</sup>M0</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>Baixo</b>         | Todos os seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualquer tamanho, intratireoidiano, N0M0</li> <li>• Ressecção tumoral macroscópica completa</li> <li>• Sem extensão extra-tireoidiana</li> <li>• Sem subtipo histológico agressivo<sup>§</sup></li> <li>• Sem invasão vascular</li> <li>• Sem captação fora do leito tireoidiano do I<sup>131</sup> na PCI pós-dose, se realizada</li> </ul> | Todos os seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Unifocal ou multifocal, 1-4 cm, intratireoidiano</li> <li>• N0M0</li> <li>• Sem extensão extra-tireoidiana</li> <li>• Sem subtipo histológico agressivo<sup>§</sup></li> <li>• Sem invasão vascular</li> <li>• Sem captação fora do leito tireoidiano do I<sup>131</sup> na PCI pós-dose, se realizada</li> </ul> | Todos os seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1-4 cm, intratireoidiano</li> <li>• N0M0</li> </ul>                                                                                                                                                                           | Uma das combinações abaixo: <ul style="list-style-type: none"> <li>• ≤ 4 cm sem extensão extra-tireoidiana + cN0<sup>§§</sup></li> <li>• ≤ 2 cm sem extensão extra-tireoidiana (pT1) + N1a (máx. 3 LN)</li> <li>• ≤ 2 cm com extensão extra-tireoidiana mínima (pT3) + cN0<sup>§§</sup></li> </ul> Associada a todos os seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none"> <li>• M0</li> <li>• Sem subtipo histológico agressivo<sup>§</sup></li> <li>• Ressecção tumoral completa</li> <li>• Sem invasão vascular</li> <li>• Sem captação fora do leito tireoidiano do I<sup>131</sup> na PCI pós-dose, se realizada</li> </ul>         |
| <b>Intermediário</b> | Qualquer dos seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none"> <li>• N1</li> <li>• Extensão extra-tireoidiana mínima</li> <li>• Tumor com subtipo histológico agressivo<sup>§</sup></li> <li>• Invasão vascular</li> <li>• Captação fora do leito tireoidiano do I<sup>131</sup> na PCI pós-dose, se realizada</li> </ul>                                                                                     | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Uma das combinações abaixo: <ul style="list-style-type: none"> <li>• ≤ 4 cm com extensão extra-tireoidiana mínima (pT3) + N1a (máx. 3 LN)</li> <li>• 2-4 cm sem extensão extra-tireoidiana (pT2) + N1a (máx. 3 LN)</li> <li>• 2-4 cm com extensão extra-tireoidiana mínima (pT3) + cN0<sup>3</sup></li> </ul> Ou presença de pelo menos um dos seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none"> <li>• &gt; 4 cm</li> <li>• 4-10 LN acometidos ou 1-3 LN com extensão extra-capsular</li> <li>• Tumor com subtipo histológico agressivo<sup>§</sup></li> <li>• Captação cervical ectópica do I<sup>131</sup> na PCI pós-dose</li> </ul> |
| <b>Alto</b>          | Qualquer dos seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ressecção tumoral incompleta</li> <li>• Extensão extra-tireoidiana macroscópica</li> <li>• Metástases à distância</li> <li>• Tireoglobulina pós-operatória elevada</li> </ul>                                                                                                                                                            | Qualquer dos seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none"> <li>• N1</li> <li>• &gt; 4 cm</li> <li>• Extensão extra-tireoidiana (T3-T4)</li> <li>• Metástases à distância</li> </ul>                                                                                                                                                                                            | Qualquer dos seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none"> <li>• N1</li> <li>• &gt; 4 cm (&gt; 45 anos de idade)</li> <li>• Extensão extra-tireoidiana (&gt; 45 anos de idade)</li> <li>• Metástases à distância</li> <li>• Tumor com subtipo histológico agressivo<sup>§</sup></li> </ul> | Qualquer dos seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Invasão extra-tireoidiana extensa (pT4)</li> <li>• &gt; 10 LN acometidos ou &gt; 3 LN com extensão extra-capsular ou LN metastático &gt; 3 cm</li> <li>• Ressecção tumoral incompleta</li> <li>• Metástases à distância</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

Fonte: adaptado de: (ROSARIO et al, 2013); (MOMESSO e TUTTLE, 2014).

<sup>2</sup> São considerados subtipos histológicos agressivos: variante de células altas, variante insular, carcinoma de células colunares

<sup>3</sup> cN0: sem metástases em USG pré e avaliação perioperatória, com (pN0) ou sem (pNx) dissecação eletiva

### 1.3 BASES MOLECULARES DO CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIREOIDE

O advento das técnicas de Biologia Molecular abriu um novo e amplo leque de possibilidades diagnósticas e terapêuticas no campo da Oncologia. O avanço no conhecimento do genoma humano e das estratégias de sua manipulação trouxe consigo significativa mudança na forma de entender os fenômenos responsáveis pela oncogênese nos diferentes tecidos, bem como possibilitou melhor individualização do tratamento (MCDERMOTT, DOWNING e STRATTON, 2011).

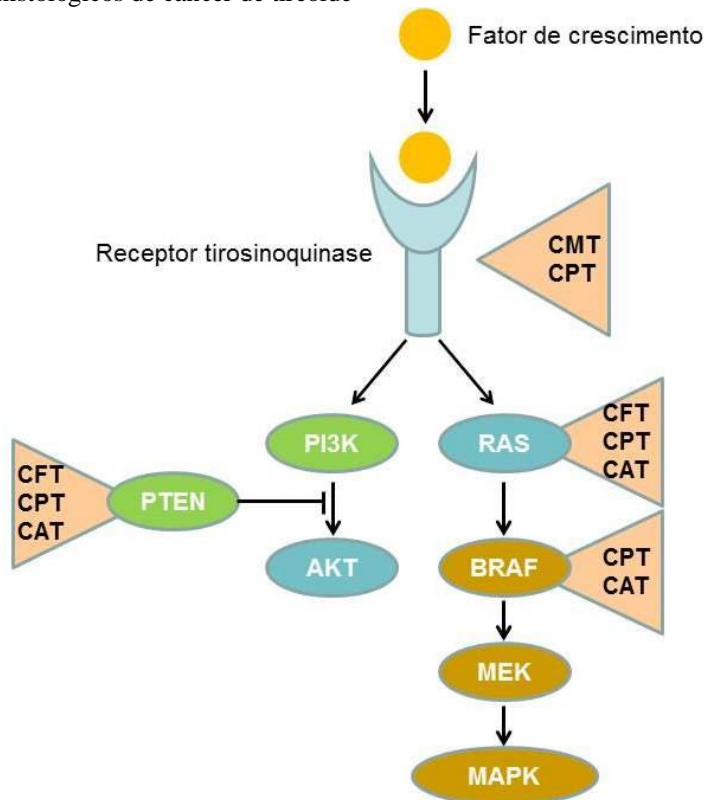
Em relação ao CDT, as evidências atuais indicam que 70% dos tumores originam-se de alterações relacionadas com a via de sinalização da MAPK (proteína quinase de ativação por mitógenos) (Figura 2) (NIKIFOROV, 2008).

O clássico trabalho de Kimura e colaboradores demonstrou o papel da mutação V600E do gene *BRAF* (quinase RAF do tipo B), um potente ativador da via da MAPK, no desenvolvimento do carcinoma diferenciado de tireoide (KIMURA et al, 2003). A mutação T1799A do *BRAF*, levando à alteração V600E da cadeia de aminoácidos (troca do aminoácido valina pelo glutamato), é encontrada em 40% dos carcinomas papilíferos de tireoide (Tabela 5). Na proteína *BRAF* nativa, em estado desfosforilado, as interações hidrofóbicas entre a alça de ativação e o sítio de ligação de ATP mantém a proteína em conformação inativa. A substituição V600E altera este estado e permite a formação de novas interações, que mantém a proteína em conformação apta para o processo catalítico, resultando em contínua fosforilação de MEK (NIKIFOROV, 2008).

Esta alteração foi associada em diversos estudos a maior agressividade tumoral, maior recorrência de doença, refratariedade ao radioiodo e pior prognóstico clínico, incluindo aumento de mortalidade (XING et al, 2013). Estes dados têm levado à valorização da mutação  $BRAF^{V600E}$  como marcador prognóstico e possível alvo terapêutico (XING, 2010). Entretanto, recente metanálise indicou que a correlação entre a positividade para a mutação  $BRAF^{V600E}$  e o prognóstico tumoral ainda carece de estudos melhor desenhados, que tragam mais evidências que possibilitem o uso seguro deste dado na prática clínica (LI et al, 2012). Além disso, vêm surgindo questionamentos na literatura sobre o uso isolado da mutação  $BRAF^{V600E}$  como marcador de prognóstico, sugerindo que outros fatores ainda não elucidados podem interferir na ação tumorigênica do *BRAF* (SANCISI et al, 2012; CIAROCCHI, CAVUTO e PIANA, 2013; GANDOLFI et al, 2013; LI et al, 2013; SHIMAMURA et al, 2013).



Figura 2<sup>4</sup> – Principais sítios de alterações de vias de sinalização intracelular relacionadas com os diferentes tipos histológicos de câncer de tireoide



Fonte: adaptado de: (CARLOMAGNO e SANTORO, 2011).

Outra alteração molecular muito frequente no carcinoma diferenciado de tireoide é a da família de genes *RAS* (acrônimo para “*rat sarcoma*” - sarcoma de rato), que inclui *H-RAS*, *K-RAS* e *N-RAS* (NIKIFOROV, 2008). Estes genes codificam proteínas G, que estão localizadas na porção interior da membrana celular, desempenhando papel central na transdução intracelular de sinais originados de receptores de membrana com atividade tirosinoquinase e receptores acoplados à proteína G. Em seu estado inativo, a proteína RAS está ligada ao GDP (guanosina difosfato). Ao ser ativada, ela libera o GDP e liga-se ao GTP (guanosina trifosfato), ativando MAPK e outras vias de sinalização, como PI3K/AKT. Normalmente, a proteína RAS-GTP torna-se rapidamente inativada devido à sua atividade intrínseca de GTPase (guanosina trifosfatase) e pela ação de proteínas citoplasmáticas com atividade GTPase, que catalisam a conversão da forma ativa ligada ao GTP para a forma inativa ligada ao GDP. Em humanos, mutações pontuais ocorrem em diferentes sítios do gene *RAS*, levando tanto a aumento da afinidade pelo GTP (mutações nos códon 12 e 13) ou

<sup>4</sup> Legenda: CAT – carcinoma anaplásico de tireoide; CFT – carcinoma folicular de tireoide; CMT – carcinoma medular de tireoide; CPT – carcinoma papilífero de tireoide

inativação da função GTPase autocatalítica (mutações no códon 61). Como resultado, a proteína mutada mantém-se permanentemente na forma ativada, estimulando constitutivamente as vias posteriores (*downstream*) de sinalização (NIKIFOROV, 2008).

A mutação do gene *RAS* ocorre em até 45% dos casos de carcinoma folicular de tireoide; no carcinoma papilífero, sua frequência é menor, por volta de 10% dos casos, mas está associada, em alguns estudos, a maior agressividade tumoral, incluindo presença de metástases à distância (HOWELL, HODAK e YIP, 2013). Mutações do gene *RAS* podem predispor à desdiferenciação tumoral, visto que são encontradas frequentemente em carcinomas anaplásicos (indiferenciados) da tireoide. Isto pode dever-se ao efeito da proteína *RAS* mutada promover instabilidade cromossômica, o que já foi documentado em estudos *in vitro*. Mutações do gene *RAS*, entretanto, não são específicas de malignidade tireoidiana e também ocorrem em adenomas foliculares benignos (NIKIFOROV, 2008).

Outras alterações genéticas relacionadas com o CDT (Tabela 5) incluem: a) o rearranjo *RET/PTC* (fusão do domínio tirosinoquinase do gene *RET* com porções 5' de genes heterólogos no CDT), presente em 25% dos pacientes com carcinoma papilífero de tireoide – os mais comuns são o rearranjo *RET/PTC1* (fusão do domínio tirosinoquinase com a região 5'-terminal do gene *H4*, também chamado *CCDC6*) e *RET/PTC3* (fusão do domínio tirosinoquinase com o gene *NCOA4*) (FUSCO e SANTORO, 2007; NIKIFOROV, 2011); b) o rearranjo *PAX8/PPAR $\gamma$* , que leva à fusão dos genes *PAX8* e *PPAR $\gamma$* , com a formação de nova proteína denominada PFP (proteína de fusão *PAX8-PPAR $\gamma$* ), já caracterizada *in vitro* e *in vivo* como oncoproteína (RAMAN e KOENIG, 2014); c) mutação do gene *PTEN*, que atua como supressor tumoral ao inibir a via *PI3K/AKT* (Figura 2). Apesar de infrequente na casuística geral de CDT (menos de 10% dos casos), portadores da chamada Síndrome de Cowden (relacionada com a mutação *PTEN*, caracterizada pelo desenvolvimento de hamartomas em diferentes partes do corpo, além de pólipos intestinais e neoplasias de mama) têm risco elevado de desenvolvimento de carcinoma folicular de tireoide (NAGY et al, 2011; NGEOW et al, 2014).

Recentemente, mutações do gene *TERT* (transcriptase reversa da telomerase) foram descritas como novos preditores de agressividade tumoral em câncer de tireoide, com prevalência estimada em 7,5% dos carcinomas papilíferos, 17,1% dos carcinomas foliculares e até 33,3% dos carcinomas pouco diferenciados e anaplásicos. A presença de mutação do gene *TERT* correlacionou-se com doença persistente e aumento de mortalidade em CDT (MELO et al, 2014).

Tabela 5 – Prevalência Média de Mutações no Carcinoma Diferenciado de Tireoide

| <b>Tipo Histológico de Tumor</b> | <b>Alteração Genética</b>                     | <b>Prevalência (em %)</b> |
|----------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------|
| <b>Carcinoma Papilífero</b>      | Mutação <i>BRAF</i>                           | 45%                       |
|                                  | Rearranjo <i>RET/PTC</i>                      | 25%                       |
|                                  | Mutação <i>RAS</i>                            | 10%                       |
|                                  | Mutação <i>TERT</i>                           | 7,5%                      |
|                                  | Mutação <i>TRK</i>                            | < 5%                      |
| <b>Carcinoma Folicular</b>       | Mutação <i>RAS</i>                            | 45%                       |
|                                  | Rearranjo <i>PAX8/PPAR<math>\gamma</math></i> | 35%                       |
|                                  | Mutação <i>TERT</i>                           | 17%                       |
|                                  | Mutação <i>PIK3CA</i>                         | < 10%                     |
|                                  | Mutação <i>PTEN</i>                           | < 10%                     |

Fonte: adaptado de: (NIKIFOROV e NIKIFOROVA, 2011); (MELO et al, 2014).

O melhor entendimento das alterações genéticas relacionadas ao câncer de tireoide vem possibilitando o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas e terapêuticas. Um exemplo é o desenvolvimento de painéis genéticos que permitem melhor predição do risco de neoplasia maligna em pacientes submetidos à PAAF de tireoide, cujo resultado não foi conclusivo (classificação de Bethesda III, IV e V). O conceito de sistema de classificação gênica (GEC, na sigla em inglês) foi elaborado a partir da necessidade de melhor definição da conduta terapêutica em pacientes cujo resultado da PAAF mostra-se inconclusivo, mas com baixa probabilidade pré-teste de malignidade (categorias de Bethesda III e IV); para esta situação, o ideal seria o desenvolvimento de testes com alto valor preditivo negativo, visando evitar cirurgias consideradas desnecessárias (MON e HODAK, 2014).

Alexander e colaboradores desenvolveram um sistema baseado em GEC (Afirma<sup>®</sup>, Veracyte, Inc., San Francisco, CA) composto por análise de mRNA de 167 genes, que demonstrou alta sensibilidade e valor preditivo negativo, com potencial de redução de pelo menos 1/3 (um terço) das cirurgias usualmente realizadas nesta condição clínica (ALEXANDER et al, 2012). Já Nikiforov e colaboradores desenvolveram um painel com base em mutações e rearranjos preditores de malignidade (H-RAS, K-RAS, N-RAS, BRAF<sup>V600E</sup>, RET/PTC1, REC/PTC3, PAX8/PPAR $\gamma$ ) com alta especificidade para a confirmação de malignidade em citologias previamente consideradas indeterminadas (miRInformThyroid<sup>™</sup>, InterPaceDiagnostics, Parsippany, NJ) (NIKIFOROV et al, 2011).

A possibilidade de uso de fármacos que atuam nas vias de sinalização celular relacionadas com este tipo específico de câncer, sobretudo em pacientes que demonstram refratariedade à terapia com radioiodo, representa o principal potencial da melhor compreensão dos mecanismos moleculares da oncogênese tireoidiana. Os estudos neste campo ainda são incipientes, mas recentemente Brose e colaboradores demonstraram a

eficácia do sorafenibe, fármaco que atua bloqueando receptores de fatores angiogênicos como VEGFR-1, VEGFR-2, e VEGFR-3, bem como bloqueando a ação de RET (incluindo os rearranjos RET/PTC), RAF (incluindo BRAF<sup>V600E</sup>) e do receptor para o fator de crescimento derivado de plaquetas  $\beta$ . Em estudo de fase 3, o fármaco demonstrou eficácia na manutenção de sobrevida livre de doença, com razoável perfil de tolerabilidade (BROSE et al, 2014). Em carcinomas de tireoide que apresentam o rearranjo *PAX8-PPAR $\gamma$*  e consequente expressão de PFP, o uso do agonista PPAR $\gamma$  pioglitazona, originalmente desenvolvido para tratamento de *diabetes mellitus* tipo 2, demonstrou redução dramática do tamanho tumoral e prevenção de metástases à distância (RAMAN e KOENIG, 2014).

Com o avanço do estudo da Genética Clínica, demonstrou-se que apenas as alterações estruturais do genoma (mutações) não são capazes de explicar completamente o desenvolvimento e a progressão do câncer. Partindo desta premissa, chegou-se ao conceito de epigenética, definida como "mudança herdável do padrão de expressão gênica, mediada por outros mecanismos que não alterações na sequência primária de nucleotídeos de um gene" (HERMAN e BAYLIN, 2003).

#### 1.4 EPIGENÉTICA E CÂNCER DE TIREOIDE

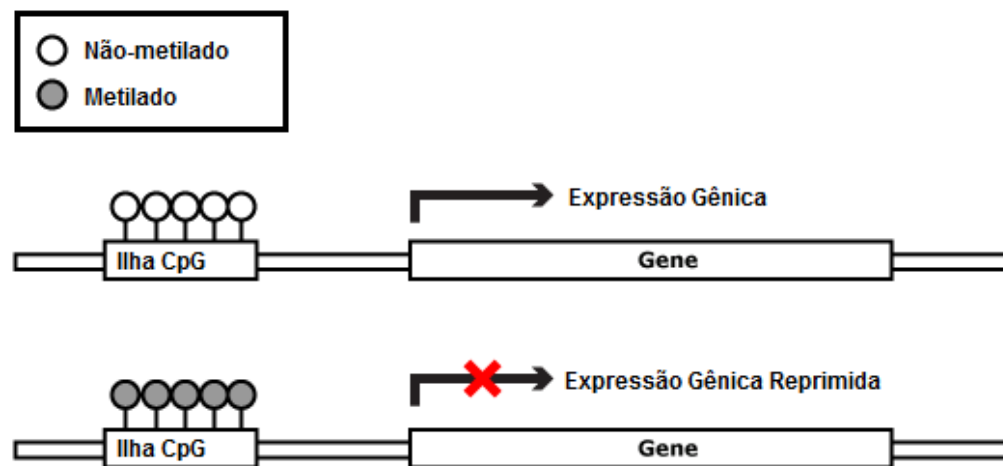
O primeiro uso do termo epigenética (do grego "*epi*" = além + "genética"), antes mesmo da descoberta do DNA por Watson e Crick, coube a C.H. Waddington, que, em 1939, durante estudos com *Drosophila melanogaster*, usou o termo para definir "as interações causais entre os genes e seus produtos, que por fim constituem o fenótipo" (ESTELLER, 2008).

Posteriormente, com o melhor entendimento do genoma humano e suas múltiplas interfaces, chegou-se ao conhecimento atualmente estabelecido do processo de regulação epigenética, que consiste em três mecanismos principais: a) hipermetilação da região promotora de genes; b) deacetilação de histonas, e c) ação pós-transcricional de pequenos fragmentos de RNA não-codificantes de proteínas, os chamados RNA interferentes (RNAi), representados principalmente pelos microRNA's (miRNA) e pelos pequenos RNA's interferentes (siRNA) (ESTELLER, 2008).

A influência de mecanismos epigenéticos relacionados à hipermetilação de genes candidatos no processo de tumorigênese, causando silenciamento gênico aberrante, vem

ganhando relevância no entendimento da transformação maligna (HERMAN e BAYLIN, 2003). Em humanos, a metilação do DNA ocorre pela ligação covalente de um grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) ao carbono na posição 5 da citosina de um dinucleotídeo CpG (citosina que precede guanina), que se transformará em 5-metilcitosina. As regiões promotoras de diversos genes, incluindo muitos relacionados com a oncogênese de diversos tecidos, abrigam regiões ricas em sequências CpG, por isso chamadas de “ilhas CpG”. Através da ação de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs), que usam como doador do grupo metil a S-adenosil-metionina, a hipermetilação das ilhas CpG impede a adequada transcrição da sequência gênica (Figura 3) (ESTELLER, 2008).

Figura 3 – Processo de silenciamento gênico através da hipermetilação da região promotora



Fonte: elaborado pelo autor

O processo de metilação aberrante já foi detectado em genes supressores de tumor (*PTEN*, *RASSF1A*, *TIMP3*, *SLC5A8*, *DAPK*, *RARβ2*), genes associados a apoptose (*DAPK*, *CASP8*) e de reparo do DNA (*hMLH1*, *MGMT*) (ESTELLER, 2008). A compreensão atual da oncogênese indica que as alterações na regulação epigenética da atividade genômica são tão importantes para a tumorigênese quanto as alterações diretas do código genômico (PLASS et al, 2013).

Por sua vez, o estudo de alterações epigenéticas relacionadas ao câncer de tireoide tem avançado ao longo dos anos (CATALANO, FORTUNATI e BOCUZZI, 2012; RODRIGUEZ-RODERO, 2013). Vários genes envolvidos no controle da proliferação celular e invasão, bem como genes específicos relacionados com a diferenciação tireoidiana, estão epigeneticamente silenciados no câncer de tireoide (Tabela 6). Alguns genes, como *RASSF1A*, apresentam aumento de metilação tanto em tumores foliculares benignos (33 a 44%) como em

carcinoma papilífero (aproximadamente 70%), sugerindo que a hipermetilação e consequente repressão epigenética de alguns genes constitui evento precoce na tumorigênese tireoidiana (KONDO, ASA e EZZAT, 2008). As evidências atuais indicam que alterações epigenéticas cumulativas participam do processo de progressão sequencial do carcinoma bem diferenciado da tireoide para carcinomas metastatizantes, dentro do espectro do surgimento do carcinoma pouco diferenciado e indiferenciado de tireoide (CATALANO, FORTUNATI e BOCUZZI, 2012).

Tabela 6 – Alterações Epigenéticas no Câncer de Tireoide

|                                                               | <b>Gene</b>                          |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Genes envolvidos em controle de proliferação e invasão</b> | <i>p16<sup>INK4A</sup></i>           |
|                                                               | <i>RASSF1A</i>                       |
|                                                               | <i>PTEN</i>                          |
|                                                               | <i>Rap1GAP</i>                       |
|                                                               | <i>TIMP3</i>                         |
|                                                               | <i>DAPK</i>                          |
|                                                               | <i>RARβ2</i>                         |
|                                                               | E-caderina                           |
|                                                               | <i>DKK3</i>                          |
|                                                               | <b>Genes específicos da tireoide</b> |
| <i>NIS</i>                                                    |                                      |
| receptor do TSH                                               |                                      |
| pendrina                                                      |                                      |
| <i>SLC5A8</i>                                                 |                                      |
| <i>TTF-1</i>                                                  |                                      |

Fonte: adaptado de: (CATALANO, FORTUNATI e BOCUZZI, 2012); (YIN et al, 2013).

Há evidências de que a positividade para a mutação  $BRAF^{V600E}$  correlaciona-se com a hipermetilação de alguns genes, como os que codificam metaloproteínas como o *TIMP3* e o receptor do ácido retinoico, *RARβ2* (XING, 2007b). Por outro lado, a positividade para a mutação  $BRAF^{V600E}$  é mutuamente exclusiva para a hipermetilação de um gene supressor tumoral, o *RASSF1A* (XING, 2007b). O mecanismo pelo qual a mutação  $BRAF^{V600E}$  induz maior refratariedade ao radioiodo parece envolver alterações epigenéticas na expressão de *NIS* (simportador de sódio-iodo), através da ação de deacetilases de histonas (ZHANG et al, 2014).

Hoque e colaboradores estudaram a hipermetilação de diferentes genes envolvidos na tumorigênese tireoidiana (*RASSF1A*, *TSHR*, *RARβ2*, *DAPK*, *S100*, *p16*, *CDH1*, *CALCA*, *TIMP3*, *TGF-β* e *GSTpi*), em busca de escores de quantificação por metodologia de QMSP (reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real, específica para metilação) que pudessem ser aplicados na prática clínica para diferenciação entre tecidos benignos e

malignos em situações de dúvida diagnóstica, por exemplo, PAAF com resultado indeterminado. Os resultados demonstraram que a metilação gênica não seguiu um padrão uniforme em tecidos benignos e malignos, sendo identificados fatores interferentes no padrão de metilação, como a já citada mutação BRAF<sup>V600E</sup> (HOQUE et al, 2005). Este estudo demonstrou que a identificação de um bom gene candidato para estudo de hipermetilação não é simples, mesmo utilizando um amplo painel de genes e metodologias quantitativas de análise de metilação.

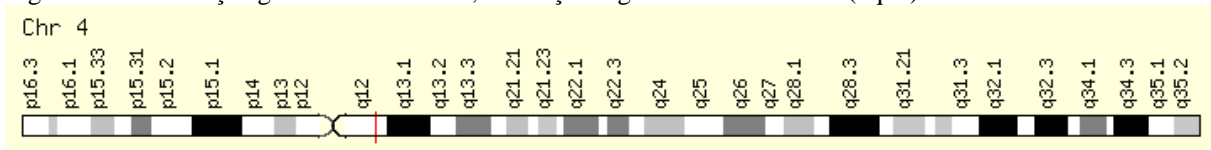
Weisenberg e colaboradores (2006) propuseram em 2006 o conceito de CIMP (fenótipo metilador de ilha CpG), que estabelece um subtipo de tumores com importante metilação de ilhas CpG, o que estaria correlacionado com alterações genéticas, como a mutação BRAF em tumores colorretais (WEISENBERG et al, 2006).

A identificação de alvos epigeneticamente silenciados traz consigo a possibilidade da reversão destas alterações, com conseqüente reativação gênica. As chamadas drogas epigenéticas têm como alvo dois dos principais mecanismos de alteração epigenética, a hipermetilação do DNA e a deacetilação de histonas (CATALANO, FORTUNATI e BOCUZZI, 2012). Até o momento, algumas drogas têm sido testadas em pequenos estudos de fase I e fase II. A decitabina, também chamada de 5-aza-2'-deoxicitidina ou 5-azacitidina, droga inibidora das metiltransferases, foi testada em pacientes com câncer de tireoide metastático refratário ao tratamento com radioiodo, com resultados ainda não publicados (CATALANO, FORTUNATI e BOCUZZI, 2012). O vorinostat, também conhecido como SAHA, tem ação direta inibitória sobre as deacetilases de histonas. Em estudo de fase I com 6 pacientes, o vorinostat demonstrou eficácia parcial em pelo menos 2 casos; estudo posterior de fase II não demonstrou eficácia em monoterapia em pacientes com carcinoma avançado de tireoide, mas o estudo indica a possível utilidade quando combinado com outras drogas (WOYACH et al, 2009). Estudos com ênfase na exploração de novos mecanismos de controle epigenético do câncer de tireoide têm o potencial de descoberta de novos alvos terapêuticos (XING, 2007a).

## 1.5 O PAPEL DO *HOPX* COMO GENE SUPRESSOR TUMORAL

O gene *homeobox HOP* (*HOPX* – homeodomain-only protein X, GenBank NT 022853), também citado na literatura como *NECCI*, *LAGY* ou *OBI*, localiza-se no braço longo do cromossomo 4 (4q12) (Figura 4). Inicialmente foi identificado como gene essencial para a modulação do crescimento e desenvolvimento cardíaco (CHEN et al, 2002; CHEN et al, 2007). *HOPX* compõe a família de genes *homeobox*, caracterizados por apresentar significativa homologia com fatores de transcrição homeóticos (reguladores), conservados no processo evolutivo ao longo de milhões de anos, mantendo relativa similaridade em todos os metazoários. *HOPX* faz parte desta família, mas tem a peculiaridade de, diferente da maioria das proteínas codificadas por outros genes *homeobox*, chamadas de proteínas *homeodomain*, não conservar sítios de ligação de DNA (ABATE-SHEN, 2002; KOOK et al, 2006).

Figura 4 – Localização genômica de *HOPX*, no braço longo do cromossomo 4 (4q12)

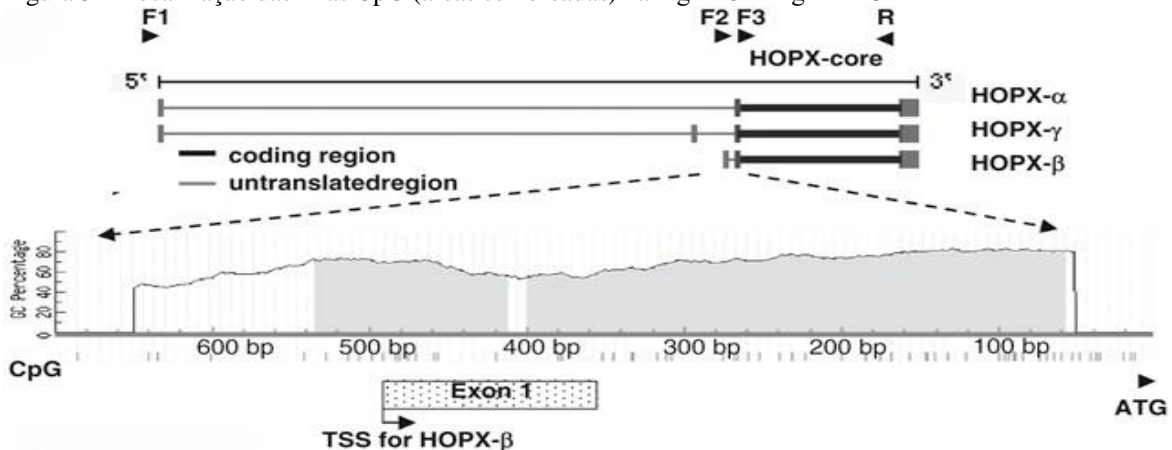


Fonte: Disponível em: <<http://genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HOPX>>. Acesso em: 20 out. 2014.

Três variantes de transcrição – *HOPX-α* (NM 139212.2), *HOPX-β* (NM 139211.2) e *HOPX-γ* (NM 032495.4) – codificam a mesma proteína, que age como um adaptador mediando a transcrição gênica. Apenas o promotor do *HOPX-β* abriga sítios CpG abrangendo o primeiro intron e exon (Figura 5) (OOKI et al, 2010). A expressão do *HOPX* é amplamente disseminada em tecidos normais, onde foi demonstrado que o *HOPX* inibe a ativação de fatores transcricionais através do recrutamento de enzimas deacetiladoras de histonas (OOKI et al, 2010). Por outro lado, a baixa expressão do *HOPX* em modelos celulares de células de cólon foi considerada preditiva de transformação neoplásica em estudos com ratos (Tabela 8) (DAVIDSON et al, 2012). Em camundongos com *knockout* em homozigose para o gene *HOPX*, observou-se elevada letalidade intraútero, com retardo do desenvolvimento fetal e hipoplasia cardíaca associados (SHIN et al, 2002). Não há descrição na literatura do fenótipo tireoidiano em cobaias com *knockout* de *HOPX*.



Figura 5 – Localização das ilhas CpG (áreas sombreadas) na região 5' do gene *HOPX*



Fonte: adaptado de: (YAMASHITA, KATOH e WATANABE, 2013).

Yamaguchi e colaboradores (2009) estudaram 44 espécimes de tecido de carcinoma endometrial humano e compararam com 4 controles (tecido endometrial benigno). A análise do mRNA do *HOPX* demonstrou diminuição da expressão nos tecidos malignos e a análise de hipermetilação demonstrou que a ação epigenética sobre o promotor do *HOPX* contribuiu para a progressão tumoral (YAMAGUCHI et al, 2009). Asanoma e colaboradores analisaram uma linhagem de coriocarcinoma, e detectaram ausência de expressão do *HOPX/NECC1* neste tipo de câncer, em contrapartida à expressão normal em tecido placentário não-tumoral. A transfecção do gene do *HOPX/NECC1* nesta linhagem celular possibilitou a progressão do tecido para sinciciotrofoblasto, demonstrando que a redução da expressão do *HOPX/NECC1* está envolvida na tumorigênese do coriocarcinoma (ASANOMA et al, 2003).

Ooki e colaboradores (2010) avaliaram a expressão de *HOPX*, bem como o padrão de hipermetilação de sua região promotora, em 10 amostras de câncer gástrico, comparativamente com tecido não-tumoral extraído da mesma peça cirúrgica (5 cm ou mais de distância do tecido tumoral). A expressão de mRNA de *HOPX* foi indetectável em 80% das amostras tumorais e em todas as linhagens celulares de câncer gástrico estudadas. A hipermetilação do *HOPX* ocorreu em 90% dos tumores, taxa considerada elevada e similar aos genes com hipermetilação mais prevalente neste tipo de neoplasia, tais como *CDH4*, *Integrin $\alpha$ 4* e *KLF4*; em contrapartida, apenas 10% do tecido não-tumoral apresentava a hipermetilação do promotor do *HOPX* (OOKI et al, 2010). Neste estudo, também foi demonstrada correlação significativa ( $p = 0,029$ ) da hipermetilação do *HOPX* com pior prognóstico após análise multivariada (OOKI et al, 2010).

Tabela 7 – Relação entre o gene *HOPX* e diferentes tipos de câncer em humanos

| Tipo de Câncer   | Histologia                     | Expressão do <i>HOPX</i> | Hipermetilação do DNA | Relevância Prognóstica |
|------------------|--------------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|
| Pulmão           | Carcinoma de células escamosas | Reduzida no câncer       | Não avaliada          | Não avaliada           |
|                  | Adenocarcinoma                 | Reduzida no câncer       | Não avaliada          | SIM                    |
| Placenta         | Trofoblasto                    | Reduzida no câncer       | Não avaliada          | Não avaliada           |
| Cabeça e Pescoço | Carcinoma de células escamosas | Reduzida no câncer       | Não avaliada          | Não avaliada           |
| Esôfago          | Carcinoma de células escamosas | Reduzida no câncer       | Propensa ao câncer    | SIM                    |
| Útero            | Carcinoma de endométrio        | Reduzida no câncer       | Propensa ao câncer    | Não avaliada           |
| Estômago         | Adenocarcinoma                 | Reduzida no câncer       | Propensa ao câncer    | SIM                    |
| Colorretal       | Adenocarcinoma                 | Não avaliada             | Propensa ao câncer    | Não avaliada           |
|                  | Adenocarcinoma                 | Reduzida no câncer       | Propensa ao câncer    | SIM                    |
| Pâncreas         | Adenocarcinoma                 | Reduzida no câncer       | Propensa ao câncer    | NÃO                    |

Fonte: adaptado de: (YAMASHITA, KATOH e WATANABE, 2013).

Waraya e colaboradores (2012) também demonstraram a redução da expressão do *HOPX* em neoplasia maligna de pâncreas em comparação com tecido não-tumoral adjacente (WARAYA et al, 2012). Katoh e colaboradores analisaram a expressão de *HOPX* e a correlação da hipermetilação de sua região promotora com agressividade tumoral em 170 pacientes com câncer colorretal. Os resultados demonstraram menor expressão de *HOPX* nos tecidos tumorais em comparação com os tecidos normais adjacentes ao tumor; a expressão reduzida de *HOPX* também foi demonstrada em linhagens celulares de câncer colorretal. A maior metilação do promotor do *HOPX*, correspondente à redução da sua expressão gênica, foi considerada um preditor independente de agressividade tumoral ( $p = 0,035$ ) e relacionada à pior diferenciação celular na análise histopatológica (Tabela 7) (KATOH et al, 2012).

Os mecanismos pelos quais a redução da expressão e a hipermetilação do promotor do gene *HOPX* induzem à tumorigênese e a maior agressividade da neoplasia ainda não estão completamente elucidados. Sabe-se previamente que, diferente de outras proteínas derivadas de genes *homeobox*, *HOPX* não possui sítios de ligação do DNA. Desta forma, foram propostos modelos em que *HOPX* regula a transcrição gênica de maneira indireta, através de sua ligação com fatores de transcrição. Um destes modelos propõe a interação de *HOPX* com o SRF (*serum response factor* – fator de resposta ao soro), que por sua vez participa da regulação de genes relacionados com ciclo celular, crescimento e diferenciação celular, bem como apoptose; o SRF, por exemplo, está relacionado com o crescimento do músculo

esquelético induzido pelo exercício. Outro modelo propõe a interação de HOPX com HDAC2 (deacetilase de histona tipo 2), que por sua vez tem ação sobre GATA4 (*GATA binding protein 4*) (Figura 6). A consequente deacetilação de GATA4 leva à modulação de genes de ciclo celular e sua ação coordenada já demonstrou ser essencial na regulação da proliferação dos miócitos cardíacos durante a embriogênese (TRIVEDI et al, 2010).

Tabela 8 – Relação entre o gene *HOPX* e a função de supressão tumoral em células de câncer em humanos

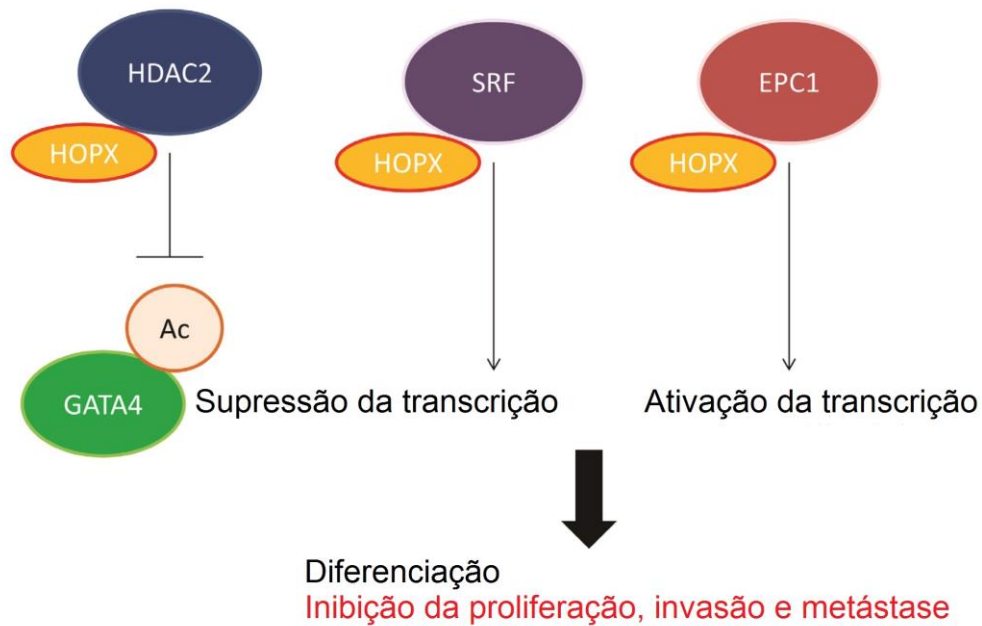
| Tipo de Câncer   | Tumorigênese <i>in vivo</i> | Tumorigênese <i>in vitro</i> | Proliferação | Apoptose     | Invasão      | Angiogênese  | Metástases em animais |
|------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------------|
| Placenta         | SIM                         | Não avaliada                 | Não avaliada | Não avaliada | Não avaliada | Não avaliada | Não avaliada          |
| Esôfago          | Não avaliada                | SIM                          | Não avaliada | Não avaliada | Não avaliada | Não avaliada | Não avaliada          |
| Cabeça e Pescoço | Não avaliada                | SIM                          | Não avaliada | Não avaliada | Não avaliada | Não avaliada | Não avaliada          |
| Pulmão           | SIM                         | SIM                          | SIM          | NÃO          | SIM          | Não avaliada | SIM                   |
| Útero            | SIM                         | Não avaliada                 | SIM          | Não avaliada | Não avaliada | Não avaliada | Não avaliada          |
| Mama             | SIM                         | Não avaliada                 | SIM          | Não avaliada | Não avaliada | Não avaliada | Não avaliada          |
| Estômago         | Não avaliada                | SIM                          | SIM          | SIM          | SIM          | Não avaliada | Não avaliada          |
| Colorretal       | SIM                         | SIM                          | SIM          | SIM          | SIM          | SIM          | Não avaliada          |
| Pâncreas         | Não avaliada                | SIM                          | SIM          | SIM          | SIM          | Não avaliada | Não avaliada          |

Fonte: adaptado de: (YAMASHITA, KATOH e WATANABE, 2013).

Estudos em modelos de linhagem celular de câncer colorretal, de pâncreas, de estômago, de esôfago e de pulmão levaram ao entendimento das alterações moleculares em células cuja expressão de *HOPX* sofreu repressão epigenética (Tabela 8 e Figura 7). Dentre os eventos celulares, incluem-se (YAMASHITA, KATOH e WATANABE, 2013):

a) Expressão de proteínas de superfície celular com atividade tirosinoquinase, tais como EphA2 (efrin tipo-A receptor 2), mediadora de eventos do desenvolvimento, particularmente no sistema nervoso; e EMP1 (proteína epitelial de membrana 1), cuja redução da expressão está envolvida com pior prognóstico em carcinoma oral de células escamosas e em carcinogênese de esôfago.

Figura 6 – Modelos de interação de HOPX com genes relacionados com diferenciação, crescimento e ciclo celular



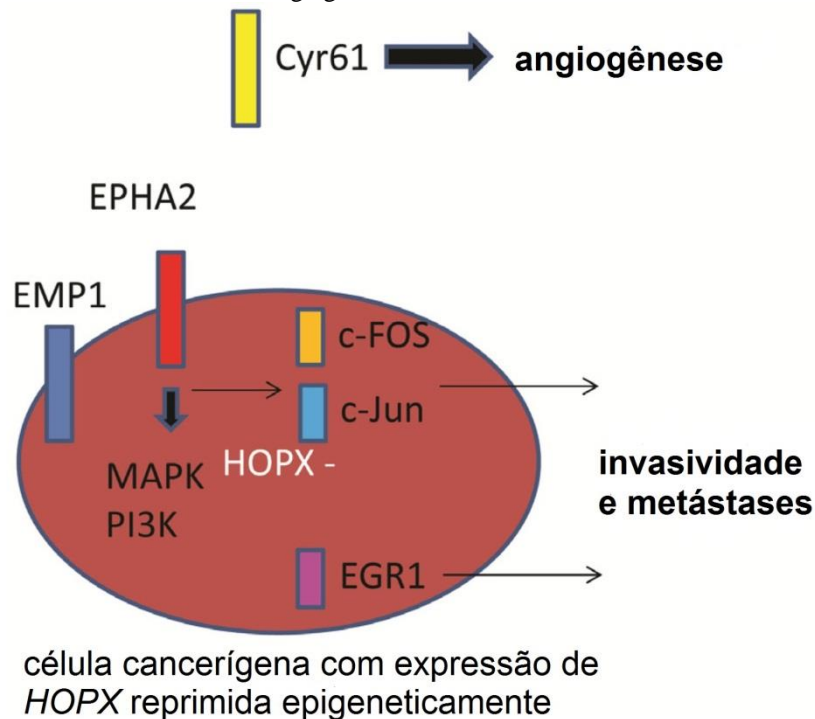
Fonte: adaptado de: (YAMASHITA, KATOH e WATANABE, 2013).

b) Expressão do fator de crescimento vascular Cyr61 (indutor de angiogênese rico em cisteína 61), proteína de matriz celular capaz de regular diversas atividades celulares, tais como adesão, migração, proliferação, diferenciação, apoptose e senescência. Crítico para formação de vasos placentários e septos na morfogênese cardíaca, relacionado com processos de aterosclerose, complicações do *diabetes mellitus* e angiogênese em câncer de mama, próstata, gliomas, adenocarcinomas gástricos.

c) Hiperexpressão de fatores de transcrição, tais como: *c-Fos* (protooncogene, da família dos fatores de transcrição de genes de expressão rápida, homólogo do oncogene retroviral *v-fos*). Sua superexpressão está relacionada com osteossarcoma, por outro lado em carcinomas de ovário a supressão de *c-Fos* correlaciona-se com a progressão da doença (papel supressor tumoral). Este duplo modo de ação é induzido por diferentes composições proteicas das células tumorais e seu meio. Estudo de 2003 demonstra superexpressão de *c-Fos* em câncer de tireoide (KATAKI et al, 2003). Yamaguchi e colaboradores (2009) demonstraram que *HOPX* inibe o estímulo proliferativo do estradiol ( $E_2$ ) sobre linhagens celulares de câncer de endométrio e de mama, mediante interação com SRF e redução da expressão de *c-Fos* (YAMAGUCHI et al, 2009); *c-Jun*, primeiramente identificada como p39. Seu *knockdown* é letal. Em conjunto com *c-Fos*, forma o fator de transcrição de resposta rápida AP-1 (proteína heterodimérica), que regula a expressão gênica em resposta a variados estímulos, incluindo

citocinas, fatores de crescimento, infecções virais e bacterianas. AP-1 controla diversos processos celulares, tais como diferenciação, proliferação e apoptose; EGR1 (proteína de resposta ao crescimento precoce 1), trata-se de proteína nuclear, fator de transcrição em mamíferos; funciona como um regulador transcricional, age em genes ligados à diferenciação e mitogênese, bem como na plasticidade neuronal cerebral (WORDEN et al, 2005).

Figura 7 – Modelo celular dos efeitos da repressão epigenética de HOPX, levando a expressão aumentada de fatores relacionados com angiogênese, invasividade tumoral e metástases à distância



Fonte: adaptado de: (YAMASHITA, KATOH e WATANABE, 2013).

d) Aumento da expressão de genes relacionados ao metabolismo, tais como *GLUT3* (transportador de glicose tipo 3), carreador que participa do transporte facilitado de glicose através das membranas plasmáticas de células de mamíferos, inicialmente descrito em neurônios, posteriormente evidenciado em outros tipos celulares como esperma, embriões, leucócitos circulantes e linhagens celulares de carcinomas de rim, cólon e placenta. *NPCI* é um gene que, quando mutado, resulta na doença de Niemann-Pick, tipo C (doença de armazenamento lisossomal), quadro clínico de esplenomegalia, hepatomegalia e comprometimento neurológico progressivo. *NPCI* tem relação com obesidade, infecção pelo HIV e vírus Ebola, participando da formação da bainha de mielina, sem relação definida em câncer (YAMASHITA, KATOH e WATANABE, 2013).

A expressão de *HOPX*, pelo menos no epitélio alveolar do pulmão, é diretamente controlada por NKX2.1 e GATA6, fatores que participam de um complexo transcricional que envolve SRF para ativar uma série de genes cruciais para o desenvolvimento pulmonar (YIN et al, 2006). O gene *NKX2.1* (*NK2 homeobox 1*), também conhecido como TTF-1 ou T/EBP, é um fator de transcrição da família Nkx2 codificado por gene localizado no cromossomo 12 em camundongos e 14q13 em humanos. Durante a vida embrionária, o *NKX2.1* expressa-se no primórdio tireoidiano, traquéia, pulmão, cérebro e neuro-hipófise. Animais com mutação inativadora do *NKX2.1* (*NKX2.1<sup>-/-</sup>*) apresentam fenótipo complexo, caracterizado por morte neonatal, agenesia tireoidiana, hipoplasia pulmonar, morfologia alterada da traquéia, alterações cerebrais e ausência da hipófise (RAMOS, NESI-FRANÇA e MACIEL, 2008). As vias genéticas controladas pelo *NKX2.1* não estão esclarecidas. Sabe-se que a ausência do NKX2.1 determina, no embrião, a falta de expressão de genes como *BMP4* (proteína morfogenética óssea 4) e *FGF8* (fator de crescimento de fibroblastos 8) nos pulmões e hipófise, respectivamente. Paralelamente, o NKX2.1 poderia controlar a sobrevivência das células foliculares tireoidianas através de mecanismos semelhantes, envolvendo alguns fatores de crescimento. A proteína NKX2.1 é definitivamente regulada, de forma tecido-específica, participando do controle de diferentes genes em distintos tipos celulares (DE FELICE e DI LAURO, 2004). *HOPX* atua promovendo regulação epigenética negativa, através de inibição de atividade HDAC (histona deacetilase), levando a redução da expressão do complexo NKX2.1/GATA6/SRF (YIN et al, 2006). Portanto, uma queda na expressão do gene *HOPX* leva a desrepressão da atividade do complexo Nkx2.1/GATA6/SRF, promovendo uma ativação precoce do processo de diferenciação do epitélio alveolar que é prejudicial para a morfogênese e para a maturação pulmonar. Na tireoide, além da importância embrionária, NKX2.1 desempenha claro papel na expressão de genes específicos da tireoide na fase adulta (Tg e TPO); não sabemos se o impacto na expressão de *HOPX* levaria ao mesmo processo de diferenciação celular precoce com alteração da organogênese glandular.

A análise da literatura disponível até o momento também não demonstra descrição da associação entre alterações da expressão do gene *HOPX* e o desenvolvimento de neoplasia maligna da tireoide, incluindo características relacionadas à apresentação clínica e à agressividade da doença.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar o padrão de expressão do *homeobox* gene *HOPX* em amostras tumorais de pacientes com carcinoma diferenciado de tireoide.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estabelecer associações entre a expressão do *homeobox* gene *HOPX* e aspectos clínico-patológicos tais como idade, sexo, tamanho do tumor, extensão extra-tireoidiana, invasão capsular e angiolinfática, ocorrência de metástases locorregionais e à distância, estadiamento tumoral, subtipo histológico, presença de tireoidite e estratificação de risco de recorrência.

### 3 HIPÓTESES

H0: A expressão do gene *HOPX* não está alterada em carcinoma diferenciado de tireoide, quando comparada com a expressão em tecido não-tumoral adjacente ao tumor e com neoplasias benignas da tireoide.

H1: A expressão do gene *HOPX* está alterada em carcinoma diferenciado de tireoide, quando comparada com a expressão em tecido não-tumoral adjacente ao tumor e com neoplasias benignas da tireoide.



## 4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

O estudo compõe-se de duas etapas:

a) Estudo piloto envolvendo análise de expressão de mRNA de *HOPX* de 10 amostras de CPT, oriundas de trabalho previamente realizado para estudo do controle epigenético da expressão de *NIS* em CDT (GALRÃO et al, 2014).

b) Estudo prospectivo com coleta de tecido fresco em pacientes submetidos à tireoidectomia total ou parcial por diagnóstico de CDT, além da coleta de controles com neoplasia benigna de tireoide (bócio adenomatoso e/ou adenoma folicular).

### 4.2 AMOSTRA

#### 4.2.1 Estudo piloto

Foram incluídos, para estudo, 10 pares de amostras de tecido tumoral e não-tumoral adjacente de pacientes com diagnóstico de CDT, submetidos a tireoidectomia total no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) (GALRÃO, 2011).

#### 4.2.2 Estudo prospectivo

Foi procedida coleta de tecido tumoral e não-tumoral adjacente de pacientes submetidos à tireoidectomia total ou parcial no Hospital São Rafael (Salvador/BA), instituição participante, no período entre abril/2014 a outubro/2014, com diagnóstico citológico prévio indicando neoplasia maligna da tireoide, posteriormente confirmado ao

estudo anátomo-patológico de carcinoma diferenciado da tireoide, cujo tumor tenha dimensão maior ou igual a 5 mm (cinco milímetros).

#### 4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Diagnóstico confirmado ao anátomo-patológico de carcinoma diferenciado de tireoide, cujo tumor (se unifocal) ou maior tumor (se multifocal) tem dimensão maior ou igual a 5 mm (cinco milímetros);
- Aceitação do (a) paciente em participar do estudo, mediante assinatura de TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) (Anexo 2);
- Disponibilidade de prontuário para coleta de dados clínicos dos pacientes submetidos à tireoidectomia;

#### 4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Diagnóstico anátomo-patológico de carcinoma indiferenciado de tireoide;
- Indisponibilidade do prontuário para coleta dos dados clínicos;
- Indisponibilidade da peça cirúrgica para extração de material.

#### 4.5 CÁLCULO AMOSTRAL

Para o cálculo do tamanho amostral, dado o ineditismo deste trabalho na análise da expressão do *homeobox* gene *HOPX* em câncer de tireoide (prevalência desconhecida), a fórmula utilizada prevê o uso de prevalência estimada em 50%, o que visa evitar erros de subestimação do tamanho amostral (Figura 9) (COCHRAN, 1977).

Figura 8<sup>5</sup> – Fórmula para cálculo amostral

$$n = \frac{Z^2 p(1 - p)}{d^2}$$

Fonte: adaptado de: (COCHRAN, 1977)

Tendo em vista que a incidência estimada de novos casos de câncer de tireoide para o Estado da Bahia para o ano de 2014 é de 360 casos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2014), o grau de confiança de 95% e margem de precisão de 20%, calculou-se o tamanho amostral mínimo de 23 casos de carcinoma diferenciado de tireoide para adequada análise do padrão de expressão de *HOPX* em CDT.

#### 4.6 COLETA DE DADOS E ANÁLISE

##### 4.6.1 Coleta de amostra de tecido tumoral fresco

Foi coletada amostra de tecido neoplásico em espécimes oriundos de tireoidectomia total ou parcial realizadas no Hospital São Rafael, Salvador/Bahia. Logo após o término do procedimento cirúrgico (tempo máximo de 60 minutos), as peças foram levadas para o Serviço de Anatomia Patológica do Hospital, onde o médico patologista realizou análise macroscópica da peça e posterior retirada do tecido tumoral e não-tumoral adjacente, aproximadamente 5 mg em cada fragmento. As amostras foram acondicionadas em tubos *eppendorfs* estéreis de 2 ml (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) previamente autoclavados e identificados, contendo em seu interior 1 ml de solução de conservação *RNA Later*<sup>®</sup> (Life Technologies, Carlsbad, CA). A seguir, as amostras foram transportadas em recipiente refrigerado até o Laboratório de Estudo de Tireoide (LET), localizado no Instituto de Ciências da Saúde da UFBA, e armazenadas em *freezer* -20°C.

---

<sup>5</sup> Legenda: n = amostra; Z = grau de confiança; p = prevalência estimada; d = margem de erro.

#### 4.6.2 Identificação da ilha CpG

Através de revisão de literatura, identificamos que *HOPX* é um gene cujo mecanismo de controle de expressão envolve a hipermetilação de sua região promotora (controle epigenético). Desta forma, optamos por proceder a reanálise da ilha CpG de *HOPX*, confrontando com os dados previamente disponíveis na literatura, visando experimentos futuros de análise de metilação por metodologia quantitativa (QMSP – reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real, específica para metilação). Para uma adequada identificação da ilha CpG, procedeu-se análise da região 5' do gene *HOPX*, entre as posições -4500 pb e +500 pb em relação ao sítio de início da tradução (ATG), empregando-se ferramentas de bioinformática. Utilizou-se inicialmente o programa “CpG Island Explorer” versão 2.0, disponível em <http://cpgie.sourceforge.net> (WANG e LEUNG, 2004), seguindo os parâmetros descritos por Takai e Jones (TAKAI e JONES, 2002) (Tabela 9). Este programa determina potenciais ilhas CpG através dos cálculos de porcentagem de bases guaninas e citosinas (C+G), da razão entre o número de sítios CpG observados e sítios CpG esperados (CpGobs/CpGesp) e do tamanho mínimo do fragmento desejado.

Em seguida, para análise da funcionalidade da ilha CpG, utilizou-se o programa Cpg\_MI, disponível em <http://bioinfo.hrbmu.edu.cn/cpgmi> (SU et al, 2010). Este programa identifica ilhas CpG funcionais baseado na informação cumulativa da distância física entre sítios CpG funcionais vizinhos. Desta forma, possibilita-se a distinção entre um enriquecimento por acaso de CpG e um agrupamento significativo.

Posteriormente analisou-se esta mesma sequência no programa RepeatMasker versão aberta 4.05, disponível em <http://www.repeatmasker.org>, para descartar qualquer sobreposição de sequências repetitivas (HUTTER, PAULSEN e HELMS, 2009). Para concluir a determinação de ilhas CpG funcionais no promotor do gene NIS, as sequências identificadas como únicas pelo programa “RepeatMasker” foram reanalisadas pelo programa “CpG Island Explorer”, mesclando-se desta vez os parâmetros de Takai e Jones e os parâmetros descritos por Gardiner-Garden e Frommer (Tabela 9) (GARDINER-GARDEN e FROMMER, 1987).

Tabela 9 – Critérios de classificação de ilhas CpG

| Parâmetros                  | Takai & Jones (2002) | Gardiner-Garden & Frommer (1987) | Critérios Utilizados no Estudo (reanálise) |
|-----------------------------|----------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|
| Conteúdo C+G                | ≥55%                 | ≥50%                             | ≥55%                                       |
| CpGobs/CpGesp               | ≥0,6                 | ≥0,6                             | ≥0,6                                       |
| Tamanho mínimo do fragmento | 500 pb               | 200 pb                           | 200 pb                                     |

Fonte: adaptado de: (GARDINER-GARDEN e FROMMER, 1987); (TAKAI e JONES, 2002).

#### 4.6.3 Extração do DNA de tecido fresco

Para a extração de DNA de tecido fresco foi utilizado o estojo comercial *Gentra*<sup>®</sup> *Puregene*<sup>®</sup> *Kit* (QIAgen, Valencia, CA), conforme instruções do fabricante. A amostra de tecido fresco foi colocada em tubo cônico de 5 ml contendo 300 µl de solução de lise celular do referido Kit e homogeneizada por 80 segundos usando Haste Homomix de 5 mm (Biosystems, Curitiba, PR). Após o término do processo de extração, com eluição em 50 µl de solução de hidratação de DNA do referido Kit, as amostras foram armazenadas em *freezer* -20°C até a sua utilização.

#### 4.6.4 Quantificação do DNA total

Para análise da quantidade e a pureza do DNA extraído, dois microlitros da amostra foram utilizados para determinação, utilizando Nano Espectrofotômetro KASVI Modelo K23-0002 (KASVI, Curitiba) através de leitura a DO 260nm e DO 280nm. Foi considerado  $DO_{260nm} = 1$  equivalente a 50 ng/µL.

#### 4.6.5 Extração de RNA total de tecido

Para homogeneização, a amostra de tecido fresco foi colocada em tubo cônico de 5 ml contendo 1 ml de Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) e homogeneizada por 80 segundos usando Haste Homomix de 5 mm (Biosystems, Curitiba, PR). O material foi transferido para tubo *ependorf* de 2 ml (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) e incubado por 10 minutos a 25°C sob agitação. Adicionou-se 200 µl de clorofórmio, agitou-se por 15 segundos e incubou-se sob agitação por 10 minutos a 25°C. Procedeu-se centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C, utilizando-se centrífuga refrigerada *Heraeus<sup>TM</sup> Fresco<sup>TM</sup> 17 Microcentrifuge* (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA), e a fase aquosa em suspensão foi transferida para outro tubo de 2 ml. Repetiu-se a etapa de adição do clorofórmio e centrifugação. Após retirada da solução sobrenadante para outro tubo de 2 ml, foram adicionados 1 µl de glicogênio e 500 µl de álcool isopropílico. O material foi centrifugado a 13.000 rpm por 30 minutos a 4°C. A fase líquida foi desprezada e 1 ml de etanol 75% gelado foi adicionado. Procedeu-se centrifugação a 13.000 rpm por 30 minutos a 4°C, com descarte da fase líquida, nova adição de 1 ml de etanol gelado a 75% e nova centrifugação a 13.000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sedimento foi seco ao ar ambiente e ressuspenso em 35 µl de água DEPC. O RNA foi conservado em *freezer* -80°C até a sua utilização.

#### 4.6.6 Quantificação do RNA total

A quantidade e a pureza do RNA extraído foram avaliadas pela absorbância das amostras em Nano Espectrofotômetro KASVI Modelo K23-0002 (KASVI, Curitiba, PR) a 260 nm e 280 nm, utilizando-se dois microlitros da amostra, considerando-se que amostras de RNA de boa qualidade possuem relação  $DO_{260}/DO_{280} > 1,8$  e  $DO_{260nm} = 1$  equivalente a 40 ng/µL.

#### 4.6.7 Síntese de DNA complementar (cDNA)

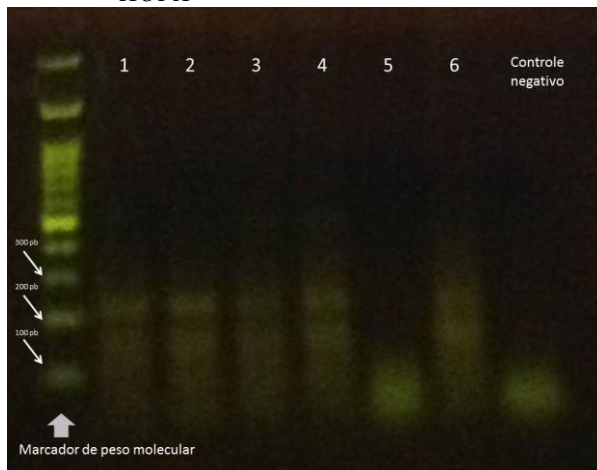
A síntese de cDNA foi realizada empregando-se 500 ng de RNA previamente extraído de cada amostra e adicionado a água q.s.p. para completar 17 µl, com adição de 2 µl de DNase Buffer (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA) e 1 µl de rDNase (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA). Procedeu-se incubação por 1h a 37°C em termociclador Veriti® (Applied Biosystems®, Life Technologies, Carlsbad, CA). Adicionou-se 5 µl de inibidor de DNase (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA). Após homogeneização e incubação a temperatura ambiente por 5 minutos, procedeu-se centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C, utilizando-se centrífuga refrigerada *Heraeus™ Fresco™ 17 Microcentrifuge* (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA). Posteriormente foram adicionados 1 µl de *random hexâmeros* (50mM), 1 µl de dNTP (10mM), 1 µl de Oligo(dT)<sub>20</sub> (Life Technologies, Carlsbad, CA) e água q.s.p. 1 µl. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos. Posteriormente realizou-se choque térmico em gelo por 1 minuto e incubação à temperatura ambiente em 5 minutos (para anelamento do *primer* de Oligo(dT)<sub>20</sub>). Em seguida, acrescentou-se 6 µL de tampão de reação 5x *First Strand*, 1,5 µL de DTT (0,1M), 0,5 µl de inibidor de RNase (20U/uL) e 1 µL da enzima *SuperScript® III Reverse Transcriptase* (Life Technologies, Carlsbad, CA). Esta última reação foi incubada a 50°C por 60 minutos. As amostras de cDNA foram então armazenadas em *freezer* -20°C.

Para testar a qualidade do cDNA, procedeu-se PCR (reação em cadeia de polimerase) convencional utilizando 1 µl de cDNA adicionado a 1,5 µl do *primer forward* e 1,5 µl do *primer reverse* a ser utilizado na etapa de *real time* PCR, acrescidos de 3 µl de dNTP, 2 µl de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µl de tampão 10x para PCR, 0,25 µl de Taq Polimerase e 13,25 µl de água q.s.p. A reação foi incubada em termociclador Veriti® (Applied Biosystems®, Life Technologies, Carlsbad, CA) a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e etapa de extensão final em 72° C por 10 minutos.

A fim de visualizar o padrão das bandas obtidas na PCR (*amplicons*), as amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% utilizando *UltraPure™ Agarose* (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA) diluído em tampão *Tris/Borato/EDTA* (TBE) 1x (*Ultrapure™ TBE Buffer*, Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA) contendo 0,1µl/ml de *Sybr Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA). O sucesso da PCR foi determinado com a visualização de

bandas contendo 151 bp no transluminador *Safe Imager 2.0 Blue Light* (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA) (Figura 9).

Figura 9 – Gel de agarose a 1,5% contendo o produto de amplificação de cDNA do fragmento (151 pb) do gene *HOPX*



Fonte: elaborado pelo autor

#### 4.6.8 Quantificação da expressão gênica por *real time* PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real)

A quantificação do mRNA de *HOPX* nos tecidos tireoidianos foi realizada por RT-PCR (PCR transcriptase reversa) quantitativa em tempo real, empregando-se o equipamento *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems®, Life Technologies, Carlsbad, CA), o estojo comercial *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e os iniciadores *HOPX-β* F (5'TAGTTTTGTTTGGAGA GGGTTTTAAAG3') e *HOPX-β* R (5'AACCTCCCCTAAAAAC AA ACTTAAC3').

Quantificou-se também a expressão do gene *S8*, utilizado como controle interno (*housekeeping*), para normalização dos valores de expressão. Para o gene ribossomal *S8*, foram empregados os iniciadores *S8* F(5'AACAAGAAATACCGTGCCC3') e *S8* R(5'CTAATAACGAGCTGGTTCGTAC3') (Tabela 10).



Tabela 10<sup>6</sup> – Sequência de iniciadores utilizados na reação de RT-PCR

| Gene                                      | Sequência dos iniciadores utilizados |
|-------------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>HOPX-β</i><br>iniciador <i>Forward</i> | 5'TAGTTTTGTTTGGAGAGGGTTTTAAAG3'      |
| <i>HOPX-β</i><br>iniciador <i>Reverse</i> | 5'AACCTCCCCTAAAAACAACTTAAC3'         |
| <i>S8</i><br>iniciador <i>Forward</i>     | 5'AACAAGAAATACCGTGCCC3'              |
| <i>S8</i><br>iniciador <i>Reverse</i>     | 5'CTAATAACGAGCTGGTTCGTAC3'           |

Fonte: elaborado pelo autor.

As amostras foram analisadas em triplicata, 03 poços na placa de *real time* PCR para cada amostra tecidual. Utilizou-se 1 µl de cDNA de cada amostra em cada poço, acrescidos de 6 µl de *SYBR Green*, 0,3 µl de cada *primer* (*forward* e *reverse*) e 4,4 µl de água DEPC. As amostras foram aquecidas a 50°C e a 95°C por 2 minutos, seguidos de 45 ciclos de amplificação: 95°C por 20 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Para o cálculo da expressão gênica foi empregado o método de  $\Delta\Delta C_T$  (*User Bulletin # 2, ABI Prism 7700 Sequence Detection System*, 1997, Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA).

#### 4.6.9 Revisão de prontuários

As informações sobre os dados clínicos, anátomo-patológico e estadiamento tumoral foram obtidas através de entrevistas com os pacientes e de revisão de prontuários do Hospital São Rafael, Salvador/Bahia, com posterior preenchimento de formulário semi-estruturado pelos pesquisadores participantes do projeto (Anexo 01).

<sup>6</sup> Legenda: RT-PCR: reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa

#### 4.7 ASPECTOS ESTATÍSTICOS

Foram avaliadas as seguintes variáveis: idade à época da cirurgia, sexo, tamanho do tumor, subtipo histológico, multifocalidade, extensão extratireoidiana, invasão vascular e perineural, presença de metástases linfonodais, presença de metástases à distância, estadiamento tumoral, padrão de expressão do gene *HOPX* em carcinoma diferenciado de tireoide em comparação com tecido não-tumoral adjacente e com neoplasias benignas da tireoide. O processamento e a análise dos dados foram realizados com o auxílio do pacote estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 22 (International Business Machines Corp., Armonk, NY), de acordo com as variáveis categóricas da pesquisa. Os gráficos com os dados resultantes da análise estatística foram elaborados utilizando o programa *Prism 6* (GraphPad, La Jolla, CA).

Os valores de expressão gênica foram descritos como média  $\pm$  desvio padrão ou mediana (mínimo e máximo). A análise de distribuição de normalidade foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk. A comparação da expressão gênica entre tecidos tumorais (T) e não-tumorais (NT) foi realizada utilizando o teste de Wilcoxon. Para comparar os grupos benigno e maligno foi utilizado o teste de análise de variância unidirecional (ANOVA). Para análises de associação com as demais variáveis estudadas foram utilizados o teste do qui-quadrado e o teste de Kruskal-Wallis.

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

#### 4.8 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi executado de acordo com a Resolução 466/2012 da Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP). O projeto foi submetido à Plataforma Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, conforme o Parecer Consubstanciado nº 359.041, de 13/08/2013. Os pacientes selecionados para o estudo prospectivo foram incluídos no mesmo após concordância em sua participação, expressa através da assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), detalhado no Anexo 02 deste projeto.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO DA ILHA CPG

Através do uso das ferramentas de Bioinformática previamente descritas foi possível identificar a ilha CpG do promotor de *HOPXβ*, contendo 234 pares de bases e abrigando 61 sítios CpG's. A partir desta identificação, foram desenhados os iniciadores para os experimentos futuros de quantificação de metilação por técnica de QMSP (Figura 11). Inicialmente, usando o CpG ISLAND EXPLORER (<http://sourceforge.net/projects/cpgie/>) e aplicando-se os critérios de Takai e Jones (2002) apenas uma ilha CpG foi identificada na região promotora do gene *HOPXβ* (Figura 10). Observamos que a região promotora deste gene localiza-se no exon 1. Toda a sequência de DNA correspondente ao exon 1 e intron 1 do gene *HOPXβ* (ENSG00000171476) foi avaliada pelo CpG ISLAND EXPLORER.

Figura 10<sup>7</sup> - Resultado da Identificação de ilha CpG na região promotora de *HOPXβ*.

#### 1 CpG island was identified in Raw DNA sequence

| Start | .. | End | GC%  | O/E (CpG) | Length |
|-------|----|-----|------|-----------|--------|
| 349   | .. | 582 | 50.6 | 0.60      | 234    |

ACAGATGCAGGGGAAATAAATGAGAATCGTTTTTGGAGGAGACCTAAACTGTATCATCCTAGCCCGA  
 ATCTCTCCCTTTTAACTGTTCTTTATGTGTACATTCTGTGCCCAAAGAAAACAACCTTTCATTAATT  
 GGGCAATTGTCCAGGCTCTTAGCTTGGCATCCAGCTCTCAGAGCTGTGAAATCAACCGCACCAGATCT  
 ACGCTTTGAAATGAGGCAACATCTAACTGGAACTCGCTCAAAGTAAGGAAGTGGATGAGAAGACTCA  
 GGTCCCTTTTCTCTTCCCCGTCTTCTCTCAGCCACATCTCTCTTATCCTATCTTGGTGAAGAAGCTT  
 GCTTGGCTAGGAGAGAGGTGAGGGACGAGAAGATAGTGACGAGAAAGTTCCATGAGACTCTCAGAAGT  
 CCCAGCCTGAACATCAAACCTGAATAACCAGGAGAGACGTAACCTCGGCATACTTTCAGTGGTTTTACC  
 TCCTGCCACGCTGCAGGTTTTTCAGGTCCTTGCTCGAGTGTGTGCTCATAGGCGTAAATAAACGTGC  
 TATCAGCAGCCTGCGTCAGCCAGCCAGCTATTTAAGCAGGCTGGCATCAGCAAACACAGCTTCCAAA  
 CCCAGGGCTTGCGCTTGCCCTTTCACGTAAAGTACCTTTCAAAGGTCTGCCTTTTTATGCAGA  
 GGAATGAGTTTGTGCAGGAAC TAGACCAAATGCTATCGTTACCGTATTTGCTCATCTGTTGGAAAAC  
 GG TAGAGGTGAAAGGGAGAA TAGGAATGACAAGCTTACCCCAAGCAGAAGCTAGGAAATGCTGCTGG  
 GTGTAAGACATCAGTCCCTTACAAACAAAAC TGCATGGGGTCGAGGGGAATTTGGAGGAAGGGGAGTT  
 GGTGTTGGTCTTTTGGCCAAGCAGGTGAGATGTTTTTCTTACTCGCTTCTATTTTGGAAAGATAACTT

<sup>7</sup> Legenda: Ilha CpG presente na região promotora do gene *HOPX*, localizada no exon 1, identificada pelo CpG ISLAND EXPLORER. Em amarelo, a área da ilha CpG que preenche os critérios combinados de Takai e Jones e Gardiner-Garden e Frommer, com 50,6% de GC e a razão CpG observado/CpG esperado de 0,6, com 234 pares de base de extensão.

TGAAACCAGCATTTGTGATGCCTATGATTTTCTCATTTAGAAGCAGATTATTGTTATTCTACATCC  
 CAGACTTTTATCTAAAATCAGACATAATATCGTTTTAAATATGTTTTGTGTTTGACAAGGGGAAAGTG  
 AGGGAGCTGTCTCTGGATGGAGAAGTGGCTTGATTTTGAATTTGCAGTTTATTGTTACTTCTGGTTCT  
 CATAATACTTATTTATAACAACAAAAACAGTGATTTTTTTTTTTTTGAGATGAAAAGGAATCCCAGGCT  
 CTGGGGTTTTAGAGAAAGTATAGGTTTTGTGATATGTGAGTGGCATCCAAGTATTAGGGTAAACTGTTA  
 AGTAAAGTGGAATAAGAATCATTGAATAAAAAGGTACAATCTATCACATAGTTCAGATAAGAAGCTCT  
 TAAAGAGAAAAGGAATGCAAACAGTTCCCATGAAGTGGCACTGCTACTGGACAGGGCCCTGTAGTGTG  
 TTTAGTTAAGTAAGGTTAAGTATAACCAGGGCAGGCAGAGAACAAAACGAAGGTGCTGGGGAGGTGGG  
 AAGGGAGGAGAAGGGAGGAGCAGATAGTAAAGGATTTATAATTAACAACAGATTTCATGAAAAGCAGA  
 TAGGAATAGAGCAGGGCATTAATTCATAGTCTATCCCTTTGTATCAAGAATCTGGTGAAAGCCAAGG  
 ACCTTTCTCAGGTATTTCATTCCTCGCTTCTGAGCCTCCCTTCCACCCACACCCCAACCCACACCT  
 TGACTCTCACTTTCTGGACTCCTAGAAGTCCACGGACCTAAATGAAGCTCATATGCTTATTATTATTT  
 TTTTTTAACTGGGCTGAAGCTGCCGACTGAGGAACCTCTCCAGAAGTGGTGGCGAGTTAAAAACCTTC  
 AACGTGGCAGGCACTTCTTAGCCACCAAACCTGAAGCTTGGTTTTAAGTTCATGAAGGTCTTATGTCAA  
 TCAAGCAAATAATGATTAAGGGCTATATCTGAGAAAAGATAAGTTGAAGGCCAAGAGGAAGAGAAAAG  
 AAAAAATGGATCTTGTCTCAAAGAGCTTGAATCTAAAGTCCAGGGAGATAATTAGATGTTATGTCC  
 ATGCACAAAATAGGATGTGTGAGTGAATTACATTTGTATAAAATGATAGAAAATGCAAACATAATCTAT  
 AGCAAAAAGAAAGTGGCTGGGTGCGGTGGCCACGCCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGTG  
 AGCGGATCACTTGAGGTGAGGAGTTTGAAGCAGCCTGGCCAATATAGTGAACCCCGTCTCTACTAA  
 AAATACAAAAATTAGGCGGGCTTGGTGGTGGGCACCTGTAATCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGACAG  
 GATAATTGCTTGAACCCGGGAGGCCGAGGTTGCAGTGAAGTGAAGTGTACCCTGCGCTCCAGCCTG  
 GGCGACAGAGCAAGATTCTGTCTTAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAGAAAGAAGATCCATGGTTACTTG  
 GGAAGGTAGGGCAGGAGAAAAATGTTTGGGGGGACTCCCAAGGTACACAGGAAACTTTTGAGGGTG  
 ATGGATATGTTTATTATTGTGACTGTGACCATTTCTTATATGGGAAGATTTATCAAATTGTGTACTTT  
 AACATTCAGTATTATAGCTGATTACTCCCAACAAACAATACTTTAACCCACATTATTTTTATTTTTAT  
 TTTTTTGAGATAGGATCTCACTCTGTCAACCAGGCTGGAGTGCAGTAGCACGATCTCGGCTCACTGCA  
 GCCTCTGCCTCCAGGCTCAAGCAATCCTCCACCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGAACACAGACTTG  
 TGCCACCACACCCAGCTGTAGAGATGGGGTTTTGCTATGTTGCCCAGGCTAGTCCCAAACCTCTGAGC  
 TCAAGCGATCTGCCTGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACTGTGCCTAACC  
 AACAATATAATTTTTAAATAAGTAAAAGCATTCTAAAAATCAGCCTATGTAACATGCTGAACATAAA  
 AGATGAGTATTTATGGAGAAAAAATAAATTCAGTAAAGCACAGAGACCAGACAGTAAGGATCATAGA  
 CTTTTATAGAACTGGGAGGGTCCCTGGAGATAATCTAACCTAGTGGTGTGGGGCTGGAGAACTTAA  
 AAAAGAAAAAAAAAATCAGTGACTGGGGCAGGGCATGGTGGCTCATGCCTGTAACCCAGCACTTTGA  
 GAGGCTGAGGCGGGTGGATCACCTAAGGTCAGGAGTTCGAGACCAGCTTGACCAACATGGTGAACCT  
 CATCTTTACTAAAATACAAAAATTAATCTGGGCATTGTGGTGAAGCGCCTGTAATCCAGCTACTTGGG  
 AGGCTGAGGCAGGAAAATCGCTTGAATCTGGGAGGCAGAGGTTGCAGTGAAGCGGAGATCGTGCCACTG  
 CACTCCTGCCTGGGTGGCAGAGCAAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCAGTGA  
 CTAGGCCCCACCCTGGACCAATTAATCAGAATCCCCAGGTGTGCAGCCCTGGGATTGGTTTTTAAAG  
 TTCCCCAGGTGAGTCTAATGTGCAGCTAGGGATGAAAACCAGTGAAATCAAACCATTCCTTGACAG  
 ATAAGGACAGTAAGGGCCAAAGAGAGGATGGGGATGGCCCATGCCACCTGACCACCAAGTCCGAGAG  
 TAGGATGAGGCTTGGGAGGCTCAGGGAAACACAGCAACAGAGGCTCAAAGGTAAAGAAAGAGGCTGCTT  
 CTGGACACTCCAGCTCCAGCGAGGATAGGGTATCCAGCACCTTCCAAGCGAATCCTTGGAAACCCAGA  
 CATGCTGCGGGCAGCAAAC TAGAAGAATTAATCAGGGCCTCCAAGGTGCATTATTAAGGATTGTGC  
 TAATGAGTGAGAAGGGATGTTTCAAACCTAAAGCTTCTTTTTTTCCCGATTAATATCTGGCATAAGT  
 AGAGGATTCTAATTATTGAAAGGAATCCCAGTGTACACACTGGGCACTCTGTTCTGGGGGACAGCCAA  
 GTTGTCTTTCAAGAAATAGCATGTGTGCATTCACAGCACTGGGATGAGTCTATCTGGCAGTCCAGGG  
 TCTTTTTAATTAGGACTTCCAGGTCAGGCCAGGCAAAAGCATGAGTGGGTGAAGTTTGTCTGTGTGAC  
 TTCTGTCTTCTGTCTGTGGCTCCTTAGCTCTCCCTCAGCACCTGTATGGGTGCAGGTGTGAGTTC

GAGGTGTCTGTGGGACCACAGAGCCTCACCGGCTCCACCCTGGCCATGTTTCCAATTGGTTTTTACCT  
 CCCCTTCAATCCAAATGTGCCACTTTCCAGGTCTTATTCTCTCAGGGCTTGTTTTCTCCATCTCTGGA  
 AAATAATTAAAATTAGGATGTTAATAGACAATAATCGTTTAATGAATTATGTCACTCCCTGGTATAG  
 TAAGTAGGTTCCAGCAAGATAACATATCTAGGAGTTCCCTTGAATGTTATATATAGTTACCATTTGAA  
 TTTTAAAGTGGGGCAATCAGGCAAATCAAAGTTTTATGCAAATATGTGCTCCTTATTGGTCAGAATT  
 CCAAGCAACTTGCTGGGCAAAAATATACCAAGATTGTGGGTTTTTCAGTATAATTTTTCAAACCATATC  
 CAGTAGGCAACCATCTATAGGTTGTGGGCCCTGTTAGATTGTTTTTTCTAAATTAGTCCATTTTTTTGT  
 CAATGCAGTTGAACTCATCAGAAGTAGCTGCATTTCCCTGTGTCTTTCTGAAAAATGGAGAGCCACCTT  
 AAGGTTACTATAATGGAGACAAAATGTCAAGAAATTCTGCTCATAAGGATTTTAGAATATTACCTGCT  
 TCTTTCTCAGGAGCAGAAGGCTGGCACCAGCAGAGTAGCTTGCCTAGTATTAGTGGCCAGGAGCCCTCA  
 TTCTTTGGGGACCCAGTTGTGCAGCTGGGGCAGCCCCCCCCACCCCTCCAGTGCATGTGGCCATGGG  
 CCCATTCCGGGCACTTTTGCCAGTTTGAAAACCAGATTGTGGCAGTTCTTGAAAACAAGTGGCAGCTG  
 CCTGTGGCCAGTCTGTCTCTGAAGAGGGGCGTGGCTGGGTGTGTAATTAACATCCCTTCTGGGGAGG  
 CAGTCTGCAGGCAGTCCGAGCCCAGAGCAGCCCTGCAGCCAGAGGACACATTGTGACAGCAGCAGTGG  
 GGAGGAGAGGGTGAAGGCGAGCTCCATCTTGAGTCCCTGGGAGCCCTGGCACTCTAGCTCTGGGGAAC  
 GGATTAGGTCGTTGGCATCAGGGCAGCAGTCAACACCAGTTTAATGCCCTACTTGGAAGCCAAATGC  
 TTTTTCCTGTGCTTTTTTCCCTGTTATTTCAG

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em seguida o mesmo resultado foi confirmado através da ferramenta *CpG island Search*, disponível no site: <[http://epigenome.usc.edu/resources/software\\_tools/cpg\\_island.html](http://epigenome.usc.edu/resources/software_tools/cpg_island.html)>, utilizando os mesmos critérios. Numa segunda etapa utilizamos o programa *CpGCluster*, disponível em <http://bioinfo2.ugr.es/CpGcluster/>, para avaliar a funcionalidade da ilha CpG identificada na região promotora do gene *HOPXβ*. O algoritmo utilizado pelo *CpGCluster* baseia-se na distância física entre as sequências CpGs e possui acurácia na identificação de ilhas CpG funcionalmente relevantes. Na figura 11 podemos avaliar que a sequência identificada como não funcionalmente ativa pelo *CpGcluster*, em cinza, não envolve a área que desejamos avaliar por QMSP e Sequenciamento por Bissulfito em futuros experimentos, em rosa.

Figura 11<sup>8</sup> – Identificação da ilha CpG na região promotora de *HOPXβ* e sequência de iniciadores para QMSP

```

CGTGTCTCAATCCCCTGCCTTAAATCACTTCTCTGCGGACCTATCTCCATCTCTGTAAAATGGAAA
GACATTAAAAGCAC CCTC TCTCCCCAACTTTGAGAAGTAACTTGTCTTG GGGGA
ACTTTTTTGGAGGAAGGGTGGGGTGTGCAGCCCTG CTGGASAGSSSSCAAA CGCCA
ACCCACTG CGGAGACASAAGG CGCTAC CGGGGAGGG CGGAGGC CGGCTAGT CGCGGA
CTCGGG CGAACCCACC CTGCGGATCTGTCAAGTCTGTG CCCAGGGGAGGTCCCCCTTTG
GGGAGGAAGTTTTTAAGGGGATTTCTCAAATCACCCC CGCG CTCCTTCACTCCTTCC
TTAGAGC CGGAGGT CGGTGAGGGCC CGCGGAATCATCTATCT CGCCCC CGT CGCAGGCA
GGGATACAGTTCCTGCAAGGGTCC CGGGGGG CGCGGAGG CGCAGGAC CTAGGCTCT
GC CGTCAGCC CGCAACAG CGCTCAGTCCAGGGAGGGAGGCC CGGTGGGGGGCAGC CGT
AAGCCCC CGCTCAG CGTGCAGCCAC CGGGGACTTG CGCGGCC CGTGGCAC CGCTGGAGGG
GGCGGCCTGGGGCTGGGGCTGCC CGGCGGCG CGCGAC CGCTTCTT CGCTGCGTCCC
GCCCGCTCCAC CGCT CGCTCAC CGCGCGCTTCTCCCTGCC CGCAG CGCGCAGGGAC
CATGT CGG CGGAGAC CGGAG CGGCCACAGAGGACCAGGTGGAAATCCTGGAGTACA
ACTTCAACAAGGT CGACAAGCACC CGGATTCCACCAC CGTGTGCCTCAT CGCGGCCGAG
GCAGGCCTTTC CGAGGAGGAGACCCAGGTG CGTCCCCACA CGCG CCCAG CGCG CCC CGA
CCCCTGCCTGGGCTGAGCCTTCT CGCG GCTGGG CGTCCCTGTT CGTC CGCG CCTCC CGC
CGGGCTGCCCTCCCCATGATCTCCCAT CGCTTCTGCC CGCATCCAGGGGCCAGACCC
TGCATGGCTCC CGC CGC CGCCTCCC CGCTTCCC CGTCCCATGGG CGCC CGGTCTCCC
CCACCCCCATCCAGC CGTGGTTCCC CGGGAGCTG CGCAGAAACCCT CGGTCCACAGT
CCTTCTTTTCCACTCTCCC CGGCAGCC CGGATACA CGCTTCTCCCTCTG CGAGTTG
GGAGCAG CGTCTCT CGCCTGTCCCTGTCT CGCCTTCC CGGCT CGGTCCCTCTGGTCTG
TCTG CGAAACCTT CGGGAAGATCTATTCTAGG CGGGAATGTAGAGCTGGAAGGGCCCC
CAGAGACCAGTAGCCATAAATTCAGTCTCCTCGGTTTGGCGAACCCAGGAGGCTGAGGCC
GGGAGGGAGGG CGCTGTCAGGATGGCAGGAG CGGTGAAGCATGCTCTCTCCACCACATC
ACACTGCAG CGTCCCC CGAGCTGCAGAACTCA CGCTGCA CGAAGCCA CGGAGATTTGGT
TC CGATTTTTTAAAAAATTCCC CGGCTCTAAGGTTTAGAGGTTTTTCCTGG CGTTTTTAT
AAGA CGGTAGATAGCTAACATTTTCAGCTGA CGGCAG CGGCAG CGCATGTCCCCTAAGT
GCATTCATTGACTTATCTATTTTTTAAATGCTCCTGTATTATCCCAGAAAGTGCCAGGTAAAGAAT

```

Fonte: elaborado pelo autor.

Os iniciadores para QMSP contém uma limitação, pois são desenhados para anelar em região que contém apenas 6 sítios CpG's, excluídos os contidos nas sequências dos próprios iniciadores. Desta forma, foram também desenhados iniciadores para etapa de sequenciamento após conversão com bissulfito de sódio, com capacidade de avaliar um maior número de sítios (61) dentro da ilha CpG (Figura 12):

<sup>8</sup> Legenda: Ilha CpG presente na sequência convertida por bissulfito da região promotora do gene *HOPXβ*, identificada pelas ferramentas disponíveis online no *UCSC Genome Bioinformatics* e *Cpg ISLAND EXPLORER*. Estão indicados em verde os sítios CpG's, com 61 sítios encontrados. Dispostas na cor vermelha estão as sequências dos iniciadores desenhados para a amplificação de parte da ilha CpG utilizados na QMSP. As letras sublinhadas representam a região correspondente aos exons 1 e 2. Em amarelo está o nucleotídeo referente ao sítio inicial de transcrição (+1) localizado no exon 2. Em rosa, a área da ilha CpG que deverá ser futuramente estudada com a técnica de sequenciamento após tratamento com bissulfito. Em cinza, área sem relevância funcional identificada pelo CpG cluster.

Figura 12<sup>9</sup> – Identificação da ilha CpG na região promotora de *HOPXβ* e sequência de iniciadores para etapa de sequenciamento pós-tratamento com bissulfito.

```

CGTGTTTTAATTTTTGTTTTAAATTATTTTTTTGCGGATTTATTTTTATTTTTGTAAAATGGAAA
GATATTTAAAAGTATCTTTTTCTTTTTTTAATTTTGAGAAGTAATTTGTTTTGCGGGA
ATTTTTTTGGAGGAAGGGTGGGGTGTGAGTTTTGTTTTGGAGAGGGTTTTAGCGTTA
ATTTATTGCGGAGATAGAAGGTCTTTTATCGGGGAGGTGGGAGGTGGTTAGTCCCGGA
TTCCGGCGAATTTATTTTTCCCGATTGTGTTAAGTGTGTTTTTAGGGGAGGTTTTTTTTTC
CGGAGGAAGTTTTTAAGGGGATTTTTTAAAATTATTTTCCCGTTTTTTTTATTTTTTTTT
TTAGAGTCCGAGGTCCGTGAGGGTTCCCGGAATTTATTTATTTCCTTTTCCGCTAGGTA
GGGATATAGTTTTTGTAAAGGGTTTTCCGGGGGCGCCGGAGGCGTAGGACGTTAGGTTTT
GTCTTAGTTCCTAATAGCTTTAGTTTAGGGAGGGAGGTTCCGGTGGGGGGTAGTCCG
AAGTTTTCTTTAGCTGTAGTTATCGGGATTGCGCGGTCTGGTATCGTTGGAGGG
GGCGTTTTGGGGTTGGGGTTGTTCCGCGGCGTCCCGATCGTTTTTTTTCTTTGCGTTTC
CTTCTTTTTACGTTTCTTTTATCGTCTGTTTTTTTTTTGTTTCTAGCCCGTAGGGAT
TATGTCCGCGGAGATCCCGAGCGTTTTTATAGAGGATTAGGTGGAATTTTGGAGTATA
ATTTTAATAAGGTCCATAAGTATTCCGATTTTTATTACGTTGTGTTTTTATCCCGGTCCGAG
GTAGGTTTTTTTCGAGGAGGAGATTTAGGTGCTTTTTTATACCCGTTTAGCCCGTTTTCCA
TTTTTGTGGGTTGAGTTTTTTCCCGGTTGGGCGGTTTTGTTCTTTCCCGTTTTTTCT
CCGGTTGTTTTTTTTATGATTTTTTTATCGTTTTTGTTCTATTTTTAGGGGTTAGATTT
TGATAGGTTTTCTCTCTTTTTTTCTTTTTTTCTTTTTTATGGGCTTCCGTTTTTTT
CTTATTTTTATTTAGTTGGTTTTTCCGGAGTTGCCAGAAATTTTTCCGTTATTAGT
TTTTTTTTTTTTATTTTTTTGTAGTTCCGGATATACTTTTTTTTTTTTTGCGAGTTG
GGAGTAGCTTTTTCTTTGTTTTGTTTCTTTTTTTCCGTTCCGTTTTTTTTGGTTG
TTTGCCTAAATTTCCGGAAGATTTATTTTAGGCCGGAATGTTAGAGTTGGAAGGCGTTT
TAGAGATTAGTTAGTTATAAATTTAGTTTTTTTTGGTTTGGCCAAATTAGGAGGTTGAGGTT
GGGAGGGAGGGCTTTGTTAGGATGGTAGGAGCCGTGAAGTATGTTTTTTTTTATTATATT
ATATTGTAGCTTTTTCTAGTTGTAGAATTTAAGTTGTAACAAGTTAAGGAGATTTGGT
TTCCATTTTTTAAAAATTTTTCCGTTTTAAGGTTTAGAGGTTTTTTTTTGGCTTTTTAT
AAGAAGGTAGATAGTTAATTTTTAGTTGAAGTAGCCGTAGTCCATGTTTTTTTTAAGT
GTATTTATTGATTTATTTATTTTTTAAATGTTTTTTGTATTATTTCCAAAAGTGTAGGTAAAGAAT

```

Fonte: elaborado pelo autor.

## 5.2 ESTUDO PILOTO DE ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE *HOPXB* EM AMOSTRAS TUMORAIS

Para o estudo piloto, foram analisados 10 pares de amostras de tecido tumoral (T) e não-tumoral (NT) adjacente de pacientes com diagnóstico de carcinoma papilífero de tireoide, cujos dados clínicos são apresentados na Tabela 11.

<sup>9</sup> Ilha CpG presente na sequência convertida por bissulfito da região promotora do gene *HOPXβ*, identificada pelas ferramentas disponíveis online no UCSC Genome Bioinformatics e Cpg ISLAND EXPLORER. Estão indicados em verde os sítios CpG's, com 61 sítios encontrados. Dispostas na cor vermelha estão as sequências dos iniciadores desenhados para a amplificação de parte da ilha CpG utilizados no Sequenciamento após tratamento com bissulfito. As letras sublinhadas representam a região correspondente aos exons 1 e 2. Em rosa, a área da ilha CpG inicialmente foi delimitada para estudo com a técnica de sequenciamento após tratamento com bissulfito. Em cinza, área sem relevância funcional identificada pelo CpG cluster.

Tabela 11 – Estudo piloto: dados clínicos dos pacientes

| Variável Clínica                                   | Características dos Pacientes                                   |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Número de pacientes                                | 10 pacientes                                                    |
| Idade                                              | 41,5 ± 10,56 anos<br>(50% dos pacientes tinham idade ≥ 45 anos) |
| Sexo                                               | 7/10 (70%) sexo feminino<br>3/10 (30%) sexo masculino           |
| Tempo médio de diagnóstico (USG)                   | 1,6 ± 0,89 anos                                                 |
| Tamanho médio do tumor (maior diâmetro)            | 3,16 ± 2,18 cm<br>(20% dos tumores ≥ 4 cm)                      |
| TSH prévio à tireoidectomia                        | 1,79 ± 1,13 mUI/L                                               |
| Tireoglobulina sérica prévia à cirurgia            | 771 ± 859 ng/ml                                                 |
| Presença de microcalcificações na ultrassonografia | 60% das amostras avaliadas (3/5)                                |

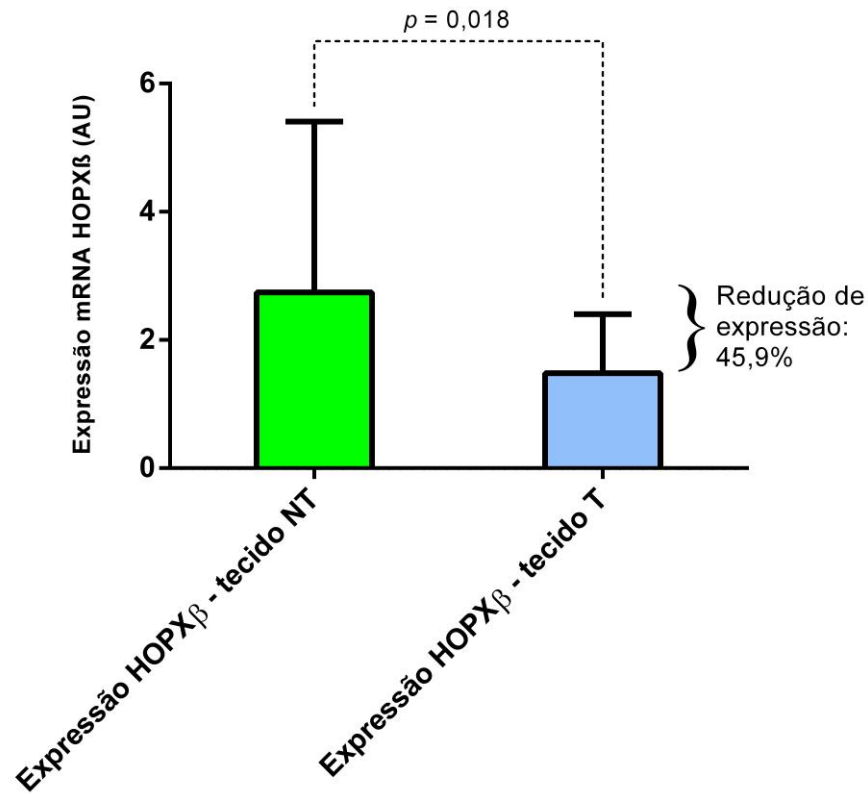
Fonte: elaborado pelo autor

Após análise com PCR em tempo real, verificou-se significativa redução (45,9%) da expressão gênica de mRNA de *HOPXβ* nas amostras T quando comparadas com as NT (1,504±1,89 vs. 2,682±2,90) ( $p \leq 0,05$ ). Das amostras tumorais, 70% apresentaram redução de expressão do gene *HOPXβ* em comparação com tecido NT do próprio paciente.



Figura 13<sup>10</sup> – Resultados do estudo piloto: expressão de mRNA de *HOPXβ* em amostras tumorais e não-tumorais de CDT

**Expressão de *HOPXβ* em tecido tumoral (T) vs não-tumoral (NT)**  
(N = 10 pacientes com CDT)



Fonte: elaborado pelo autor.

O trabalho original de Galrão (GALRÃO, 2011) incluiu avaliação da mutação  $BRAF^{V600E}$  nas amostras estudadas. Dos pacientes estudados, 40% apresentaram a mutação  $BRAF^{V600E}$ ; foi procedida análise estatística da associação entre a mutação  $BRAF^{V600E}$  e redução da expressão de *HOPXβ*, porém não foi encontrada significância estatística (Tabela 12).

<sup>10</sup> Legenda: T – tecido tumoral; NT – tecido não-tumoral (adjacente ao tumor)

Tabela 12<sup>11</sup> – Comparação entre redução da expressão de *HOPXβ* e presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> (p = NS)

| Paciente | Valor Expressão<br><i>HOPXβ</i> NT | Valor Expressão<br><i>HOPXβ</i> T | Redução da<br>expressão de<br><i>HOPXβ</i> ? | Positividade<br>para a mutação<br>BRAF <sup>V600E</sup> ? |
|----------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 001      | 0,9858                             | 0,2177                            | SIM                                          | NÃO                                                       |
| 002      | 3,4538                             | 1,7167                            | SIM                                          | NÃO                                                       |
| 003      | 3,9982                             | 1,9600                            | SIM                                          | NÃO                                                       |
| 004      | 0,8701                             | 0,7943                            | SIM                                          | NÃO                                                       |
| 005      | 6,0938                             | 0,0303                            | SIM                                          | NÃO                                                       |
| 006      | 8,6089                             | 6,5251                            | SIM                                          | SIM                                                       |
| 007      | 2,6509                             | 0,0409                            | SIM                                          | SIM                                                       |
| 008      | 0,0311                             | 1,1784                            | NÃO                                          | SIM                                                       |
| 009      | 0,0006                             | 1,4743                            | NÃO                                          | NÃO                                                       |
| 010      | 0,1272                             | 1,1031                            | NÃO                                          | SIM                                                       |

Fonte: elaborado pelo autor.

### 5.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS PACIENTES DO BRAÇO PROSPECTIVO

Após cumpridos os critérios de inclusão de pacientes no braço prospectivo do estudo, incluindo aplicação de TCLE, foram admitidos 32 pacientes no estudo, sendo 26 pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna de tireoide (Tabela 13). Os pacientes com diagnóstico de neoplasia benigna foram usados como controles internos e seus tecidos foram utilizados para análises moleculares subsequentes.

<sup>11</sup> Legenda: em destaque, concordância positiva ou negativa para redução da expressão de *HOPXβ* e presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup>. NS = não significativo

Tabela 13<sup>12</sup> – Estudo prospectivo: dados clínicos dos pacientes (geral)

| Variável Clínica                               | Características dos Pacientes                                                                                                                                                         |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Número de pacientes                            | 32 pacientes                                                                                                                                                                          |
| Idade                                          | 45,94 ± 12,61 anos<br>(59,30% dos pacientes tinham idade ≥ 45 anos)                                                                                                                   |
| Sexo                                           | 25/32 (78,13%) sexo feminino<br>7/32 (21,87%) sexo masculino                                                                                                                          |
| Tamanho médio do tumor ao USG (maior diâmetro) | 1,88 ± 1,10 cm<br>(6,3% dos tumores ≥ 4 cm)                                                                                                                                           |
| Laudo da PAAF (classificação de Bethesda)      | Bethesda I – 0/32 (0,0%)<br>Bethesda II – 2/32 (6,25%)<br>Bethesda III – 3/32 (9,4%)<br>Bethesda IV – 5/32 (15,6%)<br>Bethesda V – 12/32 (37,5%)<br>Bethesda VI – 10/32 (31,3%)       |
| Diagnóstico definitivo                         | Neoplasia maligna – 26/32 (81,2%)<br>Neoplasia benigna – 6/32 (18,8%)                                                                                                                 |
| Tipo Histológico                               | Carcinoma papilífero – 25/32 (78,1%)<br>Carcinoma oncocítico – 1/32 (3,1%)<br>Bócio adenomatoso – 4/32 (12,5%)<br>Adenoma folicular – 1/32 (3,1%)<br>Adenoma oncocítico – 1/32 (3,1%) |

Fonte: elaborado pelo autor.

Dos 26 pacientes com diagnóstico de carcinoma diferenciado de tireoide (CDT), 25 corresponderam ao carcinoma papilífero (96,1% da amostra) e 1 teve o diagnóstico histopatológico de carcinoma oncocítico da tireoide (carcinoma de células de Hürthle). Os dados clínicos e o perfil histopatológico dos tumores estão descritos na Tabela 14.

<sup>12</sup> Legenda: PAAF – punção aspirativa por agulha fina; Classificação de Bethesda – vide Tabela 2

Tabela 14 – Estudo prospectivo: dados clínicos dos pacientes com diagnóstico confirmado de neoplasia maligna da tireoide

| Variável Clínica                                              | Características dos Pacientes                                                                                                                                                                                 |
|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Número de pacientes                                           | 26 pacientes                                                                                                                                                                                                  |
| Idade                                                         | 45,46 ± 12,69 anos<br>(53,85% dos pacientes tinham idade ≥ 45 anos)                                                                                                                                           |
| Sexo                                                          | 19/26 (73,08%) sexo feminino<br>7/26 (22,92%) sexo masculino                                                                                                                                                  |
| Tamanho médio do tumor ao anátomo-patológico (maior diâmetro) | 1,02 ± 0,68 cm<br><ul style="list-style-type: none"> <li>• 20/26 (76,9%) dos tumores ≤ 1 cm (microcarcinomas)</li> <li>• 3/26 (11,5%) dos tumores ≥ 2 cm</li> <li>• 1/26 (3,8%) dos tumores ≥ 4 cm</li> </ul> |
| Laudo da PAAF (classificação de Bethesda)                     | Bethesda I – 0/26 (0,0%)<br>Bethesda II – 1/26 (3,8%)<br>Bethesda III – 2/26 (7,7%)<br>Bethesda IV – 0/26 (0,0%)<br>Bethesda V – 12/26 (46,2%)<br>Bethesda VI – 10/26 (38,5%)                                 |
| Tipo Histológico                                              | Carcinoma papilífero – 25/26 (96,1%)<br>Carcinoma oncocítico – 1/26 (3,9%)                                                                                                                                    |
| Carcinoma Papilífero – Subtipo histológico                    | Variante Clássica – 22/25 (88%)<br>Variante Folicular – 2/25 (8%)<br>Variante Sólida – 1/25 (4%)                                                                                                              |
| Tireoidite Associada                                          | 5/26 (19,23% dos pacientes)                                                                                                                                                                                   |
| Multifocalidade                                               | 15/26 (57,69% dos pacientes)                                                                                                                                                                                  |
| Extensão extra-tireoidiana                                    | 8/26 (30,77% dos pacientes)                                                                                                                                                                                   |
| Invasão capsular                                              | 10/26 (38,46% dos pacientes)                                                                                                                                                                                  |
| Invasão angiovascular                                         | 6/26 (23,08% dos pacientes)                                                                                                                                                                                   |
| Invasão perineural                                            | 3/26 (11,54% dos pacientes)                                                                                                                                                                                   |
| Ressecção tumoral incompleta                                  | 3/26 (11,54% dos pacientes)                                                                                                                                                                                   |
| Presença de linfonodos acometidos pela neoplasia              | 6/26 (23,08% dos pacientes)                                                                                                                                                                                   |
| Estádio T (TNM)                                               | T1a – 15/26 (57,7%)<br>T1b – 3/26 (11,5%)<br>T2 – 0/26 (0,0%)<br>T3 – 8/26 (30,8%)<br>T4 – 0/26 (0,0%)                                                                                                        |
| Estádio N (TNM)                                               | N0 – 19/26 (73,1%)<br>N1a – 5/26 (19,2%)<br>N1b – 2/26 (7,7%)                                                                                                                                                 |
| Estádio Clínico                                               | Estádio I – 20/26 (76,9%)<br>Estádio II – 1/26 (3,8%)<br>Estádio III – 5/26 (19,2%)<br>Estádio IV – 0/26 (0,0%)                                                                                               |

Fonte: elaborado pelo autor

Os tumores malignos foram estratificados quanto ao risco de recorrência tumoral, conforme diretrizes de câncer de tireoide de diferentes Sociedades (Tabela 15).

Tabela 15 – Estratificação de risco de recorrência de neoplasia maligna da tireoide

| Diretriz Utilizada                                                                                  | Classificação dos Tumores Quanto ao Risco de Recorrência                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>ETA – Associação Europeia de Tireoide</b><br/>(PACINI et al, 2006)</p>                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Muito baixo risco – 12/26 (46,1%)</li> <li>• Baixo risco – 3/26 (11,5%)</li> <li>• Alto risco – 11/26 (42,3%)</li> </ul>                                              |
| <p><b>LATS – Sociedade Latinoamericana de Tireoide</b><br/>(PITOIA et al, 2009)</p>                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Muito baixo risco – 12/26 (46,1%)</li> <li>• Baixo risco – 3/26 (11,5%)</li> <li>• Alto risco – 11/26 (42,3%)</li> </ul>                                              |
| <p><b>ATA – Associação Americana de Tireoide</b><br/>(COOPER et al, 2009)</p>                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixo risco – 15/26 (57,7%)</li> <li>• Risco intermediário – 8/26 (30,7%)</li> <li>• Alto risco – 3/26 (11,5%)</li> </ul>                                             |
| <p><b>SBEM – Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia</b><br/>(ROSARIO et al, 2013)</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Muito baixo risco – 14/26 (53,8%)</li> <li>• Baixo risco – 6/26 (23,0%)</li> <li>• Risco intermediário – 3/26 (11,5%)</li> <li>• Alto risco – 3/26 (11,5%)</li> </ul> |

Fonte: elaborado pelo autor

Seis pacientes com neoplasia benigna da tireoide foram usados para comparação de expressão de *HOPXβ*. Os dados clínicos e o perfil histopatológico dos tumores benignos estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16 – Estudo prospectivo: dados clínicos dos pacientes com diagnóstico confirmado de neoplasia benigna da tireoide

| Variável Clínica                               | Características dos Pacientes                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Número de pacientes                            | 6 pacientes                                                                                                                                                            |
| Idade                                          | 48,00 ± 13,22 anos<br>(83,3% dos pacientes tinham idade ≥ 45 anos)                                                                                                     |
| Sexo                                           | 6/6 (100%) sexo feminino                                                                                                                                               |
| Tamanho médio do tumor ao USG (maior diâmetro) | 3,03 ± 1,04 cm                                                                                                                                                         |
| Laudo da PAAF (classificação de Bethesda)      | Bethesda I – 0/6 (0,0%)<br>Bethesda II – 1/6 (16,7%)<br>Bethesda III – 1/6 (16,7%)<br>Bethesda IV – 4/6 (66,6%)<br>Bethesda V – 0/6 (0,0%)<br>Bethesda VI – 0/6 (0,0%) |
| Tipo Histológico                               | Bócio adenomatoso – 4/6 (66,6%)<br>Adenoma folicular – 1/6 (16,7%)<br>Adenoma oncocítico – 1/6 (16,7%)                                                                 |

Fonte: elaborado pelo autor

#### 5.4 RESULTADOS DA EXTRAÇÃO DE RNA TUMORAL E NÃO TUMORAL E CONVERSÃO PARA CDNA

Conforme protocolo do estudo, procedeu-se extração de RNA das amostras tumorais e não-tumorais. Os resultados da extração de RNA das amostras, com análise em Nano Espectrofotômetro, são apresentados no Anexo 3.

Em seguida, procedeu-se conversão de RNA para cDNA, molécula de maior estabilidade, para prosseguimento com a análise por técnica de PCR em tempo real da expressão de *HOPXβ* nas amostras estudadas.

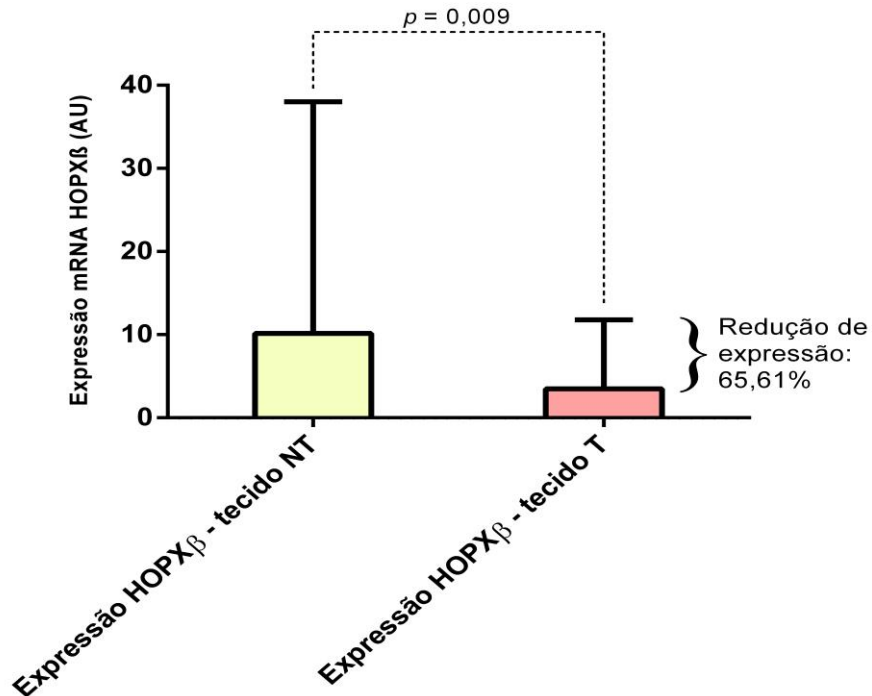
## 5.5 PCR EM TEMPO REAL

Após conversão do RNA em cDNA, o mesmo foi submetido a procedimento de PCR em tempo real, visando quantificar a expressão de *HOPXβ* em tecido tumoral e não-tumoral, além dos controles com tecidos benignos.

Das amostras de neoplasia maligna de tireoide (19/26), 73,08% apresentaram redução de expressão de *HOPXβ* no tecido tumoral (T) em comparação com o tecido não-tumoral (NT) adjacente. A análise quantitativa de expressão gênica pelo método  $\Delta\Delta C_T$  nas 26 amostras de tumor maligno evidenciou redução significativa (65,6%) da expressão de *HOPXβ* nas amostras T quando comparadas com as NT ( $3,4864 \pm 8,29$  vs.  $10,1375 \pm 27,87$ ) ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 14).

Figura 14<sup>13</sup> – Expressão de mRNA de *HOPXβ* em amostras tumorais e não-tumorais de CDT

**Expressão de *HOPXβ* em tecido tumoral (T) vs não-tumoral (NT)**  
(N = 26 pacientes com CDT)



Fonte: elaborado pelo autor.

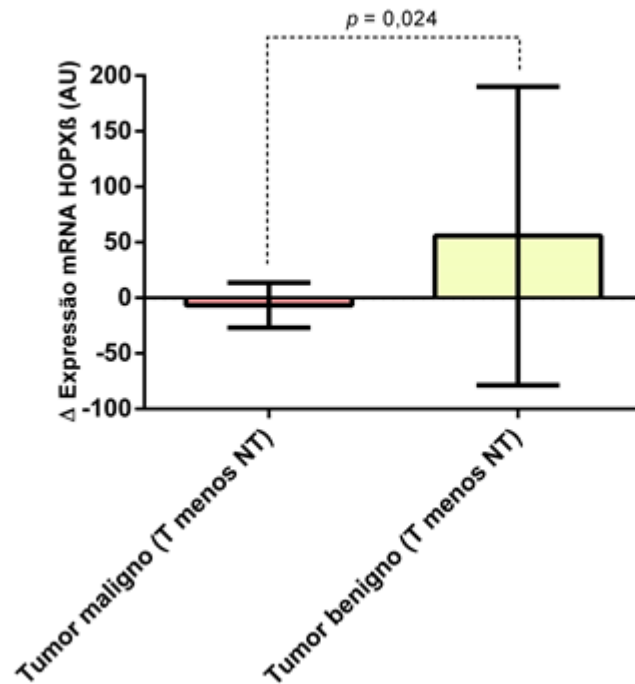
Em comparação com as amostras de tecido benigno (N=6), encontrou-se significância entre a diferença quantitativa de expressão de *HOPXβ* no tecido tumoral (T) em comparação com o tecido não-tumoral (NT) adjacente em CDT ( $p < 0,05$ ) (Figura 15).

<sup>13</sup> Legenda: T – tecido tumoral; NT – tecido não-tumoral (adjacente ao tumor)



Figura 15<sup>14</sup> – Diferença de expressão de *HOPXβ* em tecido T e NT entre neoplasias malignas e benignas de tireoide

**Diferença da expressão de *HOPXβ* em tecido maligno (N = 26) vs benigno (N = 6)**



Fonte: elaborado pelo autor.

Foi procedida análise de associação da redução de expressão de *HOPXβ* com aspectos clínico-patológicos dos pacientes com CDT. Os resultados estão expostos na Tabela 17.

Tabela 17<sup>15</sup> – Análise de associação entre a expressão de *HOPXβ* e aspectos clínico-patológicos em CDT (N = 26 pacientes)

| Variável Clínica | Redução da expressão de <i>HOPXβ</i> em tecido tumoral versus não tumoral |         |                                       | Valor de <i>p</i>  |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------|---------------------------------------|--------------------|
|                  | Presente                                                                  | Ausente | % de tumores com redução de expressão |                    |
| <b>Idade</b>     |                                                                           |         |                                       |                    |
| < 45 anos        | 11                                                                        | 1       | 91,7%                                 | 0,048 <sup>§</sup> |
| ≥ 45 anos        | 8                                                                         | 6       | 57,1%                                 |                    |
| <b>Sexo</b>      |                                                                           |         |                                       |                    |
| Masculino        | 5                                                                         | 1       | 83,3%                                 | 0,518              |
| Feminino         | 14                                                                        | 6       | 70,0%                                 |                    |

<sup>14</sup> Legenda: T – tecido tumoral; NT – tecido não-tumoral (adjacente ao tumor)

<sup>15</sup> .Legenda: § - significativo pelo teste do qui-quadrado; §§ - significativo pelo teste de Kruskal-Wallis

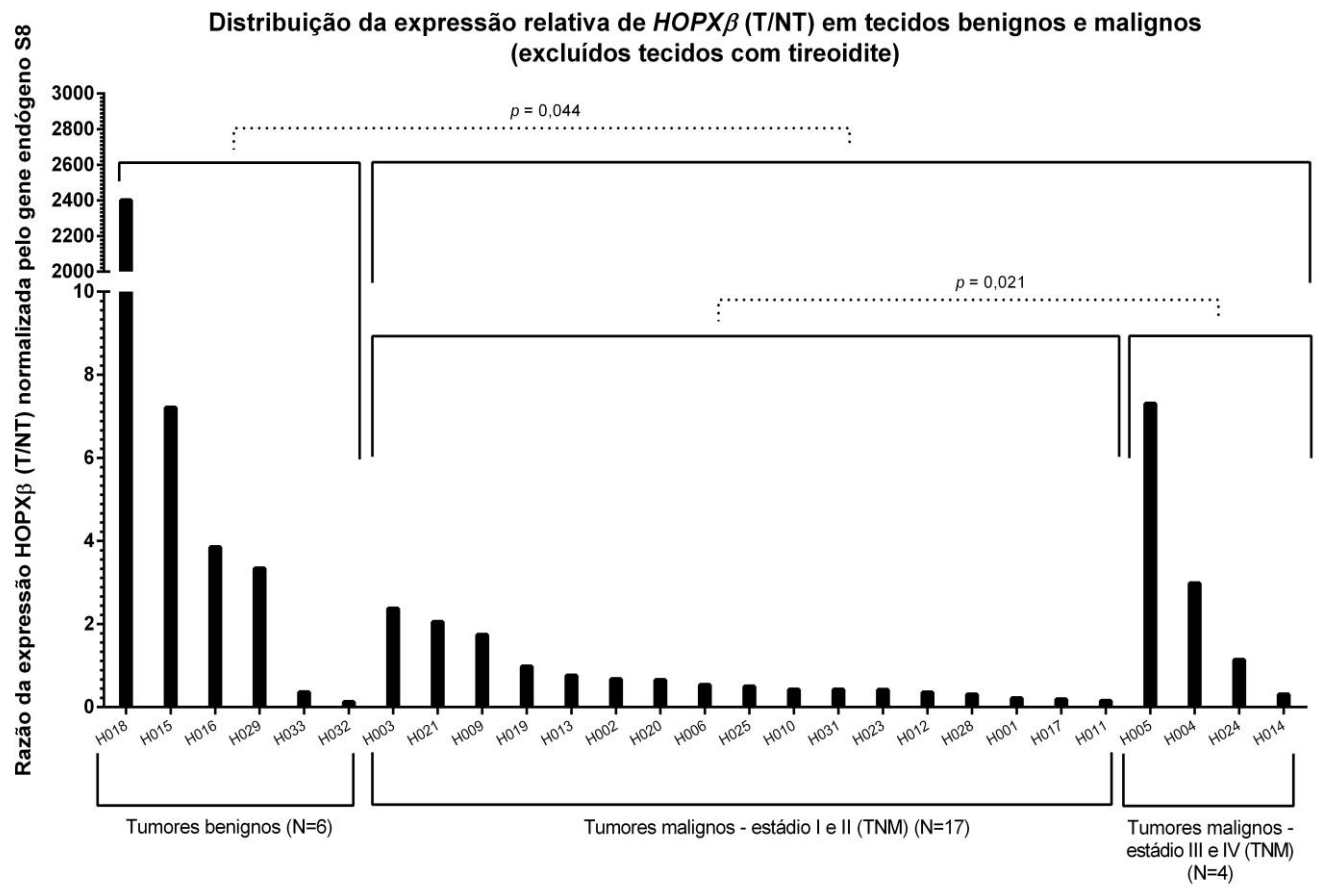
|                                                               |    |   |        |                     |
|---------------------------------------------------------------|----|---|--------|---------------------|
| <b>Classificação PAAF</b>                                     |    |   |        |                     |
| Bethesda II                                                   | 1  | 0 | 100,0% | 0,115               |
| Bethesda III                                                  | 2  | 0 | 100,0% |                     |
| Bethesda IV                                                   | 0  | 0 | -      |                     |
| Bethesda V                                                    | 7  | 5 | 58,3%  |                     |
| Bethesda VI                                                   | 9  | 1 | 90,0%  |                     |
| <b>Presença de microcalcificações ao USG</b>                  |    |   |        |                     |
| Sim                                                           | 4  | 2 | 66,7%  | 0,686               |
| Não                                                           | 15 | 5 | 75,0%  |                     |
| <b>Tamanho tumoral ao anátomo-patológico</b>                  |    |   |        |                     |
| ≤ 2 cm                                                        | 17 | 7 | 70,8%  | 0,372               |
| > 2 cm e ≤ 4 cm                                               | 2  | 0 | 100,0% |                     |
| ≥ 4 cm                                                        | 0  | 0 | -      |                     |
| <b>Microcarcinoma (até 1 cm de diâmetro)</b>                  |    |   |        |                     |
| Sim                                                           | 14 | 6 | 70,0%  | 0,518               |
| Não                                                           | 5  | 1 | 83,3%  |                     |
| <b>Tipo histológico</b>                                       |    |   |        |                     |
| Carcinoma papilífero                                          | 18 | 7 | 72,0%  | 0,383               |
| Carcinoma oncócítico                                          | 1  | 0 | 100,0% |                     |
| <b>Subtipo histológico (apenas para carcinoma papilífero)</b> |    |   |        |                     |
| Variante clássica                                             | 18 | 4 | 81,8%  | 0,004 <sup>SS</sup> |
| Variante folicular                                            | 0  | 2 | 0,0%   |                     |
| Variante sólida                                               | 0  | 1 | 0,0%   |                     |
| <b>Presença de tireoidite associada</b>                       |    |   |        |                     |
| Sim                                                           | 4  | 1 | 80,0%  | 0,698               |
| Não                                                           | 15 | 6 | 71,4%  |                     |
| <b>Tumor multifocal</b>                                       |    |   |        |                     |
| Sim                                                           | 10 | 5 | 66,7%  | 0,390               |
| Não                                                           | 9  | 2 | 81,8%  |                     |

|                                             |    |   |        |       |
|---------------------------------------------|----|---|--------|-------|
| <b>Extensão extra-tireoidiana</b>           |    |   |        |       |
| Sim                                         | 6  | 2 | 75,0%  | 0,883 |
| Não                                         | 13 | 5 | 72,2%  |       |
| <b>Invasão capsular</b>                     |    |   |        |       |
| Sim                                         | 8  | 2 | 80,0%  | 0,529 |
| Não                                         | 11 | 5 | 68,8%  |       |
| <b>Invasão angiolinfática</b>               |    |   |        |       |
| Sim                                         | 16 | 4 | 80,0%  | 0,146 |
| Não                                         | 3  | 3 | 50,0%  |       |
| <b>Invasão perineural</b>                   |    |   |        |       |
| Sim                                         | 2  | 1 | 66,7%  | 0,790 |
| Não                                         | 17 | 6 | 73,9%  |       |
| <b>Margem cirúrgica comprometida</b>        |    |   |        |       |
| Sim                                         | 2  | 1 | 66,7%  | 0,790 |
| Não                                         | 17 | 6 | 73,9%  |       |
| <b>Metástase locorregional (linfonodos)</b> |    |   |        |       |
| Sim                                         | 4  | 2 | 66,7%  | 0,686 |
| Não                                         | 15 | 5 | 75,0%  |       |
| <b>Estadiamento TNM</b>                     |    |   |        |       |
| Estádio I                                   | 16 | 4 | 80,0%  | 0,124 |
| Estádio II                                  | 1  | 0 | 100,0% |       |
| Estádio III                                 | 2  | 3 | 40%    |       |
| Estádio IV                                  | 0  | 0 | -      |       |
| <b>Estadiamento TNM (categorizado)</b>      |    |   |        |       |
| Estádio I + II                              | 17 | 4 | 81,0%  | 0,064 |
| Estádio III + IV                            | 2  | 3 | 40,0%  |       |

Fonte: elaborado pelo autor

Em trabalho de análise de padrão de metilação de genes em diferentes subtipos histológicos de carcinoma de tireoide, Hoque e colaboradores (2005) indicam que genes cuja expressão é regulada epigeneticamente podem ter seu padrão de expressão alterado em presença de tireoidite associada ao tumor (HOQUE et al, 2005). Desta forma, optamos por proceder reanálise dos dados clínicos, excluindo os tumores que apresentavam tireoidite associada (N = 5, todos malignos). A diferença de expressão entre tumores benignos e malignos continuou significativa ( $p = 0,044$ ) e foi encontrada significância na diferença da expressão gênica nos tumores classificados como Estádio I + II quando comparados aos tumores em Estádio III + IV ( $p = 0,021$ ), conforme demonstrado na Figura 16.

Figura 16<sup>16</sup> – Gráfico de distribuição da expressão de *HOPXβ* (T/NT) em neoplasias malignas e benignas de tireoide



Fonte: elaborado pelo autor.

<sup>16</sup> Legenda: T – tecido tumoral; NT – tecido não-tumoral (adjacente ao tumor)

## 6 DISCUSSÃO

Estudos prévios já identificaram várias alterações genéticas envolvidas na carcinogênese tireoidiana. Embora vários genes supressores tumorais estejam, de fato, inativados por deleções e/ou mutações nas células cancerígenas, mecanismos epigenéticos, incluindo hipermetilação anormal de ilhas CpG na região promotora, também podem contribuir para o processo de silenciamento transcricional gênico, contribuindo para o desenvolvimento e progressão do CDT.

Os resultados do presente estudo apontam, pela primeira vez, que existe menor expressão gênica de *HOPX* em pacientes com carcinoma diferenciado de tireoide, em comparação com tecidos não-tumorais (redução de 65,6%;  $p = 0,009$ ) e formas benignas de tumores tireoidianos ( $p = 0,024$ ). A redução de expressão observada pode ser resultante de vários mecanismos: mutação inativadora do gene, modificações epigenéticas como metilação do DNA e ação de deacetilases de histonas (HDAC) ou modulação por outro gene *upstream*. Nossos achados de redução de expressão do gene *HOPX* ainda são interessantes por vários motivos, mas sobretudo porque ocorrem predominantemente em estádios precoces da tumorigênese (Estádio I + II), podendo ainda ser observado em alguns casos de doença benigna. Este perfil diverge da clássica inativação gênica observada para importantes genes supressores tumorais como *p53*, que geralmente ocorre em tumores de estágio mais avançados e subtipos histológicos mais indiferenciados (XING et al, 2004).

Pauws e colaboradores avaliaram 6 amostras de carcinoma papilífero submetidas a análise por técnica de *Northern Blot* e RT-PCR visando observar a expressão de *HOPX*, também denominado de *SMAP31*, usando como comparador o tecido normal adjacente ao tumor e 4 amostras de tecido tireoidiano normal. Em 4 das 6 amostras de tecido tumoral estudadas, a expressão de *HOPX* foi aumentada em comparação com o tecido não-tumoral adjacente que, por sua vez, apresentou expressão de *HOPX* maior do que as amostras de tecido normal utilizadas no estudo. Isto levou os autores a considerar que o aumento da expressão de *HOPX* seria um evento precoce na carcinogênese tireoidiana (PAUWS et al, 2004).

Entretanto, nossos dados são divergentes e esta hipótese não condiz com o papel supressor tumoral já estabelecido para *HOPX* em outros tumores (YAMASHITA, KATOH e WATANABE, 2013). A função de *HOPX* como gene supressor tumoral tem sido descrito na literatura em diversos tipos celulares, tais como adenocarcinoma de pulmão, tumor

trofoblástico placentário, carcinoma escamocelular de esôfago, carcinoma de endométrio, adenocarcinoma de estômago, adenocarcinoma colorretal e adenocarcinoma de pâncreas (YAMASHITA, KATOH e WATANABE, 2013). Os estudos utilizando análise de expressão de *HOPX* em células cancerígenas e/ou análise qualitativa e quantitativa da hipermetilação da região promotora de *HOPXβ* nestes tecidos em comparação com amostras não-tumorais indicam associação da diminuição da expressão gênica de *HOPX* com aspectos clinicopatológicos de agressividade em diferentes tecidos, tais como em câncer de esôfago (YAMASHITA et al, 2008), de estômago (OOKI et al, 2010), de pulmão (CHEN et al, 2007) e colorretal (KATOH et al, 2012).

Além disso, o pequeno universo amostral do estudo de Pauws e colaboradores pode ter levado a viés de interpretação. A ausência de dados clínicos dos pacientes selecionados no estudo de Pauws, bem como a não-realização de análise de hipermetilação para confirmação dos dados de expressão gênica, dificultam uma análise mais conclusiva de seus resultados.

Nosso estudo encontrou uma redução significativa na expressão de *HOPX* em tecido tumoral maligno em comparação a amostras de tumores benignos. Entretanto, ao classificarmos os tumores quanto ao estadiamento TNM, encontramos uma tendência à menor expressão de *HOPX* nos estádios mais iniciais (I e II) em comparação com estádios mais avançados (III e IV) ( $p = 0,064$ ), que se mostrou significativa ao eliminarmos as amostras de CDT com tireoidite associada ( $p = 0,021$ ). Este aspecto da expressão de *HOPX* em CDT vai de encontro ao padrão de expressão de diversos genes com função de supressão tumoral regulados epigeneticamente em câncer de tireoide, cuja expressão se reduz na medida em que o tumor torna-se mais indiferenciado (SCHAGDARSURENGIN et al, 2006). Este achado pode dever-se à influência de genes relacionados com agressividade tumoral em CDT (p.ex.: mutações do gene *BRAF* e/ou *TERT*) no padrão de metilação e consequente expressão de *HOPXβ*. Pretendemos analisar esta hipótese em etapas futuras deste estudo pois, no momento, as amostras tumorais ainda não foram avaliadas para a mutação *BRAF*<sup>V600E</sup> e mutações na região promotora do gene *TERT*. Em CPT, a hipermetilação de região promotora do gene *RASSF1A*, outro supressor tumoral, esteve correlacionada negativamente com a mutação *BRAF*<sup>V600E</sup>. A alta prevalência de hipermetilação de *RASSF1A* em casos de adenomas e CPT *BRAF*<sup>V600E</sup> negativos fornece evidência epigenética para a hipótese de que tumores *BRAF*<sup>V600E</sup> negativos sejam oriundos de adenomas benignos da tireoide (XING et al, 2004). É possível que a maior diferença da expressão gênica nos tumores classificados como Estádio I + II quando comparados aos tumores em Estádio III + IV ( $p = 0,021$ ) seja correlacionado com a conhecida menor prevalência de mutação *BRAF*<sup>V600E</sup> em tumores Estádio I + II (LI et al,

2012). Em estudo com alta prevalência de mutação  $BRAF^{V600E}$  em amostras tumorais de CPT, o gene *RASSF1A* também apresentou padrão de reduzida hipermetilação (SCHAGDARSURENGIN et al, 2002). Portanto, é possível que a redução da expressão do gene *HOPX* e sua inativação epigenética represente mecanismo importante na formação do adenoma benigno de tireoide e sua progressão para CPT, sobretudo em tumores Estádio I/II e na ausência da mutação  $BRAF^{V600E}$ , contudo esta hipótese ainda deverá ser melhor investigada. A expressão reduzida do *HOPX* poderia estar envolvida na expansão clonal progressiva de tumores benignos e, quando o acúmulo desta hipermetilação atinge níveis críticos ou, talvez, novos eventos genéticos/epigenéticos se sobreponham, poderia ocorrer transformação de lesões benignas em CPT.

Em nosso estudo, a redução da expressão de *HOPX* não teve associação significativa com o grau de agressividade tumoral, sugerindo que a perda de expressão de *HOPX* pode ser importante em todos estádios tumorais, independente do grau de diferenciação. No entanto, após exclusão das amostras positivas para tireoidite de hashimoto, houve comprovadamente uma maior associação da redução de expressão com tumores classificados como Estádio I + II quando comparados aos tumores em Estádio III + IV ( $p = 0,021$ ) (Figura 16). Hoque e colaboradores enfatizaram o papel da presença de infiltrado linfocítico (tireoidite de Hashimoto) associado à neoplasia maligna de tireoide no padrão de metilação (e, por consequência, na expressão) de genes como *RAR $\beta$ 2*, *CDH1* e *TIMP3* (HOQUE et al, 2005). Este aspecto já foi descrito em outros tipos celulares, como no processo inflamatório induzido por *Helicobacter pylori* no epitélio gástrico (NIWA et al, 2010), indicando que múltiplos fatores são capazes de influenciar a expressão de genes epigeneticamente regulados.

Além disso, também houve diminuição de expressão em 33% (2/6) dos casos de doença benigna da tireoide (Figura 16; amostras H032 e H033). De fato, alguns estudos prévios demonstraram hipermetilação da região promotora de genes associados a câncer endometrial como *RASSF1A*, *RAR $\beta$ 2* (ARAF A et al, 2008) e *MLH1* (KANAYA et al, 2003), em tecido normal imediatamente vizinho ao tumor. Hoque e colaboradores destacam que alguns genes, como *RASSF1A*, possuem considerável sobreposição (*overlapping*) do padrão de expressão em tecidos tireoidianos benignos e malignos, sugerindo que a hipermetilação da região promotora e a redução da expressão destes genes seria um evento precoce na tumorigênese. Contudo, esta sobreposição do padrão de hipermetilação e expressão gênica não é tão comumente observada em tecidos não-endócrinos (HOQUE et al, 2005). Especula-se que alterações da expressão e da metilação do gene *HOPX* em tecido adjacente aparentemente normal já possam predizer uma evolução maligna, uma vez que podem

representar estágios iniciais de uma futura transformação para câncer. Por outro lado, o possível impacto do microambiente celular na expressão de *HOPX* não pode ser descartado. Yamaguchi e colaboradores demonstraram o papel do estradiol ( $E_2$ ) na supressão da expressão de *HOPX* em tumores e linhagens celulares de carcinoma endometrial (YAMAGUCHI et al, 2009).

Tendo em vista o conhecimento prévio do controle epigenético da expressão de *HOPX* através da hipermetilação de sua região promotora, bem como a evolução dos diversos programas de bioinformática utilizados para identificar ilhas CpG, o que potencialmente pode levar a novas caracterizações em regiões previamente estudadas (GALRÃO, 2011), optamos por primeiramente realizar a caracterização da ilha CpG da região promotora de *HOPX $\beta$* , utilizando as ferramentas de bioinformática atualmente disponíveis. Identificamos a ilha CpG contendo 234 pares de bases de extensão. Posteriormente, desenhamos os iniciadores para uso futuro na metodologia de QMSP. Esta metodologia permite a quantificação da metilação gênica e a geração de escore para classificação quantitativa do grau de hipermetilação nos tecidos tumorais e não-tumorais; entretanto, possui a limitação de albergar apenas 6 sítios CpG's, além daqueles já contidos nos iniciadores. Desta forma, optamos por também desenhar iniciadores para etapa subsequente de sequenciamento após tratamento do DNA com bissulfito e clonagem (que não será realizada no escopo deste estudo), que possibilita o estudo do estado de metilação de região com maior número de sítios CpG's (61).

Com relação aos diversos aspectos clínico-patológicos estudados, encontramos associação da menor expressão de *HOPX* com idade abaixo de 45 anos ( $p = 0,048$ ). Tendo em vista que a classificação TNM para o câncer de tireoide utiliza a idade como um fator para definição de estadiamento (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2010), este dado correlaciona-se com o previamente descrito, de menor expressão de *HOPX $\beta$*  em estádios iniciais do CDT. A análise de expressão de *HOPX $\beta$*  em outros tecidos, como câncer gástrico (OOKI et al, 2010) e câncer de pâncreas (WARAYA et al, 2012), não demonstrou associação com faixa etária, apesar de numericamente prevalecer a redução da expressão em pacientes mais idosos. Como comparação, a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup>, que constitui a alteração genética mais frequente em CDT, foi correlacionada com maior idade em diferentes estudos (ZUO et al, 2007; WANG et al, 2012).

O achado de associação da redução de expressão de *HOPX* com a variante clássica (considerada de menor agressividade) do carcinoma papilífero de tireoide (CPT) ( $p = 0,004$ ) deve ser analisada com cautela, haja vista que apenas 12% (3/25) dos pacientes com CPT tinham outras variantes histológicas. Análises futuras, incluindo maior universo amostral de



variantes agressivas de CPT, permitirão elucidar melhor esta associação da expressão de *HOPX* com subtipos histológicos.

A ocorrência do câncer de tireoide em mulheres é 3-4 vezes maior do que em homens, o que também é observado em tumores benignos da glândula (DERWAHL e NICULA, 2014). A associação entre CDT e exposição ao  $17\beta$  estradiol ( $E_2$ ) provém de estudos observacionais que demonstram aumento da ocorrência de CDT a partir da puberdade (DERWAHL e NICULA, 2014), com queda após a menopausa (LI et al, 2013), em comparação com faixa etária semelhante no sexo masculino. Posteriormente, estudos experimentais demonstraram claramente que  $E_2$  é um potente estimulador de células tireoidianas benignas e malignas (DERWAHL e NICULA, 2014). Neste contexto, é crucial ressaltar que  $E_2$  age, via seu receptor  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) ou receptor acoplado a proteína G GPR30 induzindo expressão de *c-fos*, de modo dependente do SRE (*Serum Response Element*), em carcinoma endometrial e linhagens de células de câncer de mama. Na verdade, *c-fos* é um gene de resposta imediata, que responde rapidamente à diversos estímulos extracelulares como hormônios esteróides e outros mitógenos. Subsequentemente, *c-Fos* termina interagindo com outros fatores de transcrição para formar complexos de fatores de transcrição AP1 (*Activating Protein 1*), que regulam a expressão de múltiplos genes envolvidos no crescimento celular, diferenciação e transformação, incluindo Ciclina D1.

*HOPX* possui um *homeodomain* único, incapaz de ligar-se à sequências específicas de DNA. No entanto, *HOPX* interage ativamente com SRF e promove recrutamento de HDAC, reduzindo a capacidade de SRF ligar-se ao DNA e assim exercer seu papel na transcrição gênica. A proteína SRF dimerizada normalmente reconhece SRE (*Serum Response Element*) e promove recrutamento de TCFs (*Ternary Complex Factors*). Os TCFs possuem três membros: SAP1 (proteína acessória ao SRF tipo 1), SAP2 e ELK-1. Após estímulo estrogênico, SRF e ELK-1 são normalmente ativados via PI3K (fosfatidilinositol 3 quinase) e MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos), respectivamente. Podemos especular que a hipermetilação do gene *HOPX* e seu silenciamento, poderia contribuir para um possível efeito deletério do estrógeno na carcinogênese tireoidiana. A menor expressão de *HOPX* levaria ao aumento do SRE via ativação do SRF, contribuindo para maior produção de *c-fos* induzida por  $E_2$  endógeno e, desta forma, contribuindo para maior carcinogênese observada no sexo feminino.

A estimulação da via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) por RAS tem a capacidade de induzir senescência (processo de envelhecimento celular progressivo, relacionado com o encurtamento de telômeros) em vários tipos celulares,

este processo é geralmente regulado por p53 e pRB. Adicionalmente, MAPK e AKT são componentes de duas vias paralelas de sinalização de RAS. Em trabalho recém-publicado, Chen e colaboradores identificaram que a expressão ectópica de HOPX em linhagens celulares de adenocarcinoma de pulmão resultaram em ativação de RAS, o que por sua vez levou à ativação/fosforilação de ERK e p38, dois dos principais participantes da via de sinalização de MAPK. Entretanto, a superexpressão de HOPX levou à inativação de AKT, *downregulation* de MDM2 (um regulador negativo de p53), além da elevação dos níveis de fosforilação de H2A.X (um marcador de senescência) em células transfectadas com HOPX em comparação com células controles. Desta forma, a indução do processo de senescência celular pode ser um dos mecanismos pelos quais HOPX atua como supressor tumoral (CHEN et al, 2014).

As múltiplas interfaces de HOPX com a via de sinalização de MAPK e AKT (Figura 2) permitem adicional especulação acerca de possível correlação entre a mutação somática BRAF<sup>V600E</sup>, principal alteração genética relacionada ao CDT, e a hipermetilação da região promotora de *HOPXβ*. Weisenberger e colaboradores demonstraram que o uso da classificação fenotípica baseada no padrão de metilação (CIMP – fenótipo metilador de ilha CpG) associou-se fortemente com a presença de mutações do gene *BRAF* em amostras de câncer colorretal (*odds ratio* = 203,  $p < 10^{-20}$ ). Esta associação com a mutação do gene *BRAF* foi mais importante inclusive do que com as alterações epigenéticas previamente conhecidas associadas ao câncer colorretal, como a hipermetilação de *MLH1* (WEISENBERGER et al, 2006). No entanto, para *RASSF1A* existe exclusão mútua entre sua hipermetilação e mutações no gene *RAS* nos carcinomas de cólon (VAN ENGELAND et al, 2002) e de pâncreas (DAMMANN et al, 2002), além da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em CPT (XING et al, 2004)

Em trabalho analisando o controle epigenético da expressão de *NIS*, Galvão (2011) verificou que 45,5% dos tumores malignos sem a mutação BRAF<sup>V600E</sup> apresentavam maior nível de metilação no tecido tumoral (T) em comparação ao seu tecido não tumoral (NT), enquanto que nas amostras positivas para a mutação BRAF<sup>V600E</sup> somente 22% dos tumores malignos apresentavam hipermetilação de *NIS* em comparação com o tecido NT adjacente. A autora considerou que, apesar de não ter detectado diferença significativa entre os grupos, não seria possível descartar influência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> na metilação, neste caso sugerindo que na presença da mutação o controle da expressão gênica por metilação poderia estar diminuído (GALRÃO, 2011).

No nosso estudo piloto, não encontramos associação entre a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> e alterações de expressão de *HOPX*. Contudo, em análise quantitativa de

metilação (QMSP) de um painel de 22 genes, Brait e colaboradores encontraram correlação positiva para a ocorrência da mutação  $BRAF^{V600E}$  com a hipermetilação de *RAR $\beta$ 2* e *TIMP3* e correlação negativa com a hipermetilação de *RASSF1A*, sem identificar novos genes que pudessem ser correlacionados com a mutação (BRAIT et al, 2012). Estes achados demonstram a dificuldade em encontrar um gene cuja análise do padrão de metilação seja adequada para finalidades diagnósticas e terapêuticas.

Kunstman e colaboradores (2013) investigaram o uso da avaliação quantitativa da metilação de *RASSF1A* como marcador molecular no carcinoma papilífero de tireoide (CPT). Para tanto, analisaram 41 amostras de tecido tumoral em comparação com 18 amostras de tecido normal, sendo 11 amostras não-tumorais adjacentes ao tumor e 7 amostras provenientes de tireoide com doença benigna. Utilizando metodologia de análise de metilação (MethylScreen™ Technology - Orion Genomics, St Louis, MO) associada a análise por PCR em tempo real, encontrou-se correlação positiva com multifocalidade e correlação negativa com invasão extracapsular, sugerindo papel auxiliar da análise de hipermetilação de *RASSF1A* na caracterização histopatológica do CPT (KUNSTMAN et al, 2013).

Em nossa casuística de base prospectiva, notou-se elevada prevalência de microcarcinomas, condição que normalmente é detectada no exame de imagem antes do surgimento de sintomas ou sinais clínicos que indiquem a presença do nódulo. De fato, diversos estudos vêm demonstrando que, em populações cujo acesso aos Serviços de Saúde foi facilitado, o diagnóstico de neoplasias malignas de tireoide vem crescendo de forma importante, levando à detecção precoce de nódulos com menos de 1,0 cm de diâmetro (HUGHES et al, 2011; MORRIS et al, 2013). Por outro lado, 30,7% dos pacientes com CDT apresentaram extensão extra-tireoidiana e 38,4% apresentaram invasão capsular, sugerindo maior agressividade tumoral. De fato, apesar das principais diretrizes atualmente em voga preconizarem o uso do tamanho tumoral como critério de agressividade tumoral e fator para classificação de risco de recorrência, alguns trabalhos indicam que o uso isolado do tamanho tumoral como critério para definição diagnóstica e terapêutica pode levar a interpretações equivocadas (PAKDAMAN et. al, 2008; VARSHNEY et. al., 2014). Neste contexto, o uso de novos métodos de avaliação do CDT, como o uso de marcadores moleculares, pode levar a melhor estratificação de risco e planejamento terapêutico individualizado.

## 7 CONCLUSÃO

O presente trabalho indica, de forma inédita, redução da expressão do *homeobox* gene *HOPX* em amostras de carcinoma diferenciado de tireoide, em comparação com tecidos não-tumorais adjacentes ao tumor e tecidos benignos, corroborando dados previamente descritos em neoplasias malignas de outros tecidos.

Por outro lado, diferentemente de estudos previamente realizados analisando a expressão de *HOPX* em outros tecidos tumorais, não encontramos associação com características indicativas de maior agressividade tumoral nos tumores com redução de expressão de *HOPX*. Excluindo amostras com tireoidite, a redução da expressão de *HOPX* esteve associada a estádios mais iniciais de neoplasia (I e II, classificação TNM), em comparação com estádios mais avançados (III e IV). Estes achados sugerem uma possível especificidade dos mecanismos de controle da expressão gênica de *HOPX* em CDT, mediante influências microambientais e genéticas ainda não identificadas.

Estudos complementares permitirão validar estes achados em outras populações, bem como elucidar melhor o papel de *HOPX* na tumorigênese tireoidiana, incluindo o estudo do seu mecanismo molecular de supressão tumoral, dos genes regulados por *HOPX*, da regulação de sua expressão gênica, bem como o papel da expressão de *HOPX* como marcador de prognóstico clínico e risco de recorrência tumoral em câncer de tireoide. Subsequentemente, será importante definir se a redução de expressão de *HOPX* tem impacto na angiogênese, crescimento tumoral, apoptose, senescência celular e invasividade tumoral, através de estudos funcionais.

## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas de continuidade do presente projeto, incluem-se análise da mutação BRAF<sup>V600E</sup> nas amostras estudadas, bem como quantificação da metilação da região promotora do *homeobox* gene *HOPXβ* por técnica quantitativa (QMSP – reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real, específica para metilação) após conversão do DNA com bissulfato de sódio. A análise por QMSP permite quantificar o nível de metilação de cada amostra, dependendo do grau de amplificação e da fluorescência emitida pela sonda hibridizada. A amplificação será proporcional ao grau de citosinas metiladas na região estudada, sendo o valor de metilação calculado como a relação entre o valor de amplificação do gene alvo e o do gene controle interno. Este método é considerado mais preciso do que a análise de expressão gênica, em virtude de envolver manipulação de DNA (molécula mais estável que o RNA), evitar contaminação gênica (p.ex. proveniente de hemácias) e ter maior possibilidade de aplicação futura na prática clínica.

Além disso, redução na expressão do gene *HOPX* em CDT, ao nível proteico, pode ser confirmada por imunohistoquímica e *Western Blot*. Estudo mais extenso, com número maior de amostras tumorais, poderá confirmar a importância da expressão de *HOPX* e sua potencial aplicabilidade na análise do CDT.

## REFERÊNCIAS

ABATE-SHEN, C. Deregulated Homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? **Nat. Rev. Cancer**, London, v.2, n.10, p.777-785, oct. 2002.

ALEXANDER, E. K. et al. Preoperative Diagnosis of Benign Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.367, n.8, p.705-715, aug. 2012.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. Thyroid. In: AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. **AJCC Cancer Staging Manual**. 7th ed. Chicago:Springer, 2010. p.89.

ARAFI, M. et al. High frequency of RASSF1A and RARb2 gene promoter methylation in morphologically normal endometrium adjacent to endometrioid adenocarcinoma. **Histopathology**, Oxford, v.53, n.5, p.525-532, nov. 2008.

ASANOMA, K. et al. NECC1, a candidate choriocarcinoma suppressor gene that encodes a homeodomain consensus motif. **Genomics**, San Diego, v.81, n.1, p.15-25, jan. 2003.

BAYLIN, S.B.; JONES, P.A. A decade of exploring the cancer epigenome – biological and translational implications. **Nat. Rev. Cancer**, London, v.11, n.10, p.726-734, sept. 2011.

BRAIT, M. et al. Correlation between BRAF mutation and promoter methylation of TIMP3, RARβ2 and RASSF1A in thyroid cancer. **Epigenetics**, Philadelphia, v.7, n.7, p.710-719, july 2012.

BROSE, M.S. et al. Sorafenib in radioactive iodine-refractory, locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 3 trial. **Lancet**, London, v.384, n.9940, p.319-328, july 2014.

CARLOMAGNO, F.; SANTORO, M. Thyroid cancer in 2010: a roadmap for targeted therapies. **Nat. Rev. Endocrinol.**, London, v.7, n.2, p.65-67, feb. 2011.

CATALANO, M.G.; FORTUNATI, N.; BOCUZZI, G. Epigenetics modifications and therapeutic prospects in human thyroid cancer. **Front. Endocrinol.**, Lausanne, v.19, n.3, p.1-8, mar. 2012.

CHEN, F. et al. Hop is an Unusual Homeobox Gene that Modulates Cardiac Development. **Cell**, Cambridge, v.110, n.6, p.713-723, sept. 2002.

\_\_\_\_\_. Homeobox gene HOP has a potential tumor suppressive activity in human lung cancer. **Int. J. Cancer**, New York, v.121, n.5, p.1021–1027, sept. 2007.

\_\_\_\_\_. HOPX is methylated and exerts tumour suppressive function through Ras-induced senescence in human lung cancer. **J. Pathol.**, Edinburgh, doi: 10.1002/path.4469. [Epub ahead of print], 2014 oct. 24.

CHEUNG, W.K. et al. Control of alveolar differentiation by the lineage transcription factors

GATA6 and HOPX inhibits lung adenocarcinoma metastasis. **Cancer Cell**, Cambridge, v.23, n.6, p.725-738, june 2013.

CIAROCCHI, A.; CAVUTO, S.; PIANA, S. BRAF V600E mutation and papillary thyroid cancer. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.310, n.5, p.534, aug. 2013.

CIBAS, E.S.; ALI, S.Z. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. **Thyroid**, New York, v.19, n.11, p.1159-1165, nov. 2009.

COCHRAN, W.G. The Estimation of Sample Size. In: COCHRAN, W.G. **Sampling Techniques**, 3rd ed. New York:Wiley, p. 72-88, 1977.

COOPER, D. S.; GREENSPAN, F. S; LADENSON, P.W. The Thyroid Gland. In: GARDNER, D.G.; SHOBACK, D. **Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology**. 8<sup>th</sup> Ed. New York, p. 209-280, 2007.

COOPER, D.S. et al. Revised American Thyroid Association Management Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. **Thyroid**, New York, v.19, n.11, p.1167-1214, nov. 2009.

DAMMANN, R. et al. Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. **Oncogene**, Basingstoke, v.22, n.24, p.3806-3812, june 2003.

DAVIES, L.; WELCH, H.G. Increasing Incidence of Thyroid Cancer in the United States, 1973-2002. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.295, n.18, p.2164-2167, may 2006.

DAVIDSON, L.A. et al. Alteration of colonic stem cell gene signatures during the regenerative response to injury. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1822, n.10, p.1600-1607, oct. 2012.

DE FELICE, M; DI LAURO, R. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v.25, n.5, p.722-746, oct. 2004.

DELELLIS, R.A. et al. Thyroid cancer - World Health Organization (WHO) classification. In: DELELLIS, R.A. et al. **World Health Organization Classification of Tumours - Tumours of Endocrine Organs**. Lyon:IARC Press, 2004. p.50.

DERWAHL, M.; NICULA, D. Estrogen and its role in thyroid cancer. **Endoc. Relat. Cancer**, Woodlands, v.21, n.5, p.T273-283, oct. 2014.

ESSERMAN, L. J.; THOMPSON JR., I. M.; REID, B. Overdiagnosis and overtreatment in cancer: an opportunity for improvement. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.310, n.8, p.797-798, aug. 2013.

ESTELLER, M. Epigenetics in Cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.358, n.11, p.1148-1159, mar. 2008.

FUSCO, A.; SANTORO, M. 20 years of RET/PTC in thyroid cancer: clinico-pathological correlations. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v.51, n.5, p.731-735, July 2007.

GALRÃO, A.L.R. **Metilação do gene simportador sódio-iodo (NIS) em tumores de tireóide**. 111 f. Tese [Doutorado em Ciências - Endocrinologia]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GALRÃO, A.L.R. et al. Hypermethylation of a New Distal Sodium/Iodide Symporter (NIS) enhancer (NDE) is associated with reduced NIS expression in thyroid tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v.99, n.6, p.E944-E952, jun. 2014.

GANDOLFI, G. et al. Allele Percentage of the BRAF V600E Mutation in Papillary Thyroid Carcinomas and Corresponding Lymph Node Metastases: No Evidence for a Role in Tumor Progression. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v.98, n.5, p.E934-E942, may 2013.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. **J. Mol. Biol.**, London, v.196, n.2, p.261-282, July 1987.

HAY, I.D. et al. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. **Surgery**, St. Louis, v.114, n.6, p.1050-1057, dec. 1993.

HAYAT, M.J. et al. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. **Oncologist**, Dayton, v.12, n.1, p.20-37, jan. 2007.

HEGEDUS, L. Thyroid ultrasonography as a screening tool for thyroid disease. **Thyroid**, New York, v.14, n.11, p.879-880, nov. 2004.

HERMAN, G.J.; BAYLIN, S.B. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.349, n.21, p.2042-2054, nov. 2003.

HOQUE, C. et al. Quantitative Assessment of Promoter Methylation Profiles in Thyroid Neoplasms. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v.90, n.7, p.4011-4018, jul. 2005.

HOWELL, G.M.; HODAK, S.P.; YIP, L. RAS mutations in thyroid cancer. **Oncologist**, Dayton, v.18, n.8, p.926-932, aug. 2013.

HUTTER, B.; PAULSEN, M.; HELMS, V. Identifying CpG islands by different computational techniques. **OMICS**, Larchmont, v.13, n.2, p.153-164, apr. 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma. In: INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro:Inca, 2014. p.55.

JANKOVIC, B.; LE, K.T.; HERSHMAN, J.M. Hashimoto's Thyroiditis and Papillary Thyroid Carcinoma: Is There a Correlation? **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v.98, n.2, p.474-482, feb. 2013.

KANAYA, T. et al. Frequent hypermethylation of MLH1 promoter in normal endometrium of patients with endometrial cancers. **Oncogene**, Basingstoke, v.22, n.15, p.2352-2360, apr.



2003.

KATAKI, A. et al. P53 and C-FOS overexpression in patients with thyroid cancer: an immunohistochemical study. **Neoplasma**, Bratislava, v.50, n.1, p.26-30, jan. 2003.

KATOH, H. et al. Epigenetic Silencing of HOPX Promotes Cancer Progression in Colorectal Cancer. **Neoplasia**, Barcelona, v.14, n.7, p.559-571, july 2012.

KIMURA, E. T. et al. High Prevalence of BRAF Mutations in Thyroid Cancer: Genetic Evidence for Constitutive Activation of the RET/PTC-RAS-BRAF Signaling Pathway in Papillary Thyroid Carcinoma. **Cancer Res.**, Baltimore, v.63, n.7, p.1454-1457, apr. 2003.

KIMURA, E.T.; MATSUO, S.E.; RICARTE-FILHO, J.C. [TGFbeta, activin and SMAD signalling in thyroid cancer]. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v.51, n.5, p.683-689, july 2007.

KLEIN HESSELINK, E. N. et al. Long-term cardiovascular mortality in patients with differentiated thyroid carcinoma: an observational study. **J. Clin. Oncol.**, New York, v.31, n.32, p.4046-4053, nov. 2013.

KOOK, H. et al. Analysis of the Structure and Function of the Transcriptional Coregulator HOP. **Biochemistry**, Washington, v.45, n.35, p.10584-10590, sept. 2006.

KONDO, T.; ASA, S. L.; EZZAT, S. Epigenetic Dysregulation in Thyroid Neoplasia. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.37, n.2, p.389-400, june 2008.

KROHN, K. et al. Molecular Pathogenesis of Euthyroid and Toxic Multinodular Goiter. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v.26, n.4, p.504-524, jun. 2005.

KUNSTMAN, J.W. et al. Quantitative assessment of RASSF1A methylation as a putative molecular marker in papillary thyroid carcinoma. **Surgery (St. Louis)**, St. Louis, v.26, n.4, p.504-524, june 2005.

LI, C. et al. BRAF V600E mutation and Its Association with Clinicopathological Features of Papillary Thyroid Cancer: A Meta-Analysis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v.97, n.12, p.4559-4570, dec. 2012.

\_\_\_\_\_. Does BRAF V600E mutation predict aggressive features in papillary thyroid cancer? Results from four endocrine surgery centers. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v.98, n.9, p.3702-3712, sept. 2013.

MACIEL, R.M.; KIMURA, E.T.; CERUTTI, J.M. [Pathogenesis of differentiated thyroid cancer (papillary and follicular)]. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v.49, n.5, p.691-700, oct. 2005.

MACIEL, R .M. Tiróide: Fisiologia e Avaliação Diagnóstica. In: SAAD, M.J.A. **Endocrinologia**, São Paulo: Atheneu, p. 299-329, 2007.

MAIA, A. L. et al. [Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: Brazilian Consensus]. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v.51, n.5, p.867-893, july 2007.

MARCELLO, M. A. et al. The influence of the environment on the development of thyroid tumors: a new appraisal. **Endoc. Relat. Cancer**, Woodlands, v.21, n.5, p.T235-T254, oct. 2014.

MAROTTA, V. et al. RET/PTC rearrangement in benign and malignant thyroid diseases: a clinical standpoint. **Eur. J. Endocrinol.**, Oslo, v.165, n.4, p.499-507, oct. 2011.

MATOS, P.S.; FERREIRA, A.P.; WARD, L.S. Prevalence of papillary microcarcinoma of the thyroid in Brazilian autopsy and surgical series. **Endocr. Pathol.**, Cambridge, v.17, n.2, p.165-173, Summer 2006.

MAZZAFERRI, E.L.; JHIANG, S.M. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. **Am. J. Med.**, New York, v.97, n.5, p.418-428, nov. 1994.

MELO, M. et al. TERT Promoter Mutations Are a Major Indicator of Poor Outcome in Differentiated Thyroid Carcinomas. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v.99, n.5, p.E754-E765, may 2014.

MCDERMOTT, U.; DOWNING, J.R.; STRATTON, M.R. Genomics and the Continuum of Cancer Care. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.364, n.4, p.340-350, jan. 2011.

MOMESSO, D.P.; TUTTLE, R.M. Update on differentiated thyroid cancer staging. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.43, n.2, p.401-421, june 2014.

MON, S.Y.; HODAK, S.P. Molecular diagnostics for thyroid nodules: the current state of affairs. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.43, n.2, p.345-365, june 2014.

MORRIS, L.T.G. et al. The Increasing Incidence of Thyroid Cancer: The Influence of Access to Care. **Thyroid**, New York, v.23, n.7, p.885-891, july 2013.

NAGY, R. et al. Frequency of Germline PTEN Mutations in Differentiated Thyroid Cancer. **Thyroid**, New York, v.21, n.5, p.505-510, may 2011.

NGEOW, J. et al. Germline alterations in RASAL1 in Cowden syndrome patients presenting with follicular thyroid cancer and in individuals with apparently sporadic epithelial thyroid cancer. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v.99, n.7, p.E1316-E1321, july 2014.

NIKIFOROV, Y.E. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v.21, Suppl 2, p.S37-S43, may 2008.

\_\_\_\_\_. Molecular analysis of thyroid tumors. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v.24, Suppl 2, p.S34-S43, apr. 2011.

NIKIFOROV, Y. E. et al. Impact of Mutational Testing on the Diagnosis and Management of Patients with Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules: A Prospective Analysis of 1056 FNA Samples. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v.96, n.11, p.3390-3397, nov. 2011.

NIKIFOROV, Y.E; NIKIFOROVA, M. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. **Nat. Rev. Endocrinol.**, London, v.7, n.10, p.569-580, aug. 2011.

NIWA, T. et al. Inflammatory Processes Triggered by Helicobacter pylori Infection Cause Aberrant DNA Methylation in Gastric Epithelial Cells. **Cancer Res.**, Baltimore, v.70, n.4, p.1430-1440, feb. 2010.

OOKI, A. et al. Potential utility of HOP homeobox gene promoter methylation as a marker of tumor aggressiveness in gastric cancer. **Oncogene**, Basingstoke, v.29, n.22, p.3263-3275, June 2010.

PACINI, F. et al. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. **Eur. J. Endocrinol.**, Oslo, v.154, n.6, p.787-803, june 2006.

PAUWS, E. et al. A novel homeobox gene overexpressed in thyroid carcinoma. **Thyroid**, New York, v.14, n.7, p.500-505, july 2004.

PEARCE, E.N.; ANDERSSON, M.; ZIMMERMANN, M. B. Global Iodine Nutrition: Where Do We Stand in 2013? **Thyroid**, New York, v.23, n.5, p.523-528, may 2013.

PITOIA, F et al. Recommendations of the Latin American Thyroid Society on diagnosis and management of differentiated thyroid cancer. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v.53, n.7, p.884-897, oct. 2009.

PLASS, C. et al. Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer. **Nat. Rev. Genet.**, London, v.14, n.11, p.765-780, Nov. 2013.

RAMAN, P.; KOENIG, R.J. Pax-8–PPAR- $\gamma$  fusion protein in thyroid carcinoma. **Nat. Rev. Endocrinol.**, London, v.10, n.10, p.616-623, oct. 2014.

RAMOS, H.E.; NESI-FRANÇA, S.; MACIEL, R.M.B. [New aspects of genetics and molecular mechanisms on thyroid morphogenesis for the understanding of thyroid dysgenesis]. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v.52, n.9, p.1403-1415, dec. 2008.

RODRIGUEZ-RODERO, S. et al. DNA Methylation Signatures Identify Biologically Distinct Thyroid Cancer Subtypes. **J. Clin. Endoc. Metab.**, Springfield, v.98, n.7, p.2811-2821, july 2013.

ROSARIO, P.W. et al. [Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: update on the Brazilian consensus]. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v.57, n.4, p.240-264, apr. 2013.

SALVATORE, D. et al. Thyroid Physiology and Diagnostic Evaluation of Patients With Thyroid Disorders. In: MELMED, S. et al. **Williams Textbook of Endocrinology**. 12<sup>th</sup> Ed. Philadelphia, p.327-361, 2011.

SANCISI, V. et al. BRAFV600E Mutation Does Not Mean Distant Metastasis in Thyroid Papillary Carcinomas. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v.97, n.9, p.E1745-E1749, Sept. 2012.

SCHAGDARSURENGIN, U. et al. CpG Island Methylation of Tumor-Related Promoters Occurs Preferentially in Undifferentiated Carcinoma. **Thyroid**, New York, v.16, n.7, p.633-

642, July 2006.

SCHLUMBERGER, M.J. Papillary and Follicular Thyroid Carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.338, n.5, p.297-306, jan. 1998.

SCHLUMBERGER, M.; FILETTI, S; HAY, I.D. Nontoxic Diffuse and Nodular Goiter and Thyroid Neoplasia. In: MELMED, S. et al. **Williams Textbook of Endocrinology**. 12<sup>th</sup> Ed. Philadelphia, p.440-475, 2011.

SHERMA, S.I. Thyroid carcinoma. **Lancet**, London, v.361, n.9356, p.501-511, feb. 2003.

SHIMAMURA, M. et al. Postnatal Expression of BRAF V600E Does Not Induce Thyroid Cancer in Mouse Models of Thyroid Papillary Carcinoma. **Endocrinology**, Baltimore, v.154, n.11, p.4423-4430, nov. 2013.

SHIN, C.H. et al. Modulation of Cardiac Growth and Development by HOP, an Unusual Homeodomain Protein. **Cell**, Cambridge, v.110, n.6, p.725-735, sept. 2002.

SILVA JR., J.C. et al. Expressão Reduzida do Gene Homeobox HOPX $\beta$  em Câncer Diferenciado de Tireoide. In: Anais do XVI Encontro Brasileiro de Tireoide. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v.58, Suppl2, p.S31, may 2014.

SU, J. et al. CpG\_MI: a novel approach for identifying functional CpG islands in mammalian genomes. **Nucleic Acids Res.**, London, v.38, n.1, p.e6, jan. 2010.

TAKAI, D.; JONES, P.A. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.99, n.6, p.3740-3745, mar. 2002.

TRIVEDI, C.M. et al. Hopx and Hdac2 Interact to Modulate Gata4 Acetylation and Embryonic Cardiac Myocyte Proliferation. **Dev. Cell**, Cambridge, v.19, n.3, p.450-459, sept. 2010.

VAN ENGELAND, M. et al. K-ras mutations and RASSF1A promoter methylation in colorectal cancer. **Oncogene**, Basingstoke, v.21, n.23, p.3792-3795, may 2002.

VARSHNEY, R. et al. Ultrasound-guided fine-needle aspiration of thyroid nodules: Does size matter? **Am. J. Otolaryngol.**, Philadelphia, v.35, n.3, p.373-376, may-june 2014.

VEIGA, L.H.S. et al. Thyroid cancer incidence patterns in Sao Paulo, Brazil, and the U.S. SEER program, 1997-2008. **Thyroid**, New York, v.23, n.6, p.748-757, june 2013.

WANG, Y.; LEUNG, F.C. An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. **Bioinformatics**, Oxford, v.20, n.7, p.261-282, may 2004.

WANG, W. et al. Poorer prognosis and higher prevalence of BRAF (V600E) mutation in synchronous bilateral papillary thyroid carcinoma. **Ann. Surg. Oncol.**, New York, v.19, n.1, p.31-36, jan. 2012.

WARAYA, M. et al. Cancer specific promoter CpG Islands hypermethylation of HOP homeobox (HOPX) gene and its potential tumor suppressive role in pancreatic carcinogenesis.

**BMC Cancer**, London, v.12, p.397, sept. 2012.

WEISENBERG, D.J. et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. **Nat. Genet.**, New York, v.38, n.7, p.787-793, jul. 2006.

WONG, R. M.; BRESEE, C.; BRAUNSTEIN, G. D. Comparison with Published Systems of a New Staging System for Papillary and Follicular Thyroid Carcinoma. **Thyroid**, New York, v.23, n.5, p.566-574, may 2013.

WORDEN, B. et al. Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Differentially Regulates Expression of Proangiogenic Factors through Egr-1 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Res.**, Baltimore, v.65, n.16, p.7071-7080, aug. 2005.

WOYACH, J.A. et al. Lack of Therapeutic Effect of the Histone Deacetylase Inhibitor Vorinostat in Patients with Metastatic Radioiodine-Refractory Thyroid Carcinoma. **J. Clin. Endoc. Metab.**, Springfield, v.94, n.1, p.164-170, jan. 2009.

XING, M. et al. Early occurrence of RASSF1A hypermethylation and its mutual exclusion with BRAF mutation in thyroid tumorigenesis. **Cancer Res.**, Baltimore, v.64, n.5, p.1664-1668, mar. 2004.

\_\_\_\_\_. Association Between BRAF V600E Mutation and Mortality in Patients With Papillary Thyroid Cancer. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.309, n.14, p.1493-1501, Apr. 2013.

XING, M. BRAF Mutation in Papillary Thyroid Cancer: Pathogenic Role, Molecular Bases, and Clinical Implications. **Endoc. Rev.**, Baltimore, v.28, n.7, p.742-762, dec. 2007.

XING, M. Gene Methylation in Thyroid Tumorigenesis. **Endocrinology**, Baltimore, v.148, n.3, p.948-953, mar. 2007.

\_\_\_\_\_. Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer. **Mol. Cell. Endoc.**, Limerick, v.321, n.1, p.86-93, may 2010.

\_\_\_\_\_. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. **Nat. Rev. Cancer**, London, v.13, n.3, p.184-199, mar. 2013.

YAMASHITA, K. et al. HOP/OB1/NECC1 promoter DNA is frequently hypermethylated and involved in tumorigenic ability in esophageal squamous cell carcinoma. **Mol. Cancer Res.**, Philadelphia, v.6, n.1, p.31-41, jan. 2008.

YAMASHITA, K.; KATOH, H; WATANABE, M. The homeobox only protein homeobox (HOPX) and colorectal cancer. **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v.14, n.12, p.23231-23243, Nov. 2013.

YAMAGUCHI, S. et al. Homeobox gene HOPX is epigenetically silenced in human uterine endometrial cancer and suppresses estrogen-stimulated proliferation of cancer cells by inhibiting serum response factor. **Int. J. Cancer**, New York, v.124, n.11, p.2577-2588, june 2009.

YIN, Z. et al. Hop functions downstream of Nkx2.1 and GATA6 to mediate HDAC-dependent negative regulation of pulmonary gene expression. **Am. J. Physiol., Lung Cell. Mol. Physiol.**, Bethesda, v.291, n.2, p.L191-L199, aug. 2006.

YIN, D. et al. DKK3 is a potential tumor suppressor gene in papillary thyroid carcinoma. **Endoc. Relat. Cancer**, Woodlands, v.20, n.4, p.507-514, june 2013.

ZHANG, Z. et al. Histone deacetylation of NIS promoter underlies BRAF V600E-promoted NIS silencing in thyroid cancer. **Endoc. Relat. Cancer**, Woodlands, v.21, n.2, p.161-173, jan. 2014.

ZUO, H. et al. Lack of association between BRAF V600E mutation and mitogen-activated protein kinase activation in papillary thyroid carcinoma. **Pathol. Int.**, Tokyo., v.57, n.1, p.12-20, jan. 2007.

# ANEXOS

# ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DO *HOMEOBOX* GENE *HOPX* E ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DO CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIREOIDE

Coleta de Dados realizada:

Data:

Nome do pesquisador:

01. **RG:** .....|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|
02. **Idade:** (anos ao diagnóstico).....|\_|\_|
03. **Sexo:** (1) Masculino (2) Feminino.....|\_|
04. **Etnia:** (1) Negra (2) Parda (3) Branca (4) Outros (5) Não informado.....|\_|
05. **Sintomas:** (1) Nódulo no pescoço (2) rouquidão (3) disfagia (4) Achado de USG (5) hipertireoidismo (6) hipotireoidismo (7) Dor local (8) Não relatado (9) Outros..... |\_|
06. **Histórico familiar de Câncer de Tireoide:** (1) Sim (2) Não (999) Não informado..... |\_|\_|\_|
07. **Dosagem de TSH inicial (na época de diagnóstico do nódulo) (mUI/L):**..... |\_|\_|
08. **Data do diagnóstico clínico ou ultrassonográfico:** (00/00/0000).....\_\_/\_/\_\_\_\_
09. **Data da PAAF:** (00/00/0000).....\_\_/\_/\_\_\_\_
10. **Tamanho do maior nódulo ao USG (mm)**..... |\_|\_|
11. **PAAF:** (1) Carcinoma Papilífero (2) Indeterminado - Tumor folicular com atipias (3) Indeterminado - Tumor folicular sem atipias (4) Tireoidite linfocítica (5) Tumor de células de Hurthle ou oxifílicas (6) Carcinoma Folicular (7) Ca. Medular (8) Carcinoma pouco diferenciado, Indiferenciado ou Anaplásico (8) Linfoma (9) Bócio adenomatoso ou Hiperplasia nodular (10) Insatisfatório ou Material insuficiente ..... |\_|\_|
12. **PAAF - Classificação Bethesda (PAAFs a partir de 2009):** (1) Bethesda I (2) Bethesda II (3) Bethesda III (4) Bethesda IV (5) Bethesda V (6) Bethesda VI (7) Insatisfatório ou Material insuficiente (999) Não informado |\_|\_|\_|
13. **PAAF - Achados na citologia (somente para Ca papilífero):** (1) Arranjo microfolicular (2) Arranjo macrofolicular (999) Não informado |\_|\_|\_|
14. **PAAF - Achados na citologia (somente para Ca papilífero):** (1) Com fendas nucleares - groove (2) Sem fendas nucleares - groove (999) Não informado |\_|\_|\_|
15. **Data da cirurgia** (00/00/0000).....\_\_/\_/\_\_\_\_
16. **Tipo de Cirurgia:** (1) Tireoidectomia parcial (2) Tireoidectomia total (3) Tireoidectomia realizada em outra instituição.....|\_|
17. **Infiltração macroscópica de outras estruturas:** (1) Nervo recorrente direito (2) Nervo recorrente esquerdo (3) Esôfago (4) Traquéia (5) Laringe (6) Faringe (7) Carótida (8) Jugular (9) outras ..... |\_|\_|



18. **Esvaziamento cervical homolateral:** (1) esvaziamento recorrencial (Nível VI) (2) esvaz. radical clássico (3) esvaz. radical modificado (II a V) (4) não esvaziado (5) não especificado (999) ignorado.....|\_|\_|\_|
19. **Esvaziamento cervical contralateral:** (1) esvaziamento recorrencial (Nível VI) (2) esvaz. radical clássico (3) esvaz. radical modificado (II a V) (4) não esvaziado (5) não especificado (999) ignorado.....|\_|\_|\_|
20. **Numero do anátomo-patológico. Externo (999)**.....|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|
21. **Tipo histológico:** (1) Ca. Papilífero (2) Ca. Folicular (3) Ca. Células de Hurthle (4) Ca. Medular (5) Ca. Anaplásico (6) Outro..... |\_|
22. **Se Carcinoma papilífero, subclassificação:** (1) Clássico (2) Variante Folicular (3) Variante Oncocítica (4) Variante Células Claras (5) Variante Células altas (6) Variante Células Colunares (7) Variante Esclerosante Difusa (8) Variante Sólida (9) Variante Cribiforme (10) Com componente insular (11) Células escamosas ou mucoepidermóide (12) Misto: Papilífero e Medular (13) Outro..... |\_|\_|\_|
23. **Tamanho do maior nódulo AP (mm)**.....|\_|\_|\_|
24. **Tumor multicêntrico:** (1) Não (2) Unilateral (3) Bilateral .....|\_|\_|\_|
25. **Extensão extra-tireoidiana:** (1) Sim (2) Não (999) Ignorado.....|\_|\_|\_|
26. **Invasão perineural:** (1) positiva (2) negativa (999) Ignorada.....|\_|\_|\_|
27. **Estadiamento T:** (1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4 (999) Tx .....|\_|\_|\_|
28. **Estadiamento N:** (1) N0 (2) N1a (3) N1b (4) NX.....|\_|\_|\_|
29. **Data da PCI Pré-Dose (00/00/0000) (999 se não fez PCI)**.....\_\_/\_\_/\_\_\_\_
30. **Captação cervical 2 hs:** (1) Não mensurada (2) < 5% (3) 5 a 10% (4) > 10%.....|\_|
31. **Captação cervical 24 hs:** (1) Não mensurada (2) < 5% (3) 5 a 10% (4) > 10%.....|\_|
32. **Metástase à distância na PCI pré-dose:** (1) Não (2) Pulmão (3) Fígado (4) Ossos (5) Outros..... |\_|\_|
33. **Tireoglobulina pré iodoterapia:** (999 se não fez exame)..... |\_|\_|
34. **TSH pré iodoterapia:** (999 se não fez exame) ..... |\_|\_|
35. **Uso do TSH recombinante ou Thyrogen para tratamento com iodo (999 se não fez estímulo com TSH endógeno ou Thyrogen)** (1) Sim (2) Não |\_|\_|\_|\_|
36. **AAT (Anticorpo anti-tireoglobulina) pré iodoterapia:** (999 se não fez exame) ..... |\_|\_|
37. **Data da iodoterapia: (00/00/0000) (999 se não fez)**.....\_\_/\_\_/\_\_\_\_
38. **Dose de iodo:** (0) Não (1) 30 mCi (2) 100mCi / 3,7Gbq (3) 150mCi / 5,5Gbq (4) 200mCi / 7,4Gbq (5) 250mCi / 9,25 Gbq (6) 300mCi / 11,1Gbq (7) outros .....|\_|
39. **Complicações agudas da iodoterapia:** (1) Não (2) Náuseas e/ou vômitos (3) Xerostomia (4) Dor em região cervical (5) outras (6) Ignorada (7) N/A.....|\_|\_|\_|
40. **PCI pós iodoterapia:** (1) Captação adequada (2) Metástases à distância (3) Captação inadequada..... |\_|\_|

41. **Metástase à distância na PCI pós-dose:** (1) Não (2) Pulmão (3) Fígado (4) Ossos (5) Outros..... |\_\_|\_\_|
42. **Tireoglobulina pós iodoterapia (feita após 3 meses da dose de iodo):** .....|\_\_|\_\_|
43. **AATG pós iodoterapia (coletada junto a dosagem de tireoglobulina):** (999 se não fez exame) .....|\_\_|\_\_|
44. **Complicações cirúrgicas no intra-operatório:** (1) Não (2) Lesão do nervo recorrente (3) lesão da traquéia (4) Lesão do esôfago (5) Lesão vascular (6) outras..... |\_\_|\_\_|
45. **Complicações cirúrgicas pós-operatórias:** (1) não (2) Infecção FO (3) Hematoma com reoperação (4) Hematoma sem reoperação (5) Rouquidão (6) Seroma (7) Hipoparatiroidismo Transitório (8) Hipoparatiroidismo Definitivo (9) Fístula quilosa (10) Seroma ..... |\_\_|\_\_|
46. **Complicações sistêmicas:** (1) Não (2) pneumonia (3) AVC (4) TVP (5) TEP (6) IAM (7) sepsis (9) ignorado.....|\_\_|
47. **Dias de hospitalização pós-operatório de tireoidectomia:** .....|\_\_|\_\_|
48. **Laringoscopia pós-tireoidectomia:** (1) Não há relato (2) Mobilidade de PPVV preservada (3) Paresia de PVD (4) Paresia de PVE (5) Paralisia de PVD (6) Paralisia de PVE..... |\_\_|
49. **Recidiva em qualquer momento do seguimento:** (1) Não (2) local (3) pescoço homolateral (4) pescoço contralateral (5) Linfonodos do nível VI (6) osso (7) fígado (8) pulmão (9) Outros .....|\_\_|
50. **Data da recidiva (diagnosticado por ultrassonografia ou outro método de imagem, PAAF, citologia, etc): (00/00/0000)**.....\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
51. **Valor de tireoglobulina com supressão do TSH na recidiva (pacientes que tiveram recidiva confirmada):** |\_\_|\_\_|
52. **Valor de tireoglobulina com estímulo do TSH (endógeno ou TSH recombinante) na recidiva:** |\_\_|\_\_|
53. **Tratamento da recidiva:** (1) Não (2) Totalização de tireoidectomia (3) Esvaziamento cervical unilateral (4) Esvaziamento cervical bilateral (5) Esvaziamento recorrential (5) Iodoterapia (6) Radioterapia (7) Quimioterapia (8) outro|\_\_|
54. **Dose de Iodo utilizada na primeira recidiva (se fez Iodoterapia):** (0) Não (1) 100mCi / 3,7GBq (2) 150mCi / 5,5GBq (3) 200mCi / 7,4GBq (4) 250mCi / 9,25 GBq (5) 300mCi / 11,1GBq.....|\_\_|
55. **Data da última informação: (00/00/0000)**.....\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
56. **Evidência de ioresistência no tratamento das recidivas (No seguimento, dentro do período de 1 ano, alguma evidência de recidiva mesmo após uma dose de iodo feita para tratamento de metástase previamente detectada ou metástase identificada por outro método de imagem, mas que não aparece na PCI) :** (1) Sim (2) Não (999) Não informado |\_\_|\_\_|
57. **Evidência de desdiferenciação tumoral, PCI negativa e Tg positiva:** (1) Sim (2) Não (999) Não informado |\_\_|\_\_|
58. **Status na última informação:** (1) vivo sem doença (2) vivo com doença (3) morte por câncer (4) morte operatória (5) morte por outra causa (6) perdido de vista.....|\_\_|

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Nome do Projeto:** “Correlação entre a hipermetilação da região promotora do *homeobox* gene HOPX e aspectos clínico-patológicos do carcinoma papilífero de tireoide”

**Pesquisador Responsável:**

**Helton Estrela Ramos:** Coordenador do Projeto – Professor Adjunto do Departamento de Biorregulação do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

**Em caso de dúvida entrar em Contato:** e-mail: ramoshelton@hotmail.com

**Telefone:** (71) 3283-8868 Ramal: 227

### Propósito e Revisão Geral

O(A) senhor(a) é portador de uma neoplasia da glândula tireoide, e você está sendo convidado a participar, como voluntário, de um projeto de pesquisa intitulado: “Correlação entre a hipermetilação da região promotora do *homeobox* gene HOPX e aspectos clínico-patológicos do carcinoma papilífero de tireoide”. Este projeto irá estudar a base molecular desta doença, a neoplasia da tireoide. Estudo molecular significa procurar esclarecer (entender) a causa genética da neoplasia, ou seja, esclarecer se existe alguma alteração genética que causou a doença. Para isto, será estudado um componente específico, o DNA, que está presente nas células (menor parte do corpo humano, que forma os diversos órgãos, como exemplos de órgãos podem ser citados: o coração, a pele, o olho e o sangue) e que é responsável pelas características de um indivíduo (pessoa), que são transmitidas de pai para filho, desta forma possibilitando que os filhos se assemelhem (sejam parecidos) em algumas características aos pais.

O objetivo desta pesquisa é achar a causa genética (mutações, alterações, mudanças no DNA) da neoplasia da tireoide em pacientes que serão submetidos à cirurgia desta glândula. A intenção é reconhecer e avaliar clinicamente os pacientes com neoplasia de tireoide que tenham possível alteração genética que causou a doença.

A participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução Nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

A sua participação ficará limitada à coleta de material da glândula tireoide após a realização da cirurgia. Você, ao aceitar participar da pesquisa não precisará fazer nenhuma consulta médica ou coleta de exames.

Ao participar da pesquisa você está autorizando o armazenamento de material biológico e DNA coletados para a constituição de um Biobanco e Biorepositório segundo a Resolução CNS Nº 441/2011, onde entende-se por Biobanco: coleção organizada de material biológico humano e informações associadas, coletado e armazenado para fins de pesquisa, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade e gerenciamento institucional, sem fins comerciais. E Biorrepositório: coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais.

Desta forma, sua participação em estudos futuros fica sob seu critério, tendo a possibilidade de optar por: a) necessidade de novo consentimento a cada pesquisa, ou seja, em caso de novo estudo, onde seja necessário a utilização do seu material

biólogo o pesquisador responsável terá que lhe pedir nova autorização. Em caso de óbito (morte) ou incapacidade você deverá indicar uma ou mais pessoas que possam consentir na utilização ou descarte do seu material biológico, assim como ter acesso aos resultados obtidos e às devidas orientações; ou, b) manifestação de dispensa de novo consentimento a cada pesquisa. O material coletado será processado, analisado e estocado no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e/ou Laboratório de Tireoide do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Em caso de mudança de local você será informado formalmente por meio do Termo de Transferência de Material Biológico (TTMB).

Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os integrantes do estudo terão conhecimento dos dados que forem necessários para realização das atividades pertinentes ao desenvolvimento do presente trabalho. Você terá acesso a todas as informações sobre o projeto e seus dados genéticos assim como, direito de retirar o seu tecido biológico e/ou DNA, do local onde estes se encontram armazenados a qualquer momento.

Todas as despesas necessárias para a realização do estudo (exames, testes, etc...) **não** são da sua responsabilidade.

Os benefícios esperados ao entrar na pesquisa são: o diagnóstico preciso da causa da neoplasia de tireoide pode influenciar na melhoria do tratamento e adequar o manejo dos pacientes, além de fornecer melhor explicação para o entendimento da causa da doença e do andamento do tratamento. A avaliação genética também pode possibilitar um aconselhamento genético adequado para possíveis futuros filhos. Além disso, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a causa da neoplasia de tireoide na Bahia, de forma que o conhecimento obtido através desta pesquisa possibilite identificar mutações associadas com a neoplasia de tireoide na Bahia, com conseqüente estabelecimento de procedimentos que possibilitem a realização da investigação etiológica da doença por instituições de ensino e pesquisa do Estado.

Gostaríamos ainda de esclarecer que você não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar a participação no estudo, ou se aceitar participar, pode retirar o consentimento e material biológico a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção da continuidade do seu tratamento, que está assegurado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada (ou seja, seu nome não irá ser divulgado), para que a confidencialidade seja mantida. Os dados genéticos e resultados não ficarão acessíveis ou divulgados a terceiros (outras pessoas).

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu recebi uma cópia deste documento, e tenho o direito de negar ou desistir de participar deste estudo em qualquer momento sem qualquer prejuízo para os cuidados a mim dispensados. A PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA É VOLUNTÁRIA.

Eu \_\_\_\_\_, R.G. \_\_\_\_\_, reafirmando que tenho ciência do acima exposto, concordo em participar desse estudo, e estou ciente que tenho:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros, relacionados com a pesquisa a que serei submetido;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuação dos meus cuidados;
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com minha privacidade;
4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa e;
6. O conhecimento de que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

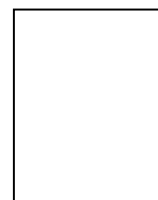
Referente ao Biobanco ou Biorrepositório, eu, \_\_\_\_\_ R.G. \_\_\_\_\_, opto por:

Necessidade de novo consentimento a cada nova pesquisa (estudo), e indico \_\_\_\_\_ para ser responsável pelas minhas informações em caso de invalidez ou morte;

Dispensar a necessidade de novo consentimento a cada nova pesquisa  
\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Participante ou Responsável Legal

\_\_\_\_\_  
Pesquisador Responsável



Polegar direito

**COORDENADOR RESPONSÁVEL:** Helton Estrela Ramos

**ENDEREÇO:** Instituto de Ciências da Saúde (ICS). Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela - CEP 40110-100 Salvador, Bahia, Brasil.

**E-MAIL:** [ramoshelton@gmail.com](mailto:ramoshelton@gmail.com)

**TELEFONE:** Coordenador responsável: (71) 3283-8959/ Universidade Federal da Bahia (UFBA)/Instituto de Ciências da Saúde - ICS (Departamento de Biorregulação).

### ANEXO 3 – Dados relativos à extração de RNA das amostras estudadas

| Amostra | Quantificação RNA (ng/μl) | 260/280 | A260    | A280    |
|---------|---------------------------|---------|---------|---------|
| H001 T  | 129,040 ng/μl             | 2,1140  | 3,2260  | 1,5260  |
| H001 NT | 190,980 ng/μl             | 2,2355  | 4,7750  | 2,1360  |
| H002 T  | 65,670 ng/μl              | 1,9783  | 1,6420  | 0,8300  |
| H002 NT | 150,760 ng/μl             | 1,9398  | 3,7690  | 1,9430  |
| H003 T  | 226,670 ng/μl             | 2,0858  | 5,6670  | 2,7170  |
| H003 NT | 160,610 ng/μl             | 1,8744  | 4,0150  | 2,1420  |
| H004 T  | 198,880 ng/μl             | 2,0503  | 4,9720  | 2,4250  |
| H004 NT | 176,050 ng/μl             | 2,0730  | 4,4010  | 2,1230  |
| H005 T  | 147,390 ng/μl             | 1,7068  | 3,6850  | 2,1590  |
| H005 NT | 124,820 ng/μl             | 1,9778  | 3,1210  | 1,5780  |
| H006 T  | 227,410 ng/μl             | 2,0103  | 5,6850  | 2,8280  |
| H006 NT | 138,460 ng/μl             | 1,9704  | 3,4620  | 1,7570  |
| H007 T  | 169,350 ng/μl             | 2,0434  | 4,2340  | 2,0720  |
| H007 NT | 148,630 ng/μl             | 2,0713  | 3,7160  | 1,7940  |
| H008 T  | 333,090 ng/μl             | 2,0709  | 8,3270  | 4,0210  |
| H008 NT | 636,570 ng/μl             | 2,2944  | 15,9140 | 6,9360  |
| H009 T  | 540,910 ng/μl             | 1,7859  | 13,5230 | 7,5720  |
| H009 NT | 284,330 ng/μl             | 1,9221  | 7,1080  | 3,6980  |
| H010 T  | 2375,800 ng/μl            | 1,6716  | 59,3950 | 35,5320 |
| H010 NT | 501,740 ng/μl             | 1,9062  | 12,5430 | 6,5800  |
| H011 T  | 381,080 ng/μl             | 1,8030  | 9,5270  | 5,2840  |
| H011 NT | 167,290 ng/μl             | 1,9325  | 4,1820  | 2,1640  |
| H012 T  | 438,550 ng/μl             | 1,7965  | 10,9640 | 6,1030  |
| H012 NT | 1282,110 ng/μl            | 1,8897  | 32,0530 | 16,9620 |
| H013 T  | 205,470 ng/μl             | 1,7918  | 5,1370  | 2,8670  |
| H013 NT | 398,180 ng/μl             | 1,6758  | 9,9540  | 5,9400  |
| H014 T  | 92,450 ng/μl              | 1,7208  | 2,3110  | 1,3430  |
| H014 NT | 334,200 ng/μl             | 1,5401  | 8,3550  | 5,4250  |
| H015 T  | 491,960 ng/μl             | 2,0359  | 12,2990 | 6,0410  |
| H015 NT | 277,610 ng/μl             | 1,8726  | 6,9400  | 3,7060  |
| H016 T  | 439,950 ng/μl             | 1,0000  | 10,9990 | 5,4300  |
| H016 NT | 221,850 ng/μl             | 1,9508  | 5,5460  | 2,8430  |
| H017 T  | 596,370 ng/μl             | 2,3560  | 14,9090 | 6,3280  |
| H017 NT | 132,020 ng/μl             | 1,7863  | 3,3010  | 1,8480  |
| H018 T  | 301,780 ng/μl             | 2,0428  | 7,5440  | 3,6930  |
| H018 NT | 326,610 ng/μl             | 2,1572  | 8,1650  | 3,7850  |
| H019 T  | 66,400 ng/μl              | 1,6259  | 1,6600  | 1,0210  |
| H019 NT | 108,130 ng/μl             | 1,9432  | 2,7030  | 1,3910  |
| H020 T  | 711,640 ng/μl             | 2,2733  | 17,7910 | 7,8260  |
| H020 NT | 91,930 ng/μl              | 1,7925  | 2,2980  | 1,2820  |
| H021 T  | 269,860 ng/μl             | 2,1247  | 6,7460  | 3,1750  |
| H021 NT | 68,820 ng/μl              | 1,9229  | 1,7210  | 0,8950  |
| H022 T  | 404,680 ng/μl             | 1,9157  | 10,1170 | 5,2810  |
| H022 NT | 229,420 ng/μl             | 2,1038  | 5,7350  | 2,7260  |
| H023 T  | 626,030 ng/μl             | 2,1656  | 15,6510 | 7,2270  |
| H023 NT | 129,310 ng/μl             | 2,1200  | 3,2330  | 1,5250  |
| H024 T  | 412,560 ng/μl             | 1,9512  | 10,3140 | 5,2860  |
| H024 NT | 835,480 ng/μl             | 1,8894  | 20,8870 | 11,0550 |
| H025 T  | 44,700 ng/μl              | 2,1752  | 1,1050  | 0,5080  |
| H025 NT | 147,870 ng/μl             | 2,0596  | 3,6970  | 1,7950  |
| H026 T  | 37,450 ng/μl              | 2,0846  | 0,9360  | 0,4490  |
| H026 NT | 35,650 ng/μl              | 2,1732  | 0,8910  | 0,4100  |
| H027 T  | 218,820 ng/μl             | 2,0114  | 5,4710  | 2,7200  |
| H027 NT | 39,910 ng/μl              | 1,8550  | 0,9980  | 0,5380  |
| H028 T  | 27,800 ng/μl              | 1,8989  | 0,6950  | 0,3660  |
| H028 NT | 30,410 ng/μl              | 1,9638  | 0,7600  | 0,3870  |
| H029 T  | 234,320 ng/μl             | 1,8946  | 5,8580  | 3,0920  |
| H029 NT | 136,750 ng/μl             | 1,8632  | 3,4190  | 1,8350  |
| H030 T  | 370,970 ng/μl             | 1,9491  | 9,2740  | 4,7580  |
| H030 NT | 216,200 ng/μl             | 2,0040  | 5,4650  | 2,7270  |
| H031 T  | 381,510 ng/μl             | 1,9137  | 9,5380  | 4,9840  |
| H031 NT | 230,180 ng/μl             | 1,9452  | 5,7540  | 2,9580  |
| H032 T  | 526,250 ng/μl             | 1,0000  | 13,1560 | 6,7280  |
| H032 NT | 242,320 ng/μl             | 1,6333  | 6,0580  | 3,7090  |
| H033 T  | 349,520 ng/μl             | 1,0000  | 8,7380  | 4,4690  |
| H033 NT | 101,140 ng/μl             | 1,8514  | 2,5290  | 1,3660  |


Fonte: elaborado pelo autor. Legenda: A260 - absorvância no comprimento de onda de 260 nm; A280 - absorvância no comprimento de onda de 280 nm; T – tumoral; NT – não-tumoral

**FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                |                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Projeto de Pesquisa:<br>Análise de aspectos epigenéticos em carcinoma de tireoide                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                | 2. Número de Sujeitos de Pesquisa:<br>50                                                                                                                                                                                                |                                                                                 |
| 3. Área Temática:<br>Área 1. Genética Humana.<br>(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                |                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                 |
| 4. Área do Conhecimento:<br>Grande Área 4. Ciências da Saúde                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                |                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                 |
| <b>PESQUISADOR RESPONSÁVEL</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                |                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                 |
| 5. Nome:<br>Helton Estrela Ramos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                |                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                 |
| 6. CPF:<br>647.773.165-72                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                | 7. Endereço (Rua, n.º):<br>PRINCESA LEOPOLDINA GRACA Edifício Belém, nº 66, Apt. 604 SALVADOR BAHIA 40150080                                                                                                                            |                                                                                 |
| 8. Nacionalidade:<br>BRASILEIRA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 9. Telefone:<br>(71) 9195-2979 | 10. Outro Telefone:                                                                                                                                                                                                                     | 11. Email:<br>ramoshelton@hotmail.com                                           |
| 12. Cargo:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                |                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                 |
| Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo. |                                |                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                 |
| Data: <u>08</u> / <u>08</u> / <u>2013</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                | Prof. Dr. Helton Estrela Ramos<br>Departamento de Biorregulação<br>Instituto de Ciências da Saúde<br>Universidade Federal da Bahia<br><br>Assinatura |                                                                                 |
| <b>INSTITUIÇÃO PROPONENTE</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                 |
| 13. Nome:<br>Universidade Federal da Bahia - UFBA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                | 14. CNPJ:                                                                                                                                                                                                                               | 15. Unidade/Órgão:<br>Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia |
| 16. Telefone:<br>(71) 3283-8966                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 17. Outro Telefone:            |                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                 |
| Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.                                                                                                                                                                                                                                                              |                                |                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                 |
| Responsável: <u>MARCEL LAUTENSCHLAGER ARRIAGA</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                | CPF: <u>003.028.768-55</u>                                                                                                                                                                                                              |                                                                                 |
| Cargo/Função: <u>DIRETOR</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                | Marcel Lautenschlager Arriaga<br>Diretor da Faculdade de Odontologia<br>Universidade Federal da Bahia<br><br>Assinatura                            |                                                                                 |
| Data: <u>09</u> / <u>08</u> / <u>2013</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                |                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                 |
| <b>PATROCINADOR PRINCIPAL</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                 |

|                                                       |               |                     |
|-------------------------------------------------------|---------------|---------------------|
| 8. Nome:<br>5608 Universidade Federal da Bahia - UFBA | 19. Telefone: | 20. Outro Telefone: |
|-------------------------------------------------------|---------------|---------------------|

Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.

|                                                                                                                                         |                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Nome: _____                                                                                                                             | CPF: <u>042.485.975-00</u>       |
| Cargo/Função:  <u>Dora Leal Rosa</u><br>Reitera - UFBA | Email: <u>gabinete@ufba.br</u>   |
| Data: <u>09</u> / <u>08</u> / <u>13</u>                                                                                                 | x <u>Dora Rosa</u><br>Assinatura |



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Análise de aspectos epigenéticos em carcinoma de tireoide

**Pesquisador:** Helton Estrela Ramos

**Área Temática:** Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

**Versão:** 1

**CAAE:** 20725513.6.0000.5024

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia

**Patrocinador Principal:** Universidade Federal da Bahia - UFBA

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 359.041

**Data da Relatoria:** 13/08/2013

**Apresentação do Projeto:**

O câncer de tireoide constitui entidade clínica com diagnóstico cada vez mais frequente nos últimos anos, em especial devido ao aumento da incidência do carcinoma diferenciado de tireoide. A despeito da maioria dos casos apresentar evolução clínica favorável, uma pequena parcela dos pacientes acometidos com esta patologia evolui com quadros agressivos, incluindo metástases locais e à distância, e eventualmente óbito.

Neste contexto, a pesquisa de marcadores moleculares que possam estabelecer melhores parâmetros de diagnóstico e adequada abordagem terapêutica tem recebido grande atenção científica. Por outro lado, o estudo de características epigenéticas do carcinoma de tireoide ainda é incipiente na literatura mundial e a análise de novos genes candidatos, tais como o HOPX, tem o potencial de fornecer novas pistas para melhor compreensão da tumorigênese tireoidiana e seu prognóstico clínico. Diferentemente de outras alterações genéticas, como as mutações, que são potencialmente irreversíveis, aberrações epigenéticas são potencialmente reversíveis permitindo que células malignas revertam para estados menos

**Endereço:** Av. Araújo Pinho nº 62 - Sala dos Departamentos

**Bairro:** Canela

**CEP:** 40.110-150

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3283-8969

**Fax:** (71)3283-8962

**E-mail:** rosana.regner@ufba.br

Continuação do Parecer: 359.041

desdiferenciados, tornando viável o tratamento epigenético do câncer. Os objetivos deste estudo são estabelecer a correlação entre a hipermetilação da região promotora do homeobox gene HOPX, aspectos clínico-patológicos, e a presença da mutação BRAFV600E em uma amostra de pacientes diagnosticados com carcinoma papilífero de tireoide. Serão selecionadas para análise as peças cirúrgicas de pacientes submetidos a tireoidectomia total ou parcial nas instituições participantes do projeto com diagnóstico confirmado de carcinoma papilífero da tireoide, cujo tumor tenha dimensão maior ou igual a 1,0 cm (um centímetro). Será procedida extração do DNA, amplificação por técnica de PCR e tratamento do DNA com material específico para análise de hipermetilação (bissulfito de sódio). Dados clínicos, anátomo-patológicos e de estadiamento tumoral serão obtidos através de revisão de prontuários. Para análise estatística, o teste de Qui-quadrado será utilizado para avaliar a associação entre o resultado da genotipagem e características clínicas e anatomopatológicas. Variáveis contínuas serão avaliadas pelo teste t de Student. Nível de significância definido em 5% (p 0,05). Este trabalho será executado de acordo com a norma 196/96 da Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP). O projeto será submetido à aprovação através da Plataforma Brasil.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Estabelecer a correlação entre aspectos clínico-patológicos, hipermetilação do promotor do gene HOPX e presença da mutação BRAFV600E em uma amostra de pacientes previamente diagnosticados com carcinoma diferenciado de tireoide.

Objetivo Secundário:

- Estabelecer correlações específicas entre a presença da hipermetilação da região promotora do gene HOPX com aspectos clínico-patológicos tais como idade, sexo, tamanho do tumor, ocorrência de metástases locorregionais e à distância, estadiamento tumoral, subtipo histológico, presença de tireoidite e positividade para a mutação BRAFV600E - Avaliar a hipermetilação do promotor do gene HOPX em amostras de carcinoma papilífero de tireoide e nos tecidos não-tumorais adjacentes

**Endereço:** Av. Araújo Pinho nº 62 - Sala dos Departamentos

**Bairro:** Canela

**CEP:** 40.110-150

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3283-8969

**Fax:** (71)3283-8962

**E-mail:** rosana.regner@ufba.br

Continuação do Parecer: 359.041

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Os riscos envolvidos nessa pesquisa envolvem a coleta, transporte e análise de material biológico pelos pesquisadores, que serão treinados com foco nos critérios da biossegurança e acompanhamento ético. Será garantida proteção da confidencialidade dos dados das amostras estudadas.

**Benefícios:**

Esta pesquisa busca avaliar novos marcadores diagnósticos e prognósticos para o câncer de tireoide, neoplasia de crescente incidência no Brasil e que ainda carece de caracterização molecular mais precisa. O resultado desta pesquisa tem relevância epidemiológica e visa contribuir com o crescente esforço para a redução da morbi-mortalidade por câncer no Brasil.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa apresenta significativa relevância para o estudo e conhecimento do câncer de tireoide.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os Termos obrigatórios estão presentes e de acordo com a legislação ética em vigor.

**Recomendações:**

- Substituir a citação da Resolução CNS196/96 pela Resolução CNS 466/12, no TCLE.
- Incluir, no documento de anuência da diretoria do Hospital São Rafael, o carimbo da diretoria médica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não se aplica

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

A plenária deste Colegiado acompanha o parecer do relator.

**Endereço:** Av. Araújo Pinho nº 62 - Sala dos Departamentos

**Bairro:** Canela

**CEP:** 40.110-150

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3283-8969

**Fax:** (71)3283-8962

**E-mail:** rosana.regner@ufba.br

FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA



Continuação do Parecer: 359.041

SALVADOR, 13 de Agosto de 2013

---

**Assinador por:**  
**Sandra de Cássia Santana Sardinha**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Araújo Pinho nº 62 - Sala dos Departamentos

**Bairro:** Canela

**CEP:** 40.110-150

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3283-8969

**Fax:** (71)3283-8962

**E-mail:** rosana.regner@ufba.br



Instituto de Ciências da Saúde  
Programa de Pós Graduação  
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas  
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100  
Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>