



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE



**MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE P300 E CITED-1 EM CARCINOMAS
PAPILÍFEROS DE TIREÓIDE**

THAIS APARECIDA GOMES ALMEIDA

GOIÂNIA

2018



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE



**MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE P300 E CITED-1 EM CARCINOMAS
PAPILÍFEROS DE TIREÓIDE**

THAIS APARECIDA GOMES ALMEIDA

Orientadora: Dr^a. Vera Aparecida Saddi

Coorientador: Dr. Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde da Pró-Reitoria de Pós- Graduação e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

GOIÂNIA

2018

A447a

Almeida, Thais Aparecida Gomes

Avaliação da expressão Gênica do P300 e CITED-1 em
carcinomas papilíferos de tireoide[]: recurso eletrônico/
Thais Aparecida Gomes Almeida.-- 2018.

73 f.; il. 30 cm

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (mestrado) - Pontifícia Universidade Católica
de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu
em Ciências Ambientais e Saúde , Goiânia, 2018

Inclui referências f.66-73

1. Tireoide - câncer. I.Saddi, Vera Aparecida. II.Pontifícia
Universidade Católica de Goiás. III. Título.

CDU: 616.441-006(043)

DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE
DEFENDIDA EM 12 DE MARÇO DE 2018 E CONSIDERADA

Aprovada PELA BANCA EXAMINADORA:

1) Vera Aparecida Saddi

Prof. Dra. Vera Aparecida Saddi / PUC Goiás (Presidente/Orientadora)

2) Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova Costa

Prof. Dr. Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa / ACCG (Coorientador)

3) Flávio Monteiro Ayres

Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres / UEG (Membro Externo)

4) Flávia Melo Rodrigues

Prof. Dra. Flávia Melo Rodrigues / PUC Goiás (Membro)

5)

Prof. Dra. Mariana Pires de Campos Telles / PUC Goiás (Suplente)

RESUMO

O câncer da glândula tireoide é a neoplasia maligna mais comum do sistema endócrino e representa a maioria dos óbitos relatados entre estes tumores. O carcinoma papilífero de tireoide (CPT) é o tipo histológico mais comum, sendo responsável por 85% de todos os cânceres de tireoide. Dois importantes genes, *CITED-1* e *P300*, envolvidos na regulação de diversos fatores transcricionais, foram evidenciados em diversos tumores, no entanto, até o momento, não foram encontrados na literatura estudos que elucidaram o papel de *P300* e *CITED-1* nos CPT. O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão do RNA-mensageiro (mRNA) de *P300* e *CITED-1* em CPT utilizando transcrição reversa e PCR quantitativa em tempo real. A expressão de *P300* foi semelhante em ambos os tecidos, normal (mediana = 0,052, IIQ = 0,094) e tumoral (mediana = 0,041, IIQ = 0,048) ($p = 0,481$). Em relação à expressão de *CITED-1*, a expressão foi maior nos tecidos tumorais (mediana = 0,780, IIQ = 0,881) em relação aos tecidos normais (mediana = 0,017, IIQ = 0,086) ($p < 0,0001$). Associação significativa foi observada entre a expressão de *CITED-1* e o tamanho dos tumores, contudo nenhuma associação foi evidenciada entre expressão de *P300* e as características histopatológicas dos tumores. *P300* é descrita como uma molécula associada à regulação de *CITED-1* e de vários outros genes. *CITED-1* é um co-fator específico da transcrição, o que pode explicar sua hiperexpressão nos tumores avaliados. A hiperexpressão de *CITED-1* nos CPT sugere que o gene é um candidato a compor o perfil de marcadores dos CPT, e o fato de *CITED-1* estar associado ao tamanho tumoral em tumores em estágios mais avançados, pode torná-lo um candidato importante como alvo terapêutico para esses tumores.

Palavras chave: Glândula tireoide, Câncer, qPCR, alvo terapêutico.

ABSTRACT

Thyroid cancer is the most common malignant neoplasm of the endocrine system and accounts for the majority of deaths reported among these tumors. Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common histological type, accounting for 85% of all thyroid cancers. The expression of two important genes, *CITED-1* and *P300*, involved in the regulation of several transcriptional factors, has been shown in several tumors; however, to date, no studies have been found in the literature that elucidated the role of *P300* and *CITED-1* in PTC. The present study aimed to evaluate the expression of the messenger RNA (mRNA) of *P300* and *CITED-1* in PTC using reverse transcription and real-time quantitative PCR. *P300* expression was similar in both tissues, normal (median = 0.052, IIQ = 0.094) and tumor (median = 0.041, IIQ = 0.048) ($p = 0.481$). In relation to the expression of *CITED-1*, expression was higher in tumor tissues (median = 0.780, IIQ = 0.881) compared to normal tissues (median = 0.017, IIQ = 0.086) ($p < 0.0001$). Significant association was observed between *CITED-1* expression and tumor size, however no association was evidenced between *P300* expression and histopathological characteristics of the tumors. *P300* is described as a molecule associated with the regulation of *CITED-1* and several other genes. *CITED-1* is a transcription-specific cofactor, which may explain its overexpression in the tumors evaluated. *CITED-1* hyperexpression in PTC suggests that this gene is a candidate for integrating the PTC biomarkers profile, and the fact that *CITED-1* is associated with tumor size in later stage tumors may turn it an important candidate as a therapeutic target for these tumors.

Keywords: Thyroid gland, cancer, qPCR, therapeutic target.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Anatomia da glândula tireoide.....	12
FIGURA 2. Tipos celulares da glândula tireoide.....	15
FIGURA 3. Micrografia apresentando aspectos citológicos que caracterizam o carcinoma papilar da tireoide.....	21
FIGURA 4. Representação esquemática dos rearranjos RET / PTC1.....	24
FIGURA 5. Via Intracelular da MAPK.....	25
FIGURA 6. Representação esquemática do gene <i>BRAF</i> com os seus 18 éxons e 17 íntrons.....	26
FIGURA 7. Representação esquemática do modelo estrutural da cromatina.....	30
FIGURA 8. Abertura da cromatina e interação de o <i>P300/CBP</i>	31
FIGURA 9. Exemplos de fatores de transcrição, ativadores e co-ativadores associados a diferentes domínios funcionais de <i>P300</i>	33
FIGURA 10. Eletroforese das amostras de RNA extraídas dos tumores (CPT) e tecidos normais.....	41
FIGURA 11. Expressão relativa do RNAm de <i>P300</i> em tecidos tumorais e normais adjacentes.....	47
FIGURA 12. Níveis de expressão do RNAm de <i>P300</i> nas amostras dos 31 pacientes com CPT.....	48
FIGURA 13. Expressão relativa do RNAm de <i>CITED-1</i> em tecidos tumorais e normais adjacentes.....	48
FIGURA 14. Níveis de expressão do mRNA de <i>CITED-1</i> nas amostras dos 31 pacientes com CPT.....	49
FIGURA 15. Correlação entre os níveis de expressão do mRNA de <i>P300</i> e <i>CITED-1</i>	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Características clinicopatológicas dos pacientes com carcinomas papilíferos de tireoide.....	46
TABELA 2. Análise comparativa da quantificação média do RNA extraído dos tecidos normais e tumorais.....	47
TABELA 3. Associação entre o nível de expressão gênica de <i>P300</i> e <i>CITED-1</i> e as características clinicopatológicas.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACCG - Associação de Combate ao Câncer em Goiás

AJCC – do inglês: *American Joint Committee on Cancer*

AP-1 – Fator de transcrição ativador da proteína 1

ATM – Quinase ataxia telangiectasia mutada

B56Y3 – Subunidade reguladora da proteína fosfatase 2A

B2M – Beta 2 Microglobulina

BRAF - Isoforma B da proteína Raf

BRAFV600E - Substituição do aminoácido valina por ácido glutâmico no códon 600 da proteína BRAF

BRCA1 – Gene que codifica uma proteína nuclear que desempenha um papel na manutenção da estabilidade genômica e supressão tumoral

CAT - Carcinoma anaplásico da tireóide

cAMP - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CBP - do inglês: *CREB-binding protein*

CCDC6 - do inglês: *coiled-coil domain containing*

CDT- Carcinoma diferenciado da tireóide

CFT - Carcinoma folicular da tireóide

CH1, CH2, CH3 – Domínios ricos em histidina-cisteína

CITED-1 - Transativador de interação Cbp / P300 com Glu / Asp rico no domínio carboxi-terminal 1

CMT - Carcinoma medular da tireóide

COX-2 - Ciclooxigenase -2

CPT - Carcinoma papilífero da tireóide

C-RAF - Isoforma C da proteína RAF

CREB - Fator de transcrição celular

CR1, CR2, CR3 – Domínios conservados de CITED-1

CT – do inglês: *threshold cycle*

CTPD - Carcinomas de tireoide pouco diferenciados

D1 - Ciclina D1

DIT -Di-iodotirosina

DP – Desvio padrão

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNMT – DNA metil-transferases

E1A - Região inicial 1A do Adenovírus

E2F- Proteína supressora de tumor

E4,E3 - Ubiquitinas ligases

E6 – Proteín viral E6 do HPV

EGR – do inglês: *early growth response factor*

ERBb2 - do inglês: *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*

ERG2 - do inglês: *early growth response factor 2*

ERK - Quinase regulada por sinal extracelular

FAP - Polipose Adenomatosa Familiar

FN - Fibronectina

Fos - Oncoproteína Fos

GDNFs - Fatores neurotróficos derivados da glia

GFR α - Receptor da família GDNF α

HAI – Hospital Araújo Jorge

HAT - Histona acetil transferase

HDACs – Histonas desacetilases

HIF-1 - Fator induzido pela hipoxia I

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

INCA - Instituto Nacional do Câncer

I131 - Isótopo radioativo do iodo

IIQ – Intervalo Interquartil

Jun - Oncoproteína Jun

KIX - Domínio proteico dos coativadores de transcrição eucarióticos CBP e P300

LMA - Leucemia Mieloide Aguda

MAPK – do inglês: *mitogen activated protein kinases*

MCP -Microcarcinoma papilar

MBDP - Proteína de domínio de ligação ao grupamento metil

MEK - MAPK/ERK quinase

MEK1 - Proteína MEK1

MEK2 - Proteína MEK2

MIT – Moniodotirosina

mRNA – RNA mensageiro

MSG1 – Gene específico do melanócito 1

Myb - Oncoproteína Myb

NTRK1- Receptor neurotrófico tirosina quinase 1

NF-Kb - fator nuclear kappa B

PP2A - Proteína fosfatase 2A

PAAF - Punção aspirativa por agulha fina

PAX8 - do inglês: *paired box gene 8*

pH – Potencial hidrogênioiônico

PPARY- do inglês: *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

P300 - Histona acetiltransferase P300

P53 – Proteína supressora de tumor p53

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PK – Proteína Kinase

PKA – Proteína Kinase A

PKB – Proteína Kinase B

PKC – Proteína Kinase C

RPM – Rotações por minuto

RNA - Ácido ribonucleico

RB - Proteína retinoblastoma

RET/PTC- Rearranjos do gene RET com genes heterólogos

RAS - Proteína RAS

RAF - Proteína RAF

RPM – Rotações por minuto

RNAm – RNA mensageiro

RE – Receptor de estrogênio

REALFA – Receptor de estrogênio alfa

REBETA – Receptor de estrogênio beta

RET - Gene do receptor para fator de crescimento neurotrófico derivado de célula

RTS - Síndrome de Rubinstein-Taybi

RUNX - Proteína supressora de tumor

SEER - do inglês: *Surveillance, Epidemiology and End Results Program*

SID – Limite C-terminal do domínio de interação SRC1

SMAD – do inglês: *specific E3 ubiquitin protein ligase*

SMAD4 – Membro da família Smad 4

SRC-1 - Coativador do receptor de esteróides 1

TEM: Transição epitélio-mesênquima

TGF – Fator de crescimento transformador

TGFB - Fator de crescimento transformador beta

T1799A - transversão de timina para adenina no nucleotídeo 1799 do gene BRAF

TRH -Hormônio liberador de tireotropina

TSH - Hormônio tireoestimulante

T3 - Hormônio tireoidiano triiodotironina

T4 - Hormônio tireoidiano tetraiodotironina

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ - Método de quantificação relativa mais utilizado pra o experimento de qPCR

26S – Complexo multi-proteína envolvido na degradação regulada de proteínas ubiquitinadas na célula

ΔCt – Diferença do CT do gene alvo e do CT do controle endógeno

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	12
1.1 Glândula Tireoide	12
1.2.1 - Subtipos histológicos dos carcinomas da tireoide.....	18
1.3 - Carcinomas Papilíferos da Tireoide.....	20
1.3.1 - Subtipos histológicos do CPT	21
1.4. Aspectos genéticos dos carcinomas de tireoide	23
2. OBJETIVOS	38
2.1 - Objetivo Geral:	38
Avaliar a expressão gênica de mRNA de <i>P300</i> e <i>CITED-1</i> em CPT utilizando PCR quantitativa em tempo real.	38
2.2 - Objetivos Específicos:	38
3. METODOLOGIA	39
3.1. Delineamento metodológico	39
3.4 Análise Molecular	39
3.4.1 Extração de RNA	39
3.4.3 PCR em Tempo Real	42
3.4.5 - Análises Estatísticas.....	44
4. RESULTADOS	45
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXO A: PARECER CONSUBSTANCIADO ÉTICO	67
ANEXO B: QUANTIFICAÇÃO DO CDNA APÓS A TRANSCRIÇÃO REVERSA	72
ANEXO C: CONCENTRAÇÃO DE RNA NAS AMOSTRAS NORMAIS E TUMORAIS	73

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Glândula Tireoide

A tireoide é uma das maiores glândulas endócrinas do corpo. Apresenta origem endodérmica e desenvolve precocemente na porção cefálica do tubo digestivo durante a embriogênese. Encontra-se imediatamente abaixo da laringe, ocupando as regiões lateral e anterior da traqueia. Pesa cerca de 20g e é constituída de dois lóbulos unidos por um istmo (Figura 1). A tireoide é formada por milhares de pequenas esferas que medem de 0,2 a 0,9 mm de diâmetro, chamados folículos tireoidianos os quais são as unidades funcionais da glândula tireoide (BERNE; LEVY, 2009; GUYTON; HALL, 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Os folículos tireoidianos consistem numa única camada de células epiteliais e variam conforme a região da glândula e a atividade funcional. O interior desses folículos é preenchido pela substância colóide, que é composta de 75% de uma glicoproteína de alto peso molecular, a tireoglobulina, que tem um importante papel na biossíntese dos hormônios tireoideanos (GOLDMAN; AUSIELLO, 2007 JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

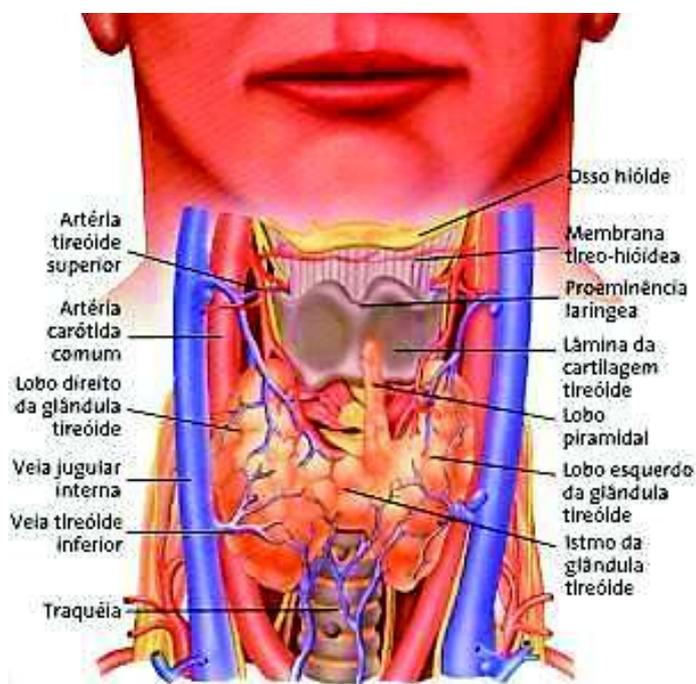


Figura 1. Anatomia da Glândula tireoide. Fonte: <http://www.jorgebastosgarcia.com.br/tireoide.jpg>

A tireoide é a única glândula endócrina que acumula o seu produto de secreção em grande quantidade. Calcula-se que, na espécie humana, haja quantidade suficiente de hormônio dentro dos folículos para suprir o organismo por cerca de três meses. Portanto,

quando a síntese dos hormônios é interrompida, os efeitos fisiológicos de sua deficiência só são observados vários meses depois (GUYTON; HALL, 2011). É um órgão muito vascularizado, apresentando um fluxo sanguíneo cinco vezes por minuto maior que o peso da própria glândula. As células endoteliais desses vasos capilares sanguíneos são fenestradas, característica essa, que é comum também em outras glândulas endócrinas. Esta configuração facilita o transporte de substâncias entre as células endócrinas e o sangue (GOLDMAN; AUSIELLO, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os hormônios tireoideanos apresentam muitas ações diretas, mas também agem por vias mais sutis para aperfeiçoar as ações de muitos outros hormônios e neurotransmissores (BERNE; LEVY, 2009). Os hormônios tireoideanos desempenham importante papel no desenvolvimento, na manutenção da homeostase, proliferação e diferenciação celular (DIETRICH et al., 2012). Agem nas mitocôndrias aumentando o número dessas organelas e de suas cristas e também a oxidação fosforilativa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Os hormônios da tireoide também participam da biossíntese de proteínas, através da ligação com receptores nucleares específicos e desempenham importante papel no desenvolvimento de vários tecidos, na regulação da temperatura corporal, na frequência cardíaca e também no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras (BARRA et al., 2004).

A secreção glandular dos hormônios tireoideanos é regulada pelo eixo neuroendócrino clássico, que compreende um sistema de *feedback* entre o hipotálamo, a glândula pituitária e a tireoide (DIRINICK et al., 2016). O hipotálamo detecta os baixos níveis circulantes dos hormônios tireoidianos e responde liberando o hormônio liberador de tireotropina (TRH). O TRH estimula a hipófise para produzir hormônio estimulador da tireoide (TSH). O TSH, por sua vez, estimula a tireoide a produzir hormônio tireoidiano até que os níveis no sangue voltem ao normal. Os hormônios da tireoide exercem o controle de *feedback* negativo sobre o hipotálamo, bem como na pituitária anterior, regulando assim a liberação de ambos TRH e TSH e completando o sistema de *feedback* (BERNE; LEVY, 2009; GUYTON; HALL, 2011). A tireoide, portanto, é controlada pelo TSH e também pelo iodo, os quais regulam sua função e proliferação (GOLDMAN; AUSIELLO, 2007).

A tireoglobulina, precursora dos hormônios tireoidianos, não é liberada na circulação em quantidades mensuráveis, pois é primeiro (iodada) e depois clivada, formando tiroxina e triiodotironina (GUYTON; HALL, 2011). A principal forma do hormônio tireoidiano secretada pela glândula tireoide é a tetraiodo-L-tironina (tiroxina ou T4) e uma menor quantidade é secretada como triiodotironina (T3), a forma ativa do hormônio (BARRA et al.,

2004). A liberação do hormônio ocorre quando as células foliculares, estimuladas pela tireotropina, captam coloide por meio de endocitose. O coloide é digerido por enzimas lisossômicas e as moléculas de tireoglobulina são quebradas por proteases. Os hormônios T3 e T4, di-iodotirosina (DIT) e monoiodotirosina (MIT), são então liberados no citoplasma (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Di-iodotirosina e monoiodotirosina não são secretadas. O iodo é removido enzimaticamente pela enzima deiodinase no citoplasma e os produtos de reação enzimática, iodo e tirosina disponibilizados, são reciclados para glândula e participam da formação de novas moléculas de hormônios (GUYTON; HALL, 2011). Tiroxina e triiodotironina cruzam livremente a membrana baso-lateral da célula e se difundem até os capilares sanguíneos. Cerca de 90% do hormônio circulante da tireoide é T4, no entanto, grande parte de T4 é deiodado, formando triiodotironina, que é o hormônio finalmente transportado e utilizado pelos tecidos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013)

A principal enzima relacionada à biossíntese hormonal é a tireoperoxidase (TPO). A TPO é a responsável pela oxidação do iodeto e sua incorporação aos radicais tirosila da molécula de tireoglobulina. O peróxido (H_2O_2) é essencial como oxidante na reação de oxidação do iodeto catalisada pela TPO e, quando os níveis intracelulares de iodeto são suficientes, a geração de H_2O_2 passa a ser o passo limitante na biossíntese dos hormônios tireóideos (VAISMAN; CARVALHO 2004).

Os hormônios tireoidianos circulam comumente ligados às proteínas plasmáticas e somente 0,03% de T4 e 0,3% de T3 estão livres. A ligação destes hormônios às proteínas plasmáticas aumenta suas meias-vidas e assegura uma distribuição regular do hormônio nos tecidos alvos (BARRA et al., 2004). A tireoide também produz a calcitonina, pelas células parafoliculares. A calcitonina inibe a reabsorção de tecido ósseo e, em consequência, diminui o nível de cálcio no plasma. A secreção de calcitonina é ativada por aumento da concentração de cálcio do plasma (FELSENFELD; LEVINE, 2015).

As células produtoras de hormônios da glândula tireoide são de dois tipos distintos, as células foliculares e as células parafoliculares ou células C (figura 2). As células foliculares compreendem a maior parte do epitélio, se apoiam sobre uma lâmina basal e são responsáveis pela absorção de iodo e síntese dos hormônios tireoidianos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Espalhados entre as células foliculares e nos espaços entre os folículos esféricos se encontram as células parafoliculares. Estas células segregam calcitonina e também são chamadas de células C (KONDO et al., 2006).

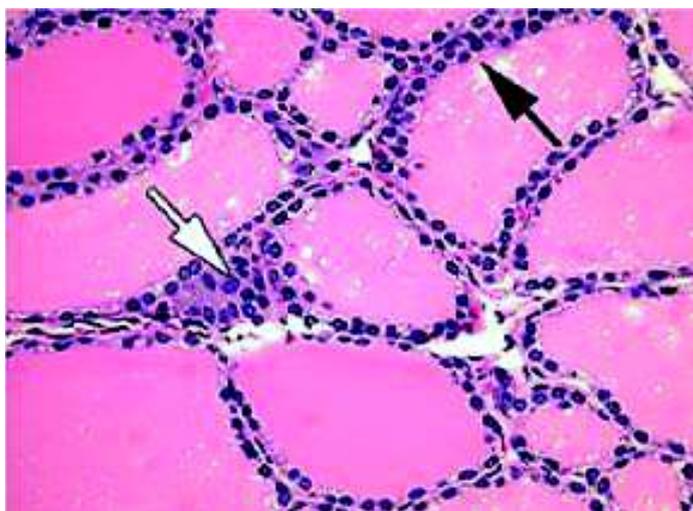


Figura 2. Tipos celulares da glândula tireoide: células foliculares (seta preta) e células parafoliculares (seta branca). Fonte: <https://informaticaaplicadananacymaribelquishpillo.wordpress.com/2015/11/12/fabrican-tiroides-en-laboratorio-a-partir-de-celulas-madres-embriionarias/>

A tireoide pode ser alvo de diversas doenças, sendo as mais comuns os nódulos, bócio, adenoma, tireoidite e câncer. Cerca de 5% de todos os indivíduos terão um nódulo palpável durante sua vida, e a incidência dessas lesões vem aumentando (CHAUDHARY; BANO, 2012; YI, 2016). Os nódulos são, em sua maioria, benignos, sendo uma pequena parcela relacionada ao câncer. Dada à alta prevalência de tumores benignos na população, a frequência de conversão dos nódulos benignos para malignos é baixa. Alguns fatores de risco que influenciam na presença dos nódulos são a faixa etária, histórico de exposição à radiação ionizante e deficiência de iodo (ZABEL, 2006).

1.2 Carcinomas da Tireoide

O câncer da glândula tireoide é a neoplasia maligna mais comum do sistema endócrino e representa a maioria dos óbitos relatados entre estes tumores (PATEL; SINGH, 2006; SIPOS; MAZZAFERRI, 2010). A maioria das lesões da tireoide é benigna e os tumores malignos primários são responsáveis por menos de 1% de todos os carcinomas humanos (AL-HUMADI et al., 2010; SUN et al., 2015; MAKAZLIEVA et al., 2016). A incidência desse tipo de neoplasia aumentou consideravelmente nas últimas décadas (AMIN; EDGE, 2017). Esse aumento é atribuído principalmente a uma maior acurácia dos métodos que diagnosticam esses tumores e à vigilância médica reforçada. A maior sensibilidade das técnicas de diagnóstico, em particular o advento da ultrassonografia e a punção aspirativa por agulha fina

(PAAF), aumentou a detecção dos pequenos cânceres, também conhecidos como microcarcinomas (YI, 2016; YU et al., 2010).

O número de casos de carcinoma de tireoide vem aumentando em todo o mundo. Dados do programa “*Surveillance, Epidemiology and End Results Program*” (SEER) dos Estados Unidos, mostram que em 2017 foram estimados cerca de 56.870 novos casos, correspondendo a 3,4% de todos os casos de câncer. O número de mortes estimado foi de 2.010. Esse número de mortes estimado se deve ao fato da taxa de sobrevivência global em cinco anos ser alta, próxima de 100% nos estágios iniciais da doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Em mulheres, o câncer de tireoide corresponde a 2,7% de todos os tumores malignos, representando o nono câncer mais comum no sexo feminino (SUN et al., 2015).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou, para o ano de 2018, 1.570 casos novos de câncer de tireoide para o sexo masculino e 8.040 para o sexo feminino, com um risco estimado de 1,49 casos a cada 100 mil homens e 7,57 casos a cada 100 mil mulheres, ocupando a 13ª posição entre os homens e a quinta posição entre as mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de tireoide em homens ocupa a 12ª posição na Região Nordeste (1,76/100 mil). Nas Regiões Sul (2,55/100 mil) e Centro-Oeste (1,76/100 mil), ocupa a 13ª posição; enquanto, nas Regiões Sudeste (1,24/100 mil) e Norte (0,53/100 mil), é o 14º mais frequente. Nas mulheres, é o quinto mais frequente nas Regiões Sudeste (9,75/100 mil) e Nordeste (7,55/100 mil). Na Região Centro-Oeste (5,97/100 mil), é o sexto mais frequente. Já na Região Norte (2,80/100 mil), ocupa a nona posição; enquanto, na Região Sul (4,91/100 mil), ocupa a 13ª posição. Em Goiás, são estimados 210 novos casos, sendo destes 20 homens e 190 mulheres (BRASIL, 2018).

Os carcinomas de tireoide são mais comuns em pessoas entre 25 e 65 anos, afetando principalmente indivíduos com idade superior a 40 anos e do sexo feminino (ZANELLA et al., 2010). Alterações hormonais relacionadas ao ciclo menstrual, gravidez, menopausa e fatores reprodutivos podem explicar os picos de incidência do câncer de tireoide nas mulheres (MANOLE et al., 2001). Como a síntese de hormônios da tireoide necessita da presença de iodo, algumas alterações como a deficiência crônica de iodo, bem como o excesso nutricional de iodo no organismo, levam à hiperplasia e à hipertrofia dos elementos foliculares (excesso de hormônio de estimulação da tireoide). Especialmente para as mulheres, essas alterações podem levar a um maior risco no desenvolvimento da doença (BRASIL, 2016).

A maioria dos fatores de risco associados ao câncer de tireoide inclui: sexo feminino, história familiar de bócio ou nódulos tireoidianos, história familiar de mutação no

gene RET, a presença de síndromes genéticas raras como polipose adenomatosa familiar (FAP) ou ainda, a exposição na infância ou na adolescência à radiação ionizante. Estudos apontam que quando essa exposição é iniciada na infância, principalmente antes dos cinco anos de idade, seu efeito carcinogênico parece ser maior, o que evidencia uma relação do efeito com a faixa etária (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015; LLOYD et al., 2011).

A radiação ionizante é um agente terapêutico usado para diminuir ou parar o crescimento tumoral, no entanto, a exposição de tecidos saudáveis pode resultar em câncer, uma vez que as radiações lesionam os tecidos humanos. A radiação no microambiente tecidual desencadeia a deposição de energia nas macromoléculas, rompendo estruturas atômicas do tecido onde atua e produz modificações químicas e biológicas. A radiação ionizante pode inibir ou ativar funções específicas do epitélio folicular, reduzindo o número de folículos funcionantes, pode alterar a vascularização ou a permeabilidade vascular e induzir reações imunológicas (GALVÃO et al., 2007).

A década de 1980 foi marcada por acidentes radiológicos importantes como o acidente ocorrido em Chernobyl, em 1986 e em Goiânia em 1987 (XAVIER et al., 2007). Os acidentes radiológicos estão associados ao aparecimento de carcinomas papilíferos de tireoide em crianças superexpostas à radiação. O tempo mais curto decorrido entre a exposição ao iodo radioativo I131 e o diagnóstico, foi de quatro anos e verificou-se uma taxa de cem vezes aumentada de incidência de carcinoma papilar, com o risco de desenvolver a doença permanecendo elevado por 40 anos ou mais (HUANG et al., 2001; IGLESIAS et al., 2017). A radiação ionizante transforma principalmente folículos tireoideanos em crescimento, explicando a maior incidência do câncer de tireoide em crianças e jovens expostos à radiação, em relação à população adulta (WARD, 2005). Outros exemplos onde foram observados aumentos nas taxas de incidência de carcinomas papilares incluem a exposição da população à radiação de partículas nucleares, como os episódios das bombas atômicas de Hiroshima e Nagasaki no Japão (1945) e nos acidentes nucleares realizados nas Ilhas Marshall (1954) e em Nevada nos Estados Unidos (1951-1962) (TRONKO et al, 2006).

Geralmente, os carcinomas de tireoide apresentam um bom prognóstico. As taxas globais de sobrevida em cinco e dez anos excedem 90%-95% (SIPOS; MAZZAFERRI, 2010; AMIN; EDGE, 2017). O Comitê Conjunto Americano de Câncer descreveu, em 2017, os principais fatores prognósticos para a determinação das taxas de sobrevida nos carcinomas de tireoide. Esses fatores incluem: a idade no momento do diagnóstico, sexo do paciente, extensão tireoideana, presença ou ausência de metástases linfonodais, localização e número de

linfonodos acometidos, tamanho do maior linfonodo metastático, tamanho dos focos metastáticos dentro dos linfonodos envolvidos, extensão extranodal, presença de invasão vascular, níveis séricos de tireoglobulina após a cirurgia, integridade da ressecção, subtipos histológicos e características histológicas específicas como invasão a perineural, presença de multifocalidade e alto índice mitótico (AMIN; EDGE 2017).

1.2.1 - Subtipos histológicos dos carcinomas da tireoide

As neoplasias da tireoide compreendem diferentes tipos histológicos, apresentando características clinicamente distintas e um comportamento biológico tumoral bastante variado (CAPP et al., 2009). A maioria dos cânceres primários da tireoide são tumores epiteliais que se originam de células foliculares da tiroide. Os três principais tipos dos carcinomas de tireoide incluem o carcinoma papilífero da tiroide (CPT), o carcinoma folicular da tiroide (CFT) e o carcinoma anaplásico da tiroide (CAT). Existe ainda outro tipo de carcinoma, o carcinoma medular da tiroide (CMT), que surge a partir de células parafoliculares da tiroide, também chamadas células C (KATOH et al., 2015). O carcinoma de origem papilar é o mais prevalente representando cerca de 60 a 80% dos casos dos cânceres de tiroide, diferindo do carcinoma folicular que perfaz 15 a 25% e do anaplásico com 2 a 5 % (KATOH et al., 2015; MAKAZLIEVA et al., 2016).

Os carcinomas papilíferos e foliculares são classificados como carcinomas bem diferenciados da tiroide e corresponde a grande maioria das malignidades da tiroide. A incidência do carcinoma diferenciado da tiroide (CDT) vem aumentando progressivamente em todo o mundo (ALBERO et al., 2016). Apesar da alta morbidade, a mortalidade pelo câncer de tiroide é estacionária. O prognóstico dos pacientes com CDT é tipicamente favorável com uma sobrevida de 85% relacionada com a doença em dez anos. Isso se deve tanto ao comportamento indolente intrínseco da doença, quanto à eficácia do tratamento inicial (ALBERO et al., 2016; MAROTTA et al., 2016).

O CDT, principalmente quando precocemente diagnosticado, é um tumor curável. O tratamento considerado mais adequado, a tireoidectomia total seguida de radioterapia com I-131, oferece ao paciente um bom prognóstico. Após a cirurgia e a radioiodoterapia, os pacientes são tratados com medicamentos, visando reduzir os níveis séricos de TSH para minimizar o crescimento de qualquer tumor residual (WARD; ASSUMPCÃO, 2004). Embora essa abordagem terapêutica proporcione uma excelente sobrevida, 5-20% dos pacientes apresentarão recidivas loco-regionais, e até 10% poderão exibir metástases à distância. As

recidivas podem resultar de um tratamento inicial incompleto ou da presença de um componente neoplásico mais agressivo (LOPES, 2011).

O carcinoma medular da tireoide (CMT) provém das células produtoras de calcitonina, as células parafoliculares. Representa aproximadamente 5-10% de todos os cânceres da tireoide e apresenta principalmente natureza esporádica. No entanto, cerca de 20-30% dos casos são hereditários (MOHAMMADI; HEDAYATI, 2017). Os CMT frequentemente dão metástase pela corrente sanguínea, além da propagação linfática, podendo chegar ao pulmão, fígado e osso (HASSAN et al., 2016). Os carcinomas medulares são tratados com ressecção cirúrgica e/ou radiação externa. A taxa de sobrevida em cinco anos é de aproximadamente 50% (HASSAN et al., 2016; MOHAMMADI; HEDAYATI, 2017).

Os carcinomas de tireoide pouco diferenciados (CTPD) são tumores malignos raros, que correspondem a 1-15% de todos os cânceres da tireoide. Apesar da baixa frequência, são a principal causa de morte dentre os cânceres derivados de células foliculares (XUE et al., 2017). Os CTPD apresentam características histológicas e biológicas intermediárias, entre os carcinomas bem diferenciados e indiferenciados (XUE et al., 2016). Muitas vezes, contém pequenos folículos e comumente apresentam necrose, hemorragia e invasão vascular (LISKA et al., 2005). São relacionados a um prognóstico melhor que os carcinomas anaplásicos da tireoide, contudo, possuem um pior prognóstico se comparados aos carcinomas bem diferenciados (XUE et al., 2017). Os pacientes do sexo feminino e idosos, geralmente, são mais afetados. A idade avançada, o tamanho do tumor, a extensão extratireoideana e a presença de metástase linfonodal são parâmetros correlacionados com pior prognóstico (KATOH et al., 2015).

O carcinoma anaplásico da tireoide (CAT) é uma das neoplasias malignas mais agressivas da cabeça e pescoço. Embora numericamente raro, compreendendo de 1% a 2% de todos os cânceres da tireoide, tem um prognóstico ruim, porque representa 40% de todas as mortes relacionadas ao câncer de tireoide (PEZZI et al., 2016). A taxa de sobrevida varia entre de três meses a 10 meses e a sobrevivência dos pacientes é aproximadamente 20%. Este prognóstico é resultado da rápida invasão das estruturas críticas do pescoço, presença de metástases à distância e a uma dificuldade de captar o iodo radioativo. Além disso, a maioria dos pacientes apresenta o estágio avançado da doença ao diagnóstico. Em muitos casos, os carcinomas anaplásicos surgem a partir de uma desdiferenciação de carcinomas papilíferos ou foliculares ou de doentes com história de bócio multinodular (PEZZI et al., 2016; WENDLER et al., 2016).

1.3 - Carcinomas Papilíferos da Tireoide

Os carcinomas papilíferos da tireoide correspondem à maioria dos tumores da glândula, representando grande parte das suas malignidades (90%). Apresentam o melhor prognóstico dentre as demais neoplasias, com a sobrevida global em cinco anos próxima a 97%, principalmente para indivíduos com menos de 45 anos (KATOH et al., 2015; CZARNIECKA et al., 2016). Os CPT são mais frequentes em mulheres, na proporção de quatro mulheres para um homem e afetam indivíduos na faixa etária de 25-50 anos. É também o tipo de câncer predominante em crianças com câncer de tireoide e em pacientes com câncer de tireoide que tiveram radiação prévia na cabeça e no pescoço (GIUSTI et al., 2010).

Os carcinomas papilíferos compõem a maioria dos carcinomas bem diferenciados da tireoide. Geralmente, os tumores crescem lentamente, são clinicamente indolentes e bem localizados, embora as formas mais agressivas e metastáticas também possam ocorrer (MIFTARI et al., 2016). Cerca de 30% dos pacientes apresentam recidivas (MAROTTA, 2016). Os pacientes com CPT apresentam uma incidência elevada de metástases linfonodais, o que representa um fator de risco independente da recorrência do tumor. O comprometimento linfonodal é mais frequente entre os pacientes jovens, apesar do prognóstico para esta faixa etária ser excelente (CZARNIECKA et al., 2015). Contudo, alguns estudos, relataram que as metástases linfonodais estão associadas com um aumento na proporção de recorrência loco regional da doença e não estão relacionados com a sobrevida (CZARNIECKA et al., 2015; MAROTTA, 2016).

Os carcinomas papilíferos são definidos como uma combinação de características morfológicas, podendo ser lesões únicas ou multifocais (AL-BRAHIM; ASA, 2006). Apresentam uma variedade de padrões grosseiros, com bordas irregulares ou contornos bem circunscritos, fendidos, apresentando dispersão periférica de agregados de cromatina. Alguns tumores podem apresentar infiltração do parênquima da tireoide circundante. As lesões podem conter áreas de fibrose e calcificação e muitas vezes podem ser císticas (AL-BRAHIM; ASA, 2006; LLOYD et al., 2011; KATOH et al., 2015; MIFTARI et al., 2016).

As principais características microscópicas dos carcinomas papilares incluem: núcleos aumentados e alongados, com aglomeração e sobreposição, contorno nuclear irregular, cromatina com marginação periférica, dando origem ao que foi descrito como núcleos dos “olhos da órfã Annie”, múltiplos micronúcleolos localizados imediatamente abaixo da membrana nuclear, sulcos nucleares resultantes da irregularidade do contorno nuclear e

pseudo-inclusões resultantes do acúmulo de citoplasma em sulcos nucleares proeminentes (Figura 3) (AL-BRAHIM; ASA, 2006).

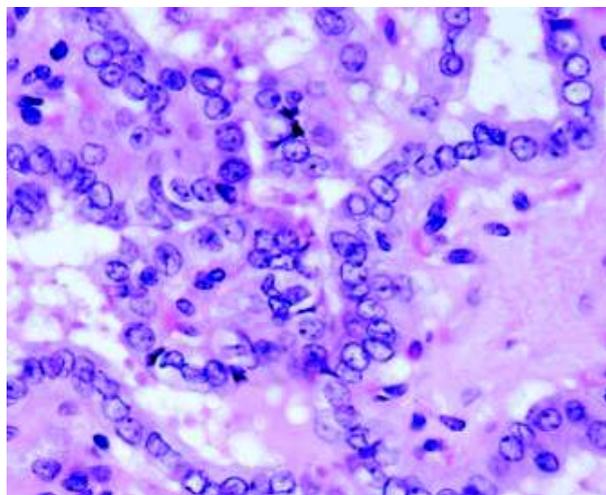


Figura 3. Micrografia apresentando aspectos citológicos que caracterizam o carcinoma papilar da tireoide (AL-BRAHIM; ASA, 2006).

1.3.1 - Subtipos histológicos do CPT

Existem numerosas variantes histopatológicas dos carcinomas papilíferos da tireoide. Cada variante mostra uma combinação de padrões de crescimento específicos, tipos de células e alterações do estroma (LLOYD et al., 2011).

Variante folicular: inclui tumores semelhantes à neoplasia folicular quando examinados grosseiramente. São compostos de folículos de tamanhos variáveis. O coloide é geralmente mais escuro ou hipereosinofílico em comparação com o coloide na tireoide não neoplásica adjacente. O diagnóstico de variante folicular de PTC pode ser bastante difícil e controverso, sendo difícil de distinguir do adenoma folicular e se assemelha muito às neoplasias foliculares, exceto pelas características citológicas. Assim, o uso de marcadores imuno-histoquímicos e moleculares se faz necessário na confirmação do diagnóstico em casos mais difíceis (LLOYD et al., 2011)

Variante clássica: é a forma clássica do CPT caracterizada por papilas complexas que se ramificam e possuem uma haste fibrovascular revestida por uma ou várias camadas de células epiteliais; também, podem ser identificadas estruturas de calcificação concêntrica no eixo das papilas, denominadas de corpos psamomatosos (AL-BRAHIM; ASA, 2006).

Variante de células altas: é uma variante composta de células cujo comprimento é pelo menos 2-3 vezes maior do que a altura. As células tumorais têm abundante citoplasma eosinófilo e características nucleares semelhantes ao CPT convencional (AL-BRAHIM; ASA,

2006; LLOYD et al., 2011). As pseudoinclusões nucleares podem ser mais proeminentes. Os tumores tendem a ser maiores do que os CPT convencionais, de modo que a necrose, a atividade mitótica e as extensões extratiroidianas são mais comuns. A maioria dos pacientes são mais velhos e apresentam tumores grandes e volumosos, geralmente com curso mais agressivo do que a variante clássica (LLOYD et al., 2011).

Variante de células colunares: é uma variante rara composta de células pseudo-estratificadas em colunas. Algumas células podem possuir vacúolos supra nucleares citoplasmáticos. É constituída igualmente por células altas, embora com citoplasma claro, fazendo lembrar o endométrio secretor. A sua agressividade biológica é semelhante à do carcinoma papilar de células altas (LLOYD et al., 2011).

Variante oncocítica (variante de células de Hürthle): é formada por células caracterizadas por um citoplasma eosinofílico e granular abundante, causado por acumulação mitocondrial. Geralmente, pode apresentar formação em papilas clássicas ou possuir folículos, seja com arquitetura microfolicular ou macrofolicular (AL-BRAHIM; ASA, 2006).

Variante células claras: constituída principalmente de células claras, têm uma arquitetura papilar e características citológicas dos CPT. Alguns desses tumores podem ter características de células claras e oncocitárias (LLOYD et al., 2011).

Variante Warthinlike: constitui um subconjunto de tumores oncocíticos com infiltração linfocítica marcante da papila (AL-BRAHIM; ASA, 2006).

Variante esclerosante difusa: é uma variante incomum e ocorre em indivíduos mais jovens, entre 15 e 30 anos, ocorrendo também em crianças e em pacientes irradiados. O tumor demonstra um padrão de crescimento papilar proeminente, misturado com áreas sólidas contendo ninhos de metaplasia escamosa (LLOYD et al., 2011). São caracterizados pelo envolvimento difuso da tireoide e ambos os lobos são tipicamente envolvidos. É acompanhada de fibrose extensa, difusa, em toda a glândula, geralmente associada a um infiltrado linfocítico proeminente podendo simular uma tireoidite de Hashimoto. Metástases linfonodais, com comprometimento ganglionar e pulmonar estão presentes em quase todos os casos (LLOYD et al., 2011; KATOH et al., 2015).

Variante sólida: inclui tumores com camadas de células tumorais, que têm características citológicas típicas de CPT. A invasão vascular e a extensão extratireoideana estão presentes em cerca de um terço dos casos. Eles são mais comuns em crianças com história de exposição à radiação (LLOYD et al., 2011).

Variante cribriforme-morular: é caracterizada por lóbulos de tumor separados por septos fibrosos, sendo associada com a Síndrome Poliposa Adenomatosa Familiar e a Síndrome de Gardner (LLOYD et al., 2011). Os lóbulos tumorais têm arquitetura cribriforme caracterizada por espaços rígidos nos lóbulos formados por arcos de células sem núcleos fibrovasculares. Células escamosas e fusos mórules também podem ser identificados (AL-BRAHIM; ASA, 2006; LLOYD et al., 2011).

Microcarcinomas papilares (MCP): são geralmente encontrados incidentalmente em citologia por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) e medem menos de 1,0 cm de diâmetro (LLOYD et al., 2011). Quando associados aos carcinomas papilares clinicamente evidentes podem estar relacionados com disseminação tumoral. Os pacientes podem ocasionalmente apresentar metástases linfonodais cervicais. Os tumores muitas vezes se encontram perto da cápsula da tireoide. Quando não estão encapsulados e apresentam esclerose extensa, podem ser mais agressivas do que tumores completamente encapsulados (AL-BRAHIM; ASA, 2006; LLOYD et al., 2011).

1.4. Aspectos genéticos dos carcinomas de tireoide

Os últimos anos têm sido cruciais na compreensão da base molecular da carcinogênese da tireoide. Carcinomas surgem normalmente a partir de um conjunto de mutações que conferem uma vantagem seletiva, levando a uma expansão clonal da célula geneticamente modificada. Portanto, o entendimento da tumorigênese depende da identificação de mutações que levam à expansão clonal (VOGELSTEIN et al., 2013).

Os carcinomas papilíferos consistem na maioria dos tumores da glândula tireoide, sendo sua base molecular bastante estudada. As alterações moleculares encontradas nos carcinomas papilares podem ocorrer em diferentes níveis, como resultado do envolvimento dos genes que codificam o receptor com domínio de tirosina quinase (*RET* e *NTRK1*), dos dois efetores intracelulares da via da MAPK (*RAS* e *BRAF*), ou das proteínas nucleares (*PAX8-PPAR γ*) (LOPES, 2011).

Mutações em um destes genes podem ser encontradas em mais de 70% dos carcinomas papilíferos e raramente se sobrepõem no mesmo tumor, sugerindo que a ativação desta via de sinalização é essencial para a iniciação do tumor e a alteração de um único efetor da via é suficiente para a transformação das células (TANG; LEE, 2010). As principais alterações genéticas descritas até agora em CPT são as translocações no gene *RET* com

prevalência estimada variável, de 20-40% nos carcinomas papilíferos em adultos e a mutação no gene *BRAF* que ocorre em cerca de 60% dos CPT (CIAMPI; NIKIFOROV, 2007).

O proto-oncogene *RET* é um gene de 21 éxons localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q11.2) que codifica um receptor de tirosina quinase. *RET* foi o primeiro receptor de tirosina quinase ativado a ser identificado no câncer da tireoide. É constituído por um domínio extracelular com um sítio de ligação ao ligante, um domínio transmembranar e um domínio intracelular (ARIGHI et al., 2005; LOPES, 2011;). *RET* é ativado por interação com um multi-complexo que inclui uma família de ligantes solúveis, fatores neurotróficos derivados de Glia (*GDNFs*) e uma família de co-receptores ligados à superfície celular, os receptores da família *GDNFα* (*GFRα*) (ARIGHI et al., 2005). Ligação do ligante ao *RET* resulta em auto fosforilação da proteína nos resíduos de tirosina. Isso ativa várias vias de sinalização incluindo a MAPK (MAPK / ERK), resultando em estimulação crônica da via de tumorigênese (CIAMPI; NIKIFOROV, 2007).

Na glândula tireoide, o *RET* é expresso em níveis elevados nas células C (parafoliculares), mas não nas células foliculares. Nestas células, pode ser ativado de forma aberrante por rearranjo cromossômico, resultando na fusão da porção 3' do gene *RET* com a porção 5' de vários genes heterólogos, sendo esta translocação conhecida por RET/PTC (LOPES, 2011). Uma inversão paracêntrica do cromossomo 10 origina um gene de fusão entre o domínio da tirosina quinase do gene *RET* e a região amino terminal do gene *CCDC6*. A proteína de fusão é então ativada constitutivamente através da formação de dímeros mediada pelo domínio da proteína *CCDC6* (SUZUKI et al., 2015) (Figura 4). As células foliculares da tireoide não expressam *RET*, no entanto, tais rearranjos estão presentes em cerca de 20 a 25% dos carcinomas papilíferos (CIAMPI ; NIKIFOROV, 2007).

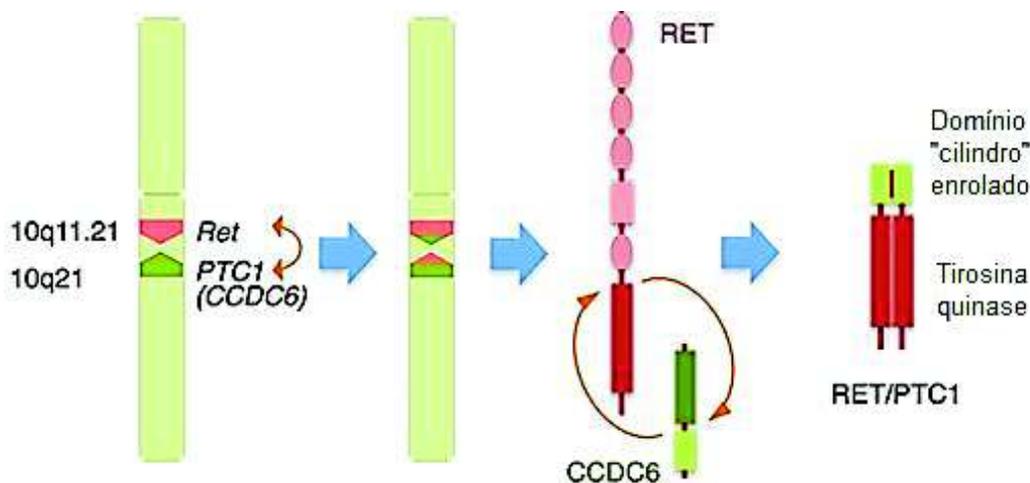


Figura 4: Representação esquemática dos rearranjos RET / PTC1 (SUZUKI et al., 2015).

A via mais estudada na tumorigênese da tireoide é a MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos) (figura 5). A MAPK é uma via de transdução de sinais intracelulares necessários para a manutenção de atividades como o crescimento celular, proliferação, diferenciação e apoptose, sendo responsiva ao receptor com domínio de tirosina quinase na superfície celular. Esta via transmite os sinais extracelulares de vários fatores de crescimento, hormônios e citocinas, ao núcleo celular através da ativação de cascatas de sinais (TANG; LEE, 2010).

A junção dos ligantes aos seus receptores de superfície conduzem à dimerização dos receptores e à auto fosforilação de resíduos de tirosina presentes no domínio citoplasmático do receptor, culminando com a sua ativação (TANG; LEE, 2010). Os receptores ativados, através de proteínas adaptadoras, ativam a proteína quinase RAS. Em seguida, a quinase RAS ativa a fosforilação de quinases de RAF. A RAF quinase do tipo B (BRAF), a mais abundante e potente na família RAF, fica livre para ativar as proteínas quinases de especificidade dupla: MAP quinase-quinases (MAPKK, também conhecidas como MAP / quinases reguladas por sinal extracelular, MEK) 1 e 2 (MCCUBREY et al., 2007; MOHAMMADI; HEDAYATI, 2017). MEK1 / 2 fosforilam e ativam quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) 1 e 2. Quando ativada, a ERK fosforila proteínas citoplasmáticas e é translocada para dentro do núcleo, onde regula a transcrição de genes envolvidos na diferenciação, proliferação e sobrevivência celulares (MCCUBREY et al., 2007; MOHAMMADI; HEDAYATI, 2017; TANG; LEE, 2010).

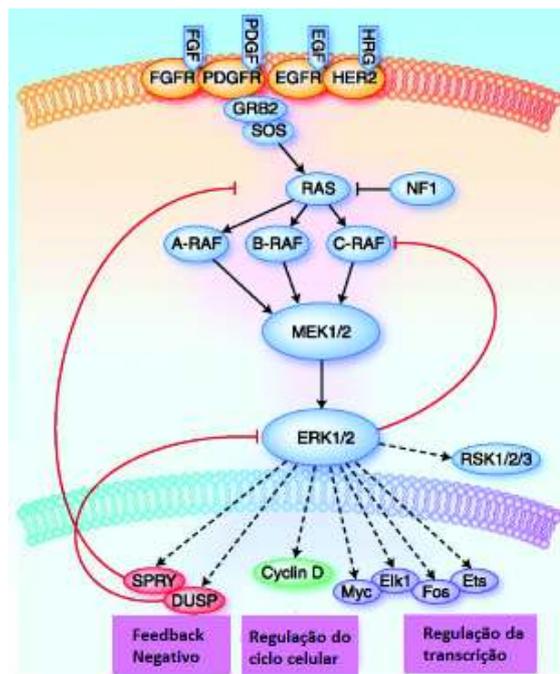


Figura 5: Via Intracelular da MAPK (Adaptado: CHAPMAN, 2010).

A proteína BRAF pertence à família das quinases de serina-treonina RAF, que apresentam três isoformas funcionais nas células de mamíferos: A-RAF, B-RAF e C-RAF. A isoforma B de RAF é a proteína BRAF. O gene que codifica essa proteína está localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q34), é composto por 17 íntrons e 18 éxons abrangendo uma região de 190.284 pb (figura 6) (LOPES, 2011). É o mais potente ativador da via da MAPK, resultando na proliferação celular, inibição da diferenciação e apoptose. Logo, mutações no gene *BRAF* levam à perda do controle sobre o ciclo celular, iniciando assim o desenvolvimento de neoplasias (TANG; LEE, 2010). *BRAF* expressa-se em níveis elevados em células neuronais, hematopoiéticas e no testículo, e é igualmente a isoforma predominante nas células foliculares da tireoide. As mutações ativadoras do *BRAF* já foram descritas em diversas neoplasias humanas, incluindo melanoma, carcinoma de ovário e ainda no carcinoma colorretal (CZARNIECKA et al., 2015).

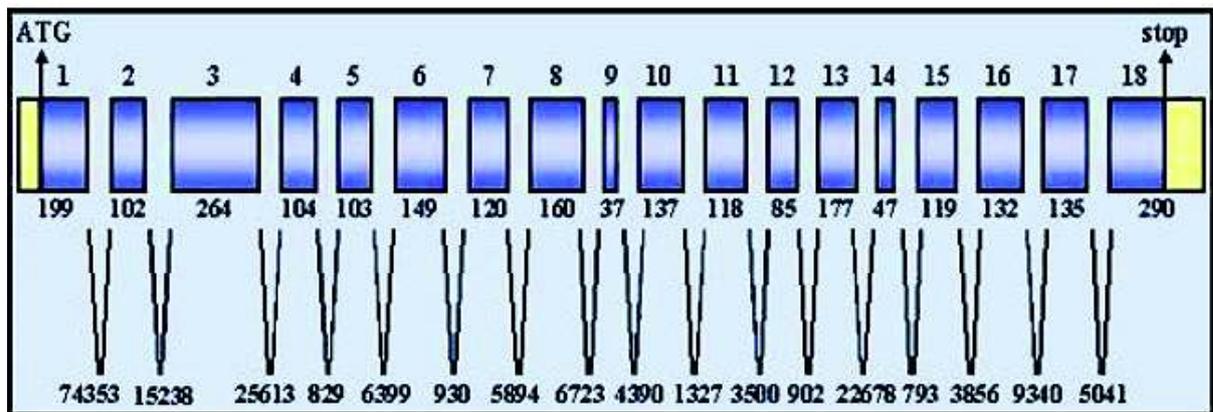


Figura 6. Diagrama do gene BRAF Fonte: Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (2004). <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/BRAFID828.html>

A mutação no gene *BRAF* é um dos eventos moleculares mais prevalentes na patogênese dos CPT em adultos. BRAFV600E é uma mutação pontual *missense* que ocorre frequentemente em CPT e corresponde a mais de 90% das mutações do gene *BRAF* (CZARNIECKA et al., 2015; KATOH et al., 2015). A mutação consiste na transversão timina-adenina na posição 1799 (T1799A) no éxon 15 do gene, localizado no cromossomo 7, que gera a substituição do aminoácido valina pelo glutamato no resíduo 600 da proteína (V600E). BRAFV600E causa uma ativação descontrolada e contínua de proteínas quinases, por meio da via da MAPK, que induzem uma excessiva proliferação e diferenciação das células tumorais (SCHULTEN et al., 2013).

A importância de BRAFV600E é revelada pelos diversos estudos publicados neste âmbito e que têm demonstrado, nos últimos anos, que a mutação se encontra presente num

grande número de casos de carcinoma papilar da tireoide (LOPES, 2011). A mutação de *BRAF* apresenta alta prevalência nos tipos subtipos histológicos: forma clássica e variante de células altas (60%), já foi descrita nos microcarcinomas papilares (20-50%), e apresenta baixa expressividade na variante folicular (SCHULTEN et al., 2013). Carcinomas papilíferos com mutação em *BRAF* tendem a apresentar estágio avançado com extensão extra tireoideana, apresentam recidiva loco-regional e são menos responsivos ao iodo radioativo. Esses fatores reforçam a exclusividade da mutação BRAFV600E, demonstrando que a mutação pode apresentar um poder prognóstico em CPT (SCHULTEN et al., 2013; TANG; LEE, 2010).

A expressão gênica de BRAFV600E também está relacionada com outros marcadores característicos dos carcinomas papilíferos de tireoide. Watanabe et al., (2009) encontraram correlação positiva entre a expressão de BRAFV600E, fibronectina (FN), vimentina e CITED-1.

A família CITED (do inglês: *CBP/P300-interacting transactivators with glutamic acid [E]/aspartic acid [D]-rich C-terminal domain*) constitui-se de uma família de proteínas, descritas na década de 1990, que consistem em quatro proteínas nucleares (CITED-1 a 4) (YAHATA et al., 2001; PLISOV et al., 2005; SHI et al., 2006), que estão envolvidas não apenas na modulação de uma variedade de processos celulares e de desenvolvimento, mas também em respostas a diversos estímulos biológicos e ambientais. As proteínas CITED são fortes ativadores da transcrição em células de mamíferos, mas não se ligam diretamente ao DNA, interagindo com outras proteínas reguladoras de ligação ao DNA e funcionando como co-ativadores transcricionais (YAHATA et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2004; PLISOV et al., 2005).

As proteínas CITED, possuem aproximadamente 200 resíduos de aminoácidos (SHIODA et al., 1997; PLISOV et al., 2005) e compartilham três regiões conservadas de homologia (CR1, CR2 e CR3), fora das quais são divergentes. Dado que não possuem identidade de sequência para domínios de proteínas conhecidos, eles representaram, portanto, uma nova família de proteínas descritas (YAHATA et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2004). Quando ligados a domínios heterólogos de ligação ao DNA, as proteínas CITED ativam a transcrição, (SHIODA et al., 1998; YAHATA et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2004), uma função dependente do domínio CR2 que liga os co-ativadores transcricionais CBP / P300 (SHIODA et al., 1998; RODRIGUEZ et al., 2004; PLISOV et al., 2005).

Todas as proteínas CITED se ligam diretamente aos integradores de transcrição *CBP* e *P300*, através de motivos de sequência "LPXL" conservados em seus domínios CR2 e essa

interação é crucial para suas atividades de transativação, em especial para o gene *CITED-1* que é relacionado a respostas transcricionais específicas através de interações com outros fatores de transcrição e também modifica essas respostas através da interação com os co-ativadores *CBP* e *P300* (PLISOV et al., 2005).

O gene *CITED-1*, também conhecido como gene específico do melanócito1 (*MSG1*), está localizado no Xq13.1, contém 3 exóons e 2 íntrons dentro de 5 kb e codifica uma proteína de 27kd da família das proteínas CITED (SHIODA et al.,1998;YAHATA et al., 2000; PRASAD et al., 2004). *CITED-1* foi originalmente identificado em uma linhagem celular de melanoma murino e implicado no processo de melanogênese (SHIODA et al., 1996; NAIR et al., 2001;PRASAD et al., 2004; HOWLIN et al., 2005; DILLON et al., 2007), no entanto, foi descoberto que o transcrito de *CITED-1* é expresso também em vários tecidos não melanocíticos (YAHATA et al., 2000), incluindo uma variedade de tecidos embrionários, como coração, membros em desenvolvimento, primórdia hepática, rim em desenvolvimento, células epiteliais mamárias e células germinativas testiculares (SHI et al., 2006). No adulto, *CITED-1* é expresso em níveis elevados no carcinoma papilar da glândula tireoide, melanoma maligno e tumor de Wilms, coração e glândulas mamárias (RODRIGUEZ et al., 2004; SHI et al., 2006) sugerindo que possa desempenhar um papel na patogênese de certos tumores (SHI et al., 2006).

Vários transativadores que não se ligam diretamente ao DNA, interagem com proteínas de ligação ao DNA específicas da sequência e subunidades transativadoras da função de fatores de transcrição (YAHATA et al., 2000). *CITED-1* interage especificamente com os fatores de transcrição ligantes ao DNA (SMAD) de uma maneira dependente da sinalização do fator de crescimento transformante β (*TGF- β*), aumentando a transcrição mediada por SMAD. Os SMADS fosforilados nos receptores, formam hetero-oligomeros com SMAD4, um SMAD "comum" envolvido em todos os complexos SMAD ativos, e translocam-se para o núcleo, onde se ligam aos promotores de genes e ativam a transcrição (YAHATA et al., 2000).

CITED-1 regula positivamente a sinalização de *TGF- β* através da sua associação com o complexo co-ativador transcricional mediado por SMAD e o complexo co-ativador transcricional *P300 / CBP*. *CITED-1* potencializa a transcrição mediada por SMAD através do reforço da ligação funcional entre os fatores de transcrição SMAD e o complexo co-ativador da transcrição *P300 / CBP*. Tanto os SMADS fosforilados por receptores, como SMAD4 se

ligam diretamente a *P300/CBP*, e a transcrição mediada por SMAD depende da função coativadora de *P300/CBP* (YAHATA et al., 2000).

CITED-1, além de atuar sobre os eventos transcricionais nas vias de sinalização de *TGF*, por meio da interação com ligantes mediadores dos complexos de transcrição, atua também aumentando a transcrição mediada por diversos fatores além de SMAD, tais como os receptores de estrogênio (*RE*) *RE α* e *RE β* (YAHATA et al., 2001; GERSTNER; LANDRY, 2007). Os receptores de estrogênio e o *TGF- β* atuam como mediadores recíprocos que funcionam em conjunto, para atingir a estrutura epitelial ramificada final da glândula mamária. Foi proposto que o estrogênio e o *TGF- β* atuem em um circuito regulatório onde o estrogênio modula a ativação do *TGF- β* , que por sua vez regula a resposta proliferativa ao estrogênio (EWAN et al., 2005). Após a identificação de *CITED-1* entre um grupo de genes cuja expressão foi especificamente regulada positivamente na glândula mamária de rato, levantou-se a hipótese que *CITED-1* atua na mediação de sinais de estrogênio e *TGF- β* (HOWLIN et al., 2005). *CITED-1* parece funcionar como um co-regulador de transcrição do receptor de estrogênio e do SMAD4, de uma maneira dependente da ligação do ligante do receptor de estrogênio ou da dimerização de SMAD induzida por *TGF- β* e sua interação com o co-ativador de transcrição *CBP/P300* (HOWLIN et al., 2005). No entanto, esses mecanismos precisam ser melhor descritos e elucidados.

CITED-1, já descrito como um potente coativador de *RE α* em células de câncer de mama MCF-7 (YAHATA et al., 2000), parece aumentar a transcrição mediada pela proteína de resposta ao crescimento precoce 2 (*ERG2*) (DILLON et al., 2007). *EGR2* é um fator de transcrição pertencente à família de resposta inicial do crescimento (*EGR*). *CITED-1* potencializa a atividade transcricional mediada por *EGR2* a partir do promotor *ErbB2*. *ErbB2* pertence à família do receptor de fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) com domínio de tirosina quinase (DILLON et al., 2007). A hiperexpressão de *ErbB2* tem sido implicada em 20 a 30% dos cânceres primários de mama e correlaciona-se com um mau prognóstico (DILLON et al., 2007), portanto compreender essa ligação genética entre *CITED-1* e *ErbB2* pode fornecer dados importantes para o câncer de mama.

A modulação de eventos transcricionais controlados por *CITED-1* tem implicações importantes para o desenvolvimento de diversos processos celulares. *CITED-1* foi identificado pela primeira vez em melanoma, e parece também ser um importante regulador no desenvolvimento dos néfrons (PLISOV et al., 2005; LOVVORN et al., 2007). Além disso, a influência do estrogênio e *TGF- β* no desenvolvimento das glândulas mamárias é reduzida

em animais *CITED-1* mutantes (HOWLIN et al., 2005). A ausência de *CITED-1* também retarda a diferenciação dos trofoblastos no desenvolvimento placentário (RODRIGUEZ et al., 2004).

CITED-1 foi encontrada hipereexpressa em 87% dos casos de CPT e em nenhum tecido tireoidiano normal (PRASAD et al., 2005). Outro estudo demonstrou que essa proteína foi seis vezes mais expressa em CPT em relação a tumores benignos e tecidos tireoidianos normais (ARORA et al., 2009). *CITED-1* apresentou um papel promissor na distinção de CPT a partir de lesões benignas na tireoide (PRASAD et al., 2005; SCOGNAMIGLIO et al., 2006). Entretanto, não foram encontrados estudos que investigassem a expressão do RNA-mensageiro de *CITED-1* e os aspectos clínico patológicos em CPT ou que avaliassem a associação entre a expressão de *CITED-1* e P300 em CPT.

A ativação de genes eucarióticos está associada à acetilação de histonas e à remodelação da estrutura da cromatina (WANG et al., 2013). A alteração da estrutura da cromatina é crítica para a regulação da expressão gênica. A cromatina é constituída por nucleossomas, que são partículas constituídas por DNA associado a octâmeros de duas moléculas de cada uma das proteínas histônicas do núcleo (H2A, H2B, H4 e H4), em torno das quais 146 pares de bases de DNA estão enrolados (Figura 7) (BARNES et al., 2005; REZEK, 2017). No núcleo das células, o DNA é enrolado firmemente em torno das histonas do núcleo, impedindo a ligação da enzima RNA polimerase II, que ativa a formação de RNA mensageiro. Esta conformação da estrutura da cromatina é descrita como fechada e está associada à supressão da expressão gênica (BARNES et al., 2005).

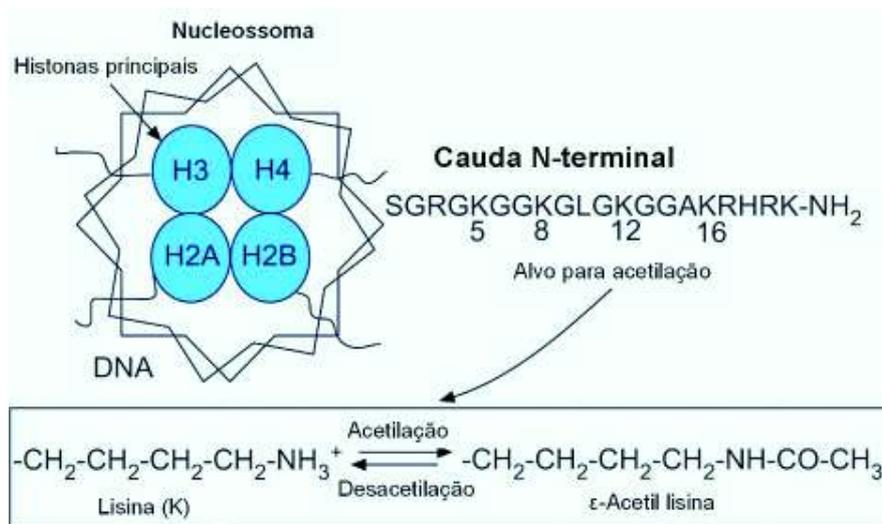


Figura 7. Representação esquemática do modelo estrutural da cromatina (Adaptado de BARNES et al., 2005).

A transcrição gênica ocorre quando a estrutura da cromatina é aberta, com o desenrolamento do DNA, de modo que a RNA polimerase II e complexos de transcrição basal possam se ligar ao DNA para iniciar a transcrição. Quando fatores de transcrição pró-inflamatórios, como NF- κ B, são ativados, estes se ligam às sequências de reconhecimento específicas no DNA e, subsequentemente, interagem com moléculas de coativadoras grandes, como a proteína *CREB-binding* (CBP), P300 e P300/CBP-associado (Figura 8). Essas moléculas coativadoras atuam como os interruptores moleculares que controlam a transcrição gênica e todos possuem atividade intrínseca de histona acetil transferase (HAT) (BARNES et al., 2005; WANG et al., 2013).

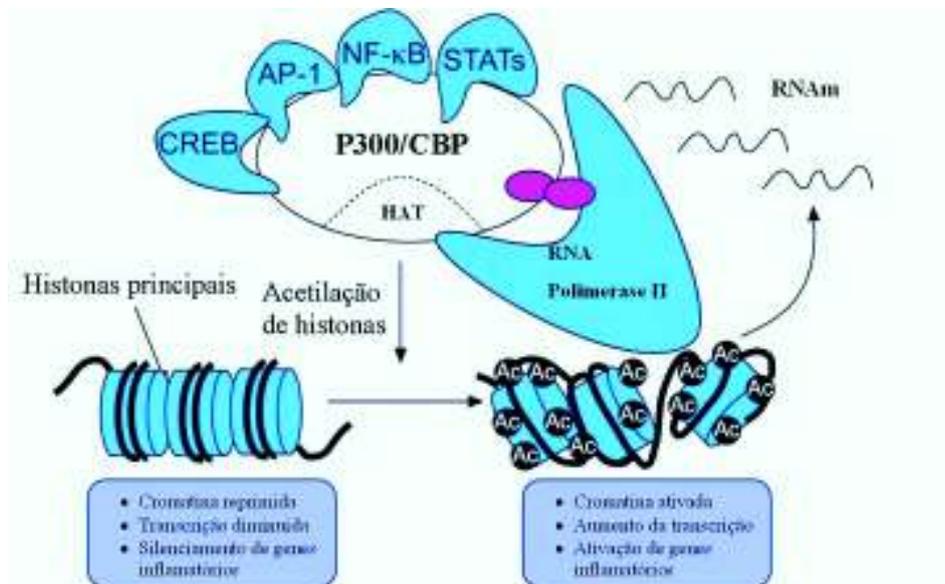


Figura 8. Abertura da cromatina e interação de o P300/CBP, com a proteína de ligação ao elemento de resposta AMP cíclica (CREB), fator nuclear (NF) - κ B, proteína ativadora (AP) -1 e fatores de transcrição ativados por transdução de sinal (STATs) (Adaptado de BARNES et al., 2005).

Cada histona central tem um terminal longo, rico em resíduos de lisina que pode ser acetilado, através da transferência de um grupo acetil do co-fator acetil-coenzima A (acetil-CoA), para a amina de uma cadeia lateral do substrato lisina na histona, alterando assim a carga elétrica da histona do núcleo (BARNES et al., 2005). A acetilação de histonas do núcleo reduz a carga elétrica, o que permite que a estrutura da cromatina seja alterada, passando da conformação fechada em repouso para uma conformação aberta ativada (BARNES et al., 2005). O relaxamento da cromatina permite ainda que vários fatores de reparo tenham acesso aos locais de lesões do DNA, os quais não são normalmente inacessíveis (BARNES et al., 2005; WANG et al., 2013).

A metilação do DNA também regula a expressão do gene. A metilação consiste em uma modificação covalente do DNA na qual, um grupamento metil do carbono 5 de uma citosina que, geralmente precede a uma guanina (dinucleotídeo CpG), pela ação da enzima DNA metiltransferase (DNMT) (OLIVEIRA et al., 2010). Quando os resíduos de CpG são metilados pelo DNMT, a proteína de domínio de ligação ao metil (MBDP) e as desacetilases de histona (HDACs) são recrutadas, inibindo a transcrição e silenciando o gene (HEERBOTH et al., 2014).

Outra forma de modificação química que altera a expressão nas histonas, é a metilação das histonas. A metilação das histonas está envolvida em vários processos biológicos, incluindo o reparo do DNA, ciclo celular, respostas ao estresse, desenvolvimento, diferenciação e envelhecimento (HEERBOTH et al., 2014). A metilação da histona está associada à estimulação das vias neurais, a condições de envelhecimento, doenças neurodegenerativas e deficiência intelectual. Esta modificação altera as propriedades do nucleossoma e afeta suas interações com outras proteínas, particularmente em relação aos processos de transcrição gênica (KRAMER, 2013).

P300 ou *EP300*, é membro da família de histona acetiltransferases de co-ativação transcricional. O *P300* e o seu parálogo *CBP* foram descritos pela primeira vez como parceiros de ligação da proteína de região 1A (E1A) do adenovírus e das proteínas de ligação do potenciador regulado pelo cAMP (CREB), respectivamente (WANG et al., 2013; MAKSIMOSKA et al., 2014; HOLMQVIST; MANNERVIK, 2013). O gene que codifica a proteína P300 está localizado no cromossomo 22 q13.2 (WANG et al., 2013) e codifica uma proteína grande, de aproximadamente 270 kDa (MAKSIMOSKA et al., 2014).

P300 e seu parálogo, *CBP*, desempenham a regulação de uma ampla variedade de atividades celulares, como proliferação, regulação do ciclo celular, apoptose, diferenciação, resposta a danos ao DNA, processo de transcrição e principalmente a acetilação de histonas através da atividade histona acetiltransferase (LIAO et al., 2012; WANG et al., 2013). *CBP* e *P300* desempenham papéis distintos, no entanto, suas funções são em grande parte muito semelhantes. Devido a sua similaridade estrutural e redundância funcional, *CBP* e *P300* são muitas vezes referidas coletivamente como *CBP / P300* (WANG et al., 2013).

O complexo *CBP/P300* funciona principalmente como cofator de transcrição para um número de proteínas nucleares envolvidas em vias tumorigênicas. Estas incluem oncoproteínas conhecidas (tais como: Myb, Jun, Fos), proteínas transformadoras virais (tais como E1A, E6 e antígeno T grande) e proteínas supressoras de tumores (tais como p53, E2F,

Rb, Smads, RUNX e BRCA1) (IYER et al., 2004; WANG et al., 2013). CBP/P300 apresenta múltiplos domínios e, além do domínio de histona acetil-transferase enzimático, contém outros domínios de interação de proteínas incluindo três domínios ricos em cisteína-histidina (CH1, CH2 e CH3), um domínio indutível por quinase (KIX), um bromodomínio e um domínio de interação coativador de receptor de esteroides (SID, também o domínio de interação SRC-1) (figura 9) (WANG et al., 2008; CHEN;LI 2011; WANG et al., 2013; MAKSIMOSKA et al., 2014). Estes servem como domínios de interação proteína-proteína, nos quais o bromodomínio reconhece a acetil-lisina em histonas e outras proteínas. P300 / CBP não só catalisa a acetilação de todas as histonas de quatro núcleos, mas foi descrita por acetilar mais de 70 outras proteínas além dela própria. Portanto o complexo P300/CBP parece ser um integrador de transcrição versátil, e talvez bastante geral (WANG et al., 2008; HOLMQVIST; MANNERVIK, 2013).

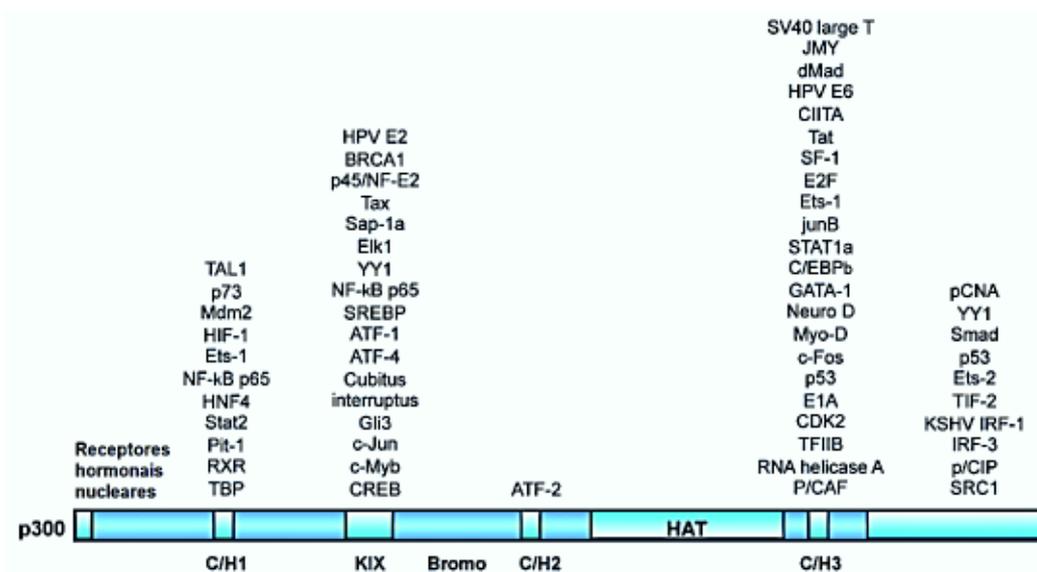


Figura 9: Exemplos de fatores de transcrição, ativadores e co-ativadores associados a diferentes domínios funcionais de P300 (Adaptado de LI; CHEN, 2011).

As modificações pós-traducionais como, acetilação, fosforilação e ubiquitinação são mecanismos fundamentais para a regulação da função proteica (KARUKURICHI et al., 2010). P300 pode ser regulado por acetilação (LI; CHEN, 2011). É bem consolidado que P300 pode acetilar um número considerável de proteínas, além de si mesmo (HOLMQVIST; MANNERVIK, 2013). A auto-acetilação de P300 é predominantemente alcançada de forma intermolecular. Um total de 17 diferentes locais de auto-acetilação foram identificados no domínio histona acetil-transferase (HAT) de P300 (THOMPSON et al., 2004; KARANAM et al., 2006). Muitos dos resíduos de lisina acetilados são agrupados no domínio HAT de P300, que é sensível às proteases, e a atividade catalítica de P300 é estimulada pela autoacetilação

de alguns destes resíduos de lisina (THOMPSON et al., 2004). Auto-acetilação destes resíduos de lisina parece atuar como um interruptor reversível para controlar a atividade HAT e, conseqüentemente, o potencial de P300 para atuar como co-ativador da transcrição. Contudo, P300 abriga centenas de resíduos de lisina e cerca da metade deles está localizada em domínios HAT diferentes. A extensão da autoacetilação do comprimento total de P300 e a influência do meio celular não são conhecidos. Além disso, ainda não está claro se outras acetiltransferases celulares também podem acetilar P300 (LI; CHEN, 2011).

A fosforilação de P300 ocorre abundantemente durante a proliferação celular e diferenciação, na qual, quinases dependentes de ciclinas regulam P300/CBP durante a progressão do ciclo celular (LI; CHEN, 2011). A proteína P300 é fosforilada em vários locais por várias quinases, incluindo quinases ativadas por sinais extracelulares (por exemplo, proteína quinase [PK] A, PKC, PKB e proteínas quinases ativadas por mitógenos [MAPK, incluindo BRAF]) (WANG et al., 2014). Uma série de resíduos potencialmente fosforiláveis por proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), isto é, serinas e treoninas, estão presentes e conservados evolutivamente em P300/CBP (POIZAT et al., 2005).

A proteína quinase B (PKB) é um fator crítico de proliferação e sobrevivência celular, (LI; CHEN, 2011), e sua função é mediada através da fosforilação no resíduo de serina Ser-1834 (CHEN et al., 2007). P300, que contém uma sequência consenso na região C-terminal, interage com PKB e é um substrato íntegro para a fosforilação por PKB nessa sequência. A fosforilação de P300 por PKB aumenta a atividade HAT de P300 e induz o recrutamento de P300 aos seus promotores alvos, levando à acetilação de histonas e à ativação transcricional. PKB também contribui para a atividade transcricional, aumentando a estabilidade metabólica de P300 ou mantendo a concentração crítica da proteína p300 endógena em diferentes sistemas celulares. PKB então é, portanto um regulador crítico das funções de P300 (LI; CHEN, 2011).

A fosforilação de P300 também é mediada por ERK1/2 nos resíduos de serina Ser2279, Ser2315 e Ser2366 e estimula a atividade de HAT. A proteína quinase C (PKC) e a fosforilação de P300 mediada por quinase 2 no resíduo de serina Ser89, inibem a atividade HAT de P300. A fosforilação por ataxiatelangiectasia mutada (ATM), no resíduo Ser106 do P300 é importante para a estabilização de P300 em resposta a quebras de cadeias duplas induzidas por radiação ionizante. Assim, diferentes resíduos de P300 são fosforilados por quinases diferentes sob várias condições (CHEN et al., 2007).

Várias vias de sinalização foram identificadas na regulação das funções de P300. A ubiquitinação de P300 está associada com a sua forma não fosforilada, e a conjugação da ubiquitina ocorre em regiões específicas, como a região de bromo domínio. P300 também pode ser modificado pela via SUMO (sumoilação) próximo do bromo domínio, que se correlaciona com a repressão transcricional (LI; CHEN, 2011). A fosforilação reversível é fundamental para a regulação de uma variedade diversa de processos celulares (CHEN et al., 2005). A fosforilação de forma reversível pode sinalizar a degradação da proteína de forma seletiva, através da via proteassomal 26S, que é um sistema de proteólise celular importante, localizando-se no citoplasma e no núcleo (LI; CHEN, 2011).

A degradação através da via de proteassoma 26S envolve modificação covalente da proteína alvo com múltiplas porções de ubiquitina antes da destruição da proteína (CHEN et al., 2005). MAP kinase p38, fosforila P300 e induz a degradação proteassomal de P300 (LI; CHEN, 2011). A fosforilação de P300 por proteínas quinases também pode desempenhar um papel importante na manutenção de sua estabilidade metabólica como no caso de PKB. Uma das principais fosfatases de serina-treonina, é a proteína fosfatase 2A (PP2A) que caracteriza um complexo heterotrimérico constituído por uma subunidade estrutural, uma subunidade catalítica e uma subunidade reguladora variável (CHEN et al., 2005).

A subunidade reguladora B56 γ 3 da proteína fosfatase 2A é uma reguladora negativa da atividade de P300, visando a degradação P300 através da via do proteassoma 26S. Dessa maneira, a defosforilação de P300 pela fosfatase pode servir de sinal para designar o co-ativador da proteólise (LI; CHEN, 2011). Muitas moléculas pequenas demonstraram induzir a degradação de P300 através da ativação de diferentes transdutores de cascatas de sinalização que conduzem à fosforilação reversível de P300, e a atividade de P300 é regulada dinamicamente por essas vias de sinalização (LI; CHEN, 2011).

A regulação da atividade nuclear do P300 é fundamental para assegurar a acetilação e a ativação da transcrição de histonas (CHEN et al., 2007). O deslocamento núcleo-citoplasma tem sido implicado no controle da disponibilidade e atividade desse co-ativador. Em resposta aos estímulos celulares, P300 migra para o citoplasma, o que coincide com a ubiquitinação e a subsequente degradação (CHEN et al., 2007). O controle espacial do P300 pode ser um mecanismo integral para regular o função do co-ativador, limitando sua oportunidade de interagir com fatores de transcrição específicos de sequência, acetilar histonas ou fatores de transcrição e coordenar a ativação transcricional (LI; CHEN, 2011).

A agregação de proteínas dobradas nas células eucarióticas é formada quando o sistema de degradação de proteínas da célula está sobrecarregado, e até mesmo em respostas a proteínas tóxicas (LI; CHEN, 2011). A formação desse agregado proteico é um processo altamente regulado que possivelmente, serve para organizar proteínas dobradas em um único local (CORBOY et al., 2005). A formação do agregado é um mecanismo de proteção celular para sequestrar agregados de proteína citoplasmática ou para liberá-los para eliminação através da via autofagossoma alternativa. Muitas proteínas nucleares, incluindo P300, são substratos do agregossoma e sofrem degradação citoplasmática, que é parte integrante do processo normal de regulação celular (CHEN et al., 2007, LI; CHEN 2011).

Além de ser degradado pelo sistema agregossoma, P300 desempenha um importante papel no citoplasma, apresentando uma atividade citoplasmática de ubiquitina ligase E4 (SHI et al., 2009; LI; CHEN, 2011). P300 não só acetila p53 e atua como seu co-ativador transcricional, mas também contribui para a ubiquitinação p53 através das atividades intrínsecas de E3 / E4 (GROSSMAN et al., 2003; SHI et al., 2009). A função de P300 é necessária para a poliubiquitinação endógena de p53 e sua rotatividade (SHI et al., 2009). Além disso, a atividade intrínseca de E4 ligase do P300 é exclusivamente localizada no citoplasma (SHI et al., 2009). Esta compartimentalização de P300 separa sua atividade de ubiquitina ligase no citoplasma daquela de acetiltransferase necessária para transcrição de genes mediada por p53 no núcleo, o que resolve efetivamente a função oposta de P300 em p53 em relação à proteólise e ativação (LI; CHEN, 2011).

Alterações em P300 e CBP são associadas a várias doenças. Por exemplo, na síndrome de Rubinstein-Taybi (RTS), desordem de desenvolvimento, causada por mutações germinativas heterozigóticas nos genes CBP ou P300 (HENRY et al., 2013). Várias mutações genéticas associadas a P300 / CBP foram detectadas em tumores humanos com perda de função, sendo mutações pontuais encontradas em carcinomas colorretais, de mama, ovários, cavidade oral, aparelho gástrico, pulmão e pâncreas (WANG et al., 2008; LI; CHEN, 2011). Translocações cromossômicas associadas à CBP\P300 foram observadas em leucemia mieloide aguda (LMA) e em doenças hematológicas como mieloide / linfóide ou linhagem mista (HOLMQVIST; MANNERVIK, 2013; WANG et al., 2008; IYER, 2004).

O aumento da expressão de P300 tem sido correlacionado com progressão do câncer e com a diminuição da sobrevida dos pacientes em diversos tipos tumorais (LIAO et al., 2012). O CBP\P300 também funciona como um cofator transcricional para proteínas envolvidas em vias tumorigênicas e também pode contribuir para a carcinogênese do epitélio

respiratório através da ciclina D1, ciclooxigenase-2 (COX-2) e ativador da proteína-1 (AP-1) (WANG et al., 2009). P300 também está relacionado com p53 e HIF-1 em câncer de mama e (LI; CHEN, 2011) e a sua hipoexpressão foi relacionada com a progressão da doença e pior prognóstico em pacientes com melanoma (ROTTE et al., 2013). P300 também foi associada a doenças neurodegenerativas progressivas como a doença de Huntington, doença de Kennedy, doença de Alzheimer, doenças cardíacas e fibrose (HOLMQVIST; MANNERVIK, 2013; WANG et al., 2009). Entretanto, em carcinomas papilíferos de tireoide, o papel dessa proteína ainda parece indefinido.

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral:

Avaliar a expressão gênica de mRNA de *P300* e *CITED-1* em CPT utilizando PCR quantitativa em tempo real.

2.2 - Objetivos Específicos:

- 1) Comparar a expressão diferencial do mRNA de *P300* e *CITED-1* em 31 casos de CPT em relação aos tecidos tireoideanos normais (correlatos).
- 2) Investigar as possíveis associações entre a expressão do mRNA de *P300* e *CITED-1* e os aspectos clinicopatológicos dos 31 casos de CPT.
- 3) Contribuir para melhor elucidação do papel de *P300* e *CITED-1* na tumorigênese papilífera tireoidiana.
- 4) Propor possíveis marcadores diagnósticos e terapêuticos envolvidos na carcinogênese tireoidiana.

3. METODOLOGIA

3.1. Delineamento metodológico

Os pacientes selecionados nesse estudo foram operados sequencialmente no período de 2015 a 2016 no Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge (HAJ) da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG). Foram selecionados pacientes com carcinoma papilífero da tireoide com diagnóstico clínico e histopatológico comprovado. Informações clínicas foram obtidas dos respectivos prontuários. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Araújo Jorge. Número do parecer: 867.323 (Anexo A).

Para investigar a expressão gênica de P300 e CITED-1 nos pacientes com CPT, foram coletadas 31 amostras de tecido tumoral e 31 amostras do tecido normal adjacente. A análise das amostras pareadas, utilizando o tecido normal e o tumoral do mesmo paciente é uma forma de controlar os fatores que potencialmente regulam a expressão de P300 e CITED-1 e que podem diferir de paciente para paciente.

Imediatamente após a remoção cirúrgica, as amostras de tecidos foram analisadas por um patologista, por meio de técnica de congelação. Em seguida, transferidas para o nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em -70°C . Cortes histológicos foram feitos a partir das amostras para a confirmação diagnóstica e separação dos fragmentos de tecidos normais e tumorais, com técnica de macrodissecção. Todos os 31 tecidos tumorais foram classificados como carcinomas papilíferos da tireoide.

3.4 Análise Molecular

3.4.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído das amostras teciduais congeladas em nitrogênio líquido usando o reagente TRIZOL (Invitrogen). Foi utilizado 1 mL de TRIZOL para cada fragmento de tecido (50-100 mg). As amostras foram previamente homogeneizadas em TRIZOL com o uso de um homogeneizador de células (*TissueRuptor*, Qiagen), conforme instruções do fabricante. Após homogeneização, o material foi submetido à fase de separação do RNA, no qual a amostra foi incubada por 5 minutos no gelo, adicionando em seguida, 200 μL de clorofórmio seguido de homogeneização vigorosa por 15 segundos e incubação por 15 minutos no gelo. As amostras foram então, submetidas à centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada ($2-8^{\circ}\text{C}$), que promoveu a separação da mistura em três fases: uma fase inferior vermelha contendo fenol-clorofórmio, uma fase intermediária e uma

fase superior translúcida aquosa na qual se encontra o RNA. Em seguida foi realizada a precipitação do RNA com o uso de 500 µL de álcool isopropílico, após transferência da fase aquosa com o RNA para um novo tubo limpo e seco. Após esta etapa, as amostras foram incubadas por 10 minutos no gelo e centrifugadas sob refrigeração (2-8 °C) a 12.000 rpm por 10 min. O precipitado de RNA, frequentemente visível antes da centrifugação, formou um “*pellet*” gelatinoso no fundo lateral do tubo. A próxima fase foi a de lavagem do RNA com o uso de 1 mL de etanol 75%, após remoção do sobrenadante da fase anterior. Depois, as amostras centrifugadas a 7.4000 rpm por 5 minutos (2-8 °C). A última etapa foi a de redissolução do RNA, no qual o “*pellet*” de RNA foi seco por ação de evaporação do etanol, seguido de dissolução em água livre de RNase (40 µL). O produto de extração fora armazenado em microtubos a -80°C no Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia da ACCG.

Após a extração, as amostras tiveram a determinação da pureza e a concentração do RNA extraído pela leitura no espectrofotômetro, *Nanodrop (Thermo Scientific)*, em um comprimento de onda de 260 e 280nm. A razão 260/280 deve estar entre 1,8 e 2,1, a fim de que a amostra seja considerada adequada para a transcrição reversa e quantificação de transcritos específicos.

Após a determinação das concentrações, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de Agarose 0,8%. Esse passo é necessário para a visualização de presença ou não do RNA, avaliação da integridade e verificação de ácidos nucleicos contaminantes. A separação foi realizada em cuba de eletroforese contendo tampão TBE 1X por 60 minutos a 100W e 70mA.

A análise do gel, sob luz ultravioleta, deve mostrar um rastro de RNA. A integridade do RNA é avaliada pela presença das bandas específicas de RNA ribossomal 28S, 18S e 5.8S. O RNA mensageiro é visualizado como um rastro entre as bandas ribossomais. A figura abaixo representa a eletroforese de algumas amostras que foram extraídas. Todas as 31 amostras seguiram esse mesmo padrão de eletroforese.

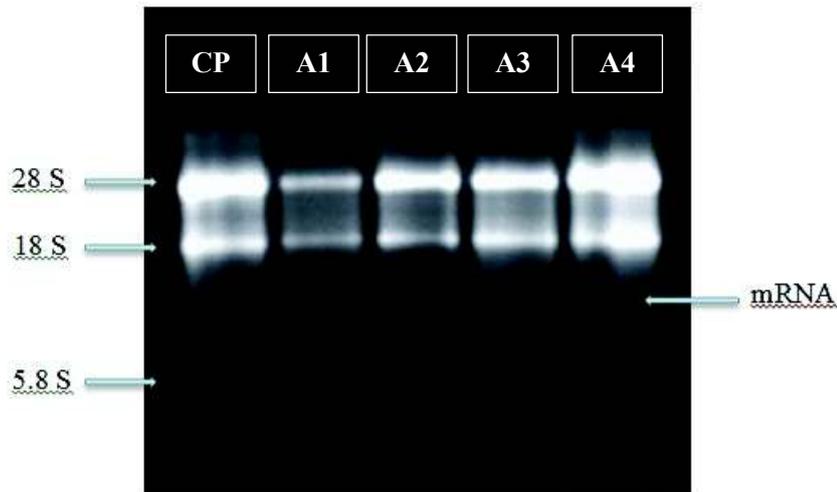


Figura10. Eletroforese das amostras de RNA extraídas dos tumores (CPT) e tecidos normais.

3.4.2 Síntese de cDNA

Utilizou-se o Kit *High Capacity RNA to cDNA Master Mix (Applied Biosystems)* e o produto gerado a partir da técnica de extração de RNA para realização da síntese de DNA complementar. De acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante, todas as amostras de RNA dos tumores e tecidos normais foram previamente submetidas a cálculos para diluição, de modo que foi obtida uma concentração de aproximadamente 1000 ng/ μ L. O volume final da reação deve ser de 20 μ L, dos quais 10 μ L correspondem ao Tampão 2x, 1 μ L da enzima RT 20x, a quantidade da amostra necessária calculada e a quantidade suficiente em água para completar o volume. As amostras foram colocadas no termociclador (*Veriti - Applied Biosystems*) a 37°C por 60 minutos, 95°C por 5 minutos e 4°C infinito. Após a amplificação, os cDNAs foram submetidos a quantificação no *Nanodrop (Thermo Scientific)* (Tabela 1) e estocados a -20°C no laboratório de Oncogenética e Radiobiologia da ACCG.

3.4.3 PCR em Tempo Real

A técnica de PCR em tempo real (qPCR) constitui-se de um método de análise gênica mais rápido do que a técnica de PCR convencional, promovendo o aumento da sensibilidade e reprodutibilidade do teste. O emprego desta metodologia permite a amplificação e detecção simultânea da sequência gênica alvo, através do uso de marcadores fluorescentes (OKINO, 2007).

Durante a reação de PCR, a fluorescência aumenta a cada novo ciclo e atinge um limiar (*threshold*), no qual todas as amostras podem ser comparadas. Este limiar corresponde ao momento utilizado para análise da fluorescência e deve estar na faixa em que a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras, torna-se significativamente maior que a fluorescência de base. O limiar é definido na fase exponencial da reação de PCR, quando a quantidade de produto formada traduz de forma satisfatória a concentração inicial de fitas molde (mRNA/cDNA) amplificadas pela reação (SADDI, 2004).

O ciclo exato no qual o limiar de fluorescência é definido denomina-se CT (*Ct: threshold cycle*). Quando a eficiência da reação de PCR está próxima de 100%, o número de cópias geradas aumenta de forma exponencial. Amostras mais concentradas (com maior número de fitas-molde iniciais) atingem o limiar mais precocemente e mostram valores de Cts mais baixos (SADDI, 2004). O Ct permite a quantificação relativa do cDNA do gene de interesse de cada uma das amostras, após ser corrigido pelos Cts dos genes endógenos e da amostra de referência. No caso deste estudo, a análise da expressão relativa do gene alvo foi feita comparando as amostras de tumor com as amostras normais para os dois genes endógenos, separadamente.

Utilizando o Ct, a quantificação absoluta e a quantificação relativa podem ser realizadas. A quantificação absoluta realiza a quantificação com base em uma curva padrão. Em contraste, a quantificação relativa determina mudanças na expressão gênica em relação a uma amostra de referência. A quantificação relativa é amplamente utilizada, pois requer menos reagentes, uma vez que não é necessário gerar uma curva padrão, e os erros causados por diluições ao criar uma curva padrão, também podem ser evitados. Além disso, às vezes, a quantificação relativa dos genes entre dois grupos de tratamento é mais interessante do que os números moleculares exatos de DNA / RNA (RAO et al., 2013).

Os conjuntos de primers e sonda foram desenhados pela Life Technologies seguindo os critérios e padrões definidos pelo software para sondas do tipo TaqMan. Os ensaios TaqMan são projetados usando o mesmo protocolo de bioinformática validado e o mesmo protocolo de

corrida, eliminando a necessidade de desenho de primers ou otimização de PCR (CARVALHO, 2012).

O ensaio *TaqMan* de expressão gênica escolhido para o gene alvo P300, foi o *Hs00914223_m1* (*Applied Biosystems*) e para o gene alvo CITED-1 *Hs00918445_g1* (*Applied Biosystems*), ambos marcados com a fluorescência FAM. O controle endógeno escolhido foi o B2M, beta – 2 – microglobulina (4326319E – *Applied Biosystems*), marcado com fluorescência VIC.

O Master Mix utilizado foi o *TaqMan Gene Expression Master Mix* (4369510 – *Applied Biosystems*). O master mix, constitui-se de um conjunto de reagentes que é otimizado para análises de PCR Quantitativo em Tempo Real. As reações foram realizadas em multiplex, utilizando ensaios *TaqMan* para um gene alvo e um gene endógeno em cada placa. As placas são de 48 poços e foram seladas com um selo óptico (*Applied Biosystems*).

Em todas as placas foram usados controles negativos e um pool de cDNA como amostra de referência. Todas as amostras foram quantificadas em duplicata sendo que todos os experimentos foram otimizados de forma que a diferença entre os Cts (*threshold cycles*), obtidos para cada reação em duplicata, não ultrapassassem mais que 0,5 Ct. O equipamento de PCR em tempo real utilizado foi o Step One (*Applied Biosystems*) e utilizou-se o software do equipamento para desenhar o ensaio, verificar a amplificação e analisar os dados. As condições de ciclagem foram as sugeridas pelo equipamento.

O protocolo utilizado na reação foi o sugerido pelo fabricante. Após o ajuste dos cálculos realizados pelo software do aparelho, utilizou-se 2µL oriundos da síntese de DNA complementar das amostras diluídas e 1 µL da reação contendo sondas *TaqMan*® a 20x correspondente, 10µL de *TaqMan*® UniversalMasterMix 2x, e 7.0 µL de água livre de nucleases, totalizando 20 µL como volume final em cada poço na placa.

Os níveis de expressão gênica de *P300* e *CITED-1* foram normalizados pelo B2M e calculados pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para o cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ primeiramente, calculou-se para cada gene, a diferença nos valores de Ct entre amostra tratada e controle e assim, obtivemos o valor de ΔCt para o respectivo gene. Em seguida, foi calculado o $-\Delta\Delta Ct$, que é a correção do ΔCt das amostras tumorais pelo ΔCt do grupo controle, no qual se subtraiu o ΔCt da amostra pela média dos ΔCt s dos seus controles. A amplificação foi feita de maneira exponencial em base 2, com a eficiência dos primers próxima a 100%, deste modo então, foi possível calcular o $2^{-\Delta\Delta Ct}$, multiplicando o valor do

– $\Delta\Delta CT$ por 2, resultando no número de vezes que esses genes alvos estavam expressos nos tecidos tumorais em relação aos respectivos tecidos adjacentes normais.

3.4.5 - Análises Estatísticas

Os níveis de expressão gênica relativa foram expressos como mediana e intervalo interquartil (IIQ). As variáveis contínuas foram testadas quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. O teste t pareado ou teste de Wilcoxon foram utilizados na comparação da quantificação do mRNA e na avaliação da expressão relativa dos genes estudados nos tecidos tumorais e adjacentes normais. O método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi utilizado para análise da expressão relativa dos genes alvos. A associação entre a expressão relativa do mRNA e as características clinicopatológicas foi investigada por meio do teste de Mann-Whitney. A correlação entre os níveis de expressão dos genes alvos foi analisada pelo método do Coeficiente de Correlação de Pearson. Os dados de expressão relativa do mRNA nos tecidos normais e tumorais, a partir dos valores de ΔCT (CT médio do gene alvo - CT médio do gene endógeno), sofreram normalização ($2^{-\Delta Ct}$) e transformação logarítmica, para melhor apresentação gráfica dos resultados (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Os dados obtidos foram armazenados em uma planilha do Software Microsoft Excel® (Microsoft Corp., EUA), junto com os dados clinicopatológicos obtidos dos prontuários dos pacientes. Os resultados foram tabulados e analisados por meio do programa estatístico SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, USA), utilizando o intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS

A média de idade dos pacientes analisados foi de $42,3 \pm 11,1$ anos, variando de 17 a 69 anos. A maioria dos pacientes era do sexo feminino (83,9%) e apresentava menos de 55 anos (83,9%). Em relação ao tamanho dos nódulos detectados, a medida do diâmetro do maior eixo variou de 0,6 a 6 cm, sendo a média de $1,91 \pm 1,2$ cm. A maioria dos pacientes apresentou nódulos com tamanho variando de 1 a 2 cm (38,7%), seguida pelos casos maiores que 2 cm (32,3%) e menores ou iguais a 1 cm (29%). Tumores multifocais foram detectados em 45,2% dos casos. Não foram observadas invasão do tecido adjacente e nem o comprometimento da cápsula em nenhum dos casos. Cerca de 22,6% dos pacientes apresentaram metástases linfonodais e nenhum paciente apresentou metástases à distância. Em relação ao estadiamento clínico, os 31 casos (100%) foram classificados como estágio I. As características clinicopatológicas dos pacientes estudados estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características clinicopatológicas dos pacientes com carcinoma papilífero de tireoide

Característica	Número (%)
Idade ao diagnóstico (anos)	
Média ± DP	42,3 ± 11,1
Variação	17-69
< 55	26 (83,9)
≥ 55	5 (16,1)
Gênero	
Masculino	5 (16,1)
Feminino	26 (83,9)
Tamanho do tumor (cm)	
Média ± DP	1,91 ± 1,2
Variação	0,6-6,0
≤ 1	9 (29)
1 a 2	12 (38,7)
> 2	10 (32,3)
Multifocalidade	
Sim	15 (48,4)
Não	16 (51,6)
Invasão vascular	
Sim	2 (6,5)
Não	29 (93,5)
Extensão extratireoidiana	
Sim	0 (0)
Não	31 (100)
Tumor Primário (T)*	
T1	21 (67,7)
T2	9 (29)
T3	1 (3,2)
Metástase linfonodal (N)	
Sim	7 (22,6)
Não	24 (77,4)
Metástase à distância (M)	
Sim	0 (0)
Não	31 (100)
Estadiamento clínico*	
I	31 (100)
II	0 (0)
III	0 (0)
IV	0 (0)

*Classificação baseada em critérios estabelecidos pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC, 2017). DP: Desvio padrão

As concentrações do RNA extraído das amostras normais e tumorais estão apresentadas no ANEXO C . Todas as amostras apresentaram uma variação da razão 260/280 nm entre 1,8 e 2,1, indicando que os RNAs estavam em condições adequadas para os testes de transcrição reversa e posterior quantificação relativa. A quantificação média dos RNAs das 62

amostras analisadas foi de 968 ± 691 ng/ μ L, variando de 116 a 3.386 ng/ μ L, sendo maior nos tecidos tumorais em relação aos tecidos normais (1.252 vs 684 ng/ μ L). Essas diferenças nas concentrações de RNA foram estatisticamente significativas ($p < 0,0001$, teste de Wilcoxon) (Tabela 2).

Tabela 2. Análise comparativa da quantificação média do RNA extraído dos tecidos normais e tumorais

Grupos	Média \pm DP (ng/ μ L)	Variação (ng/ μ L)	p*
Normal	684 \pm 387,6	116-1847	p<0,0001
Tumor	1.252 \pm 809,15	134-3386	

* Teste de Wilcoxon

A expressão gênica do mRNA de *P300* foi semelhante em ambos os tecidos: normal (mediana = 0,052, IIQ = 0,094) e tumoral (mediana = 0,041, IIQ = 0,048) ($p = 0,481$) (Figura 11).

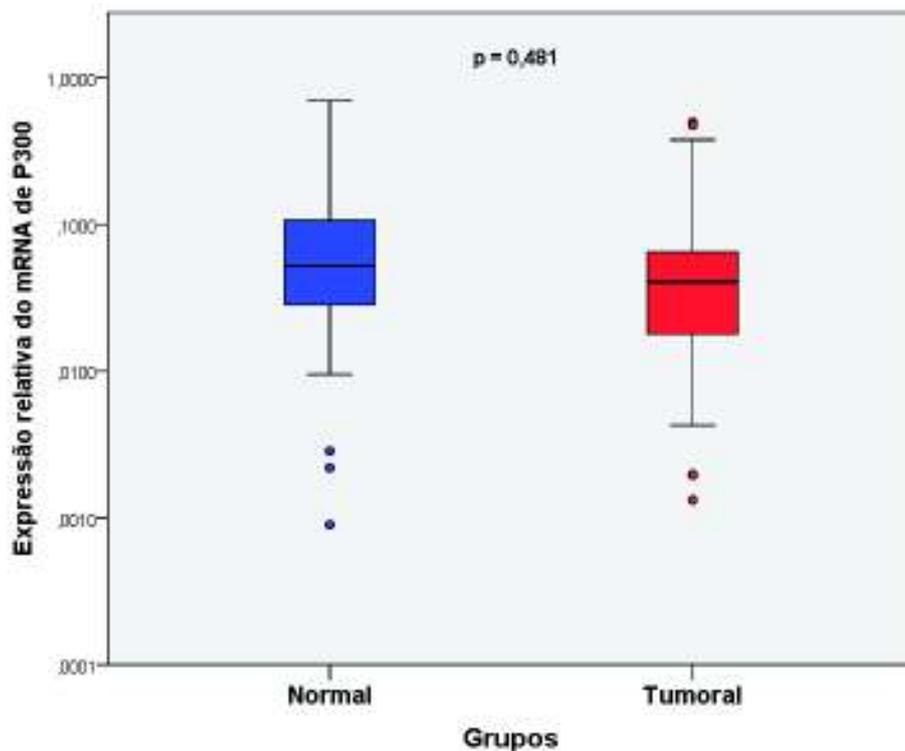


Figura11. Expressão relativa do mRNA de *P300* em tecidos tumorais e normais adjacentes.

Utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, os níveis de expressão de *P300* variaram de 0,02 a 8,72 vezes nos tecidos tumorais em relação aos tecidos normais adjacentes, com mediana de 0,93 (IIQ = 0,88). Em 17/31 (54,8%) pacientes analisados, a expressão de *P300* foi maior nos tecidos normais em relação aos tecidos tumorais ($2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$) (Figura 12).

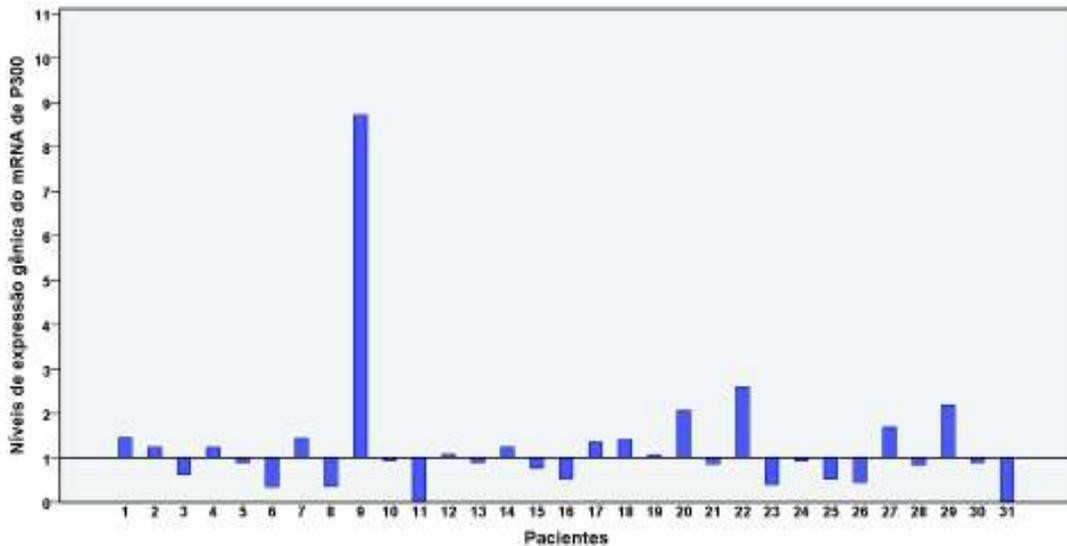


Figura 12. Níveis de expressão do mRNA de *P300* nas amostras dos 31 pacientes com CPT.

Em relação ao mRNA de *CITED-1*, a expressão foi maior nos tecidos tumorais (mediana = 0,780, IIQ = 0,881) em relação aos tecidos normais (mediana = 0,017, IIQ = 0,086) ($p < 0,0001$) (Figura 13).

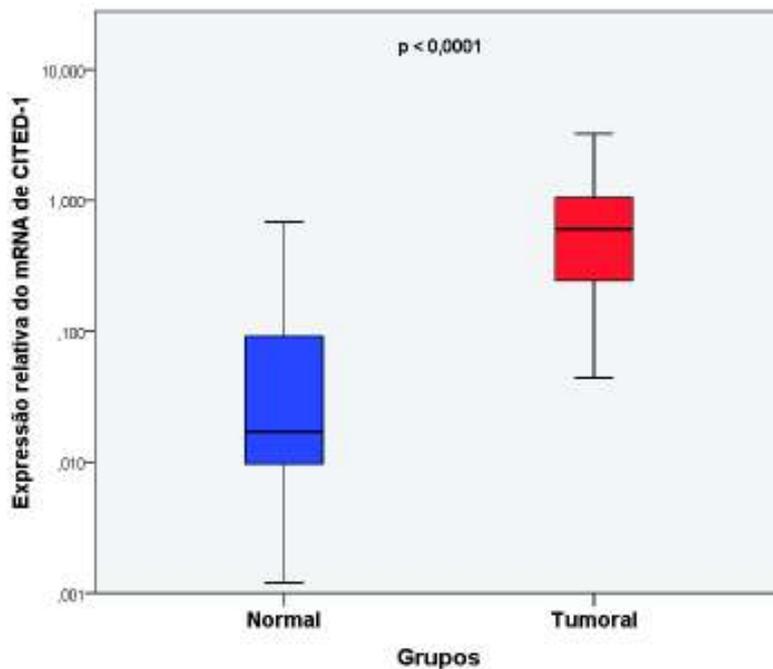


Figura 13. Expressão relativa do mRNA de *CITED-1* em tecidos tumorais e normais adjacentes.

Já a expressão relativa de *CITED-1* variou de 0,25 a 817,43 vezes, com mediana de 23,83 (IIQ = 53,93). Em 30/31 (96,8%) pacientes estudados, a expressão de *CITED-1* foi maior nos tecidos tumorais em relação aos tecidos normais ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$) (Figura 14).

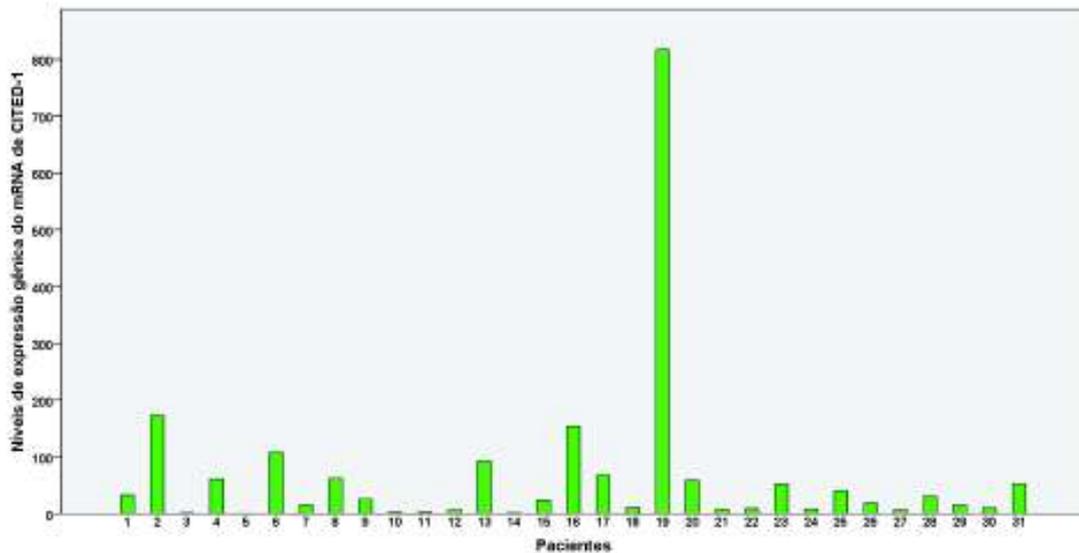


Figura 14. Níveis de expressão do mRNA de *CITED-1* nas amostras dos 31 pacientes com CPT.

Os níveis de expressão dos dois genes, *P300* e *CITED-1* não estão associados. os (Figura 15).

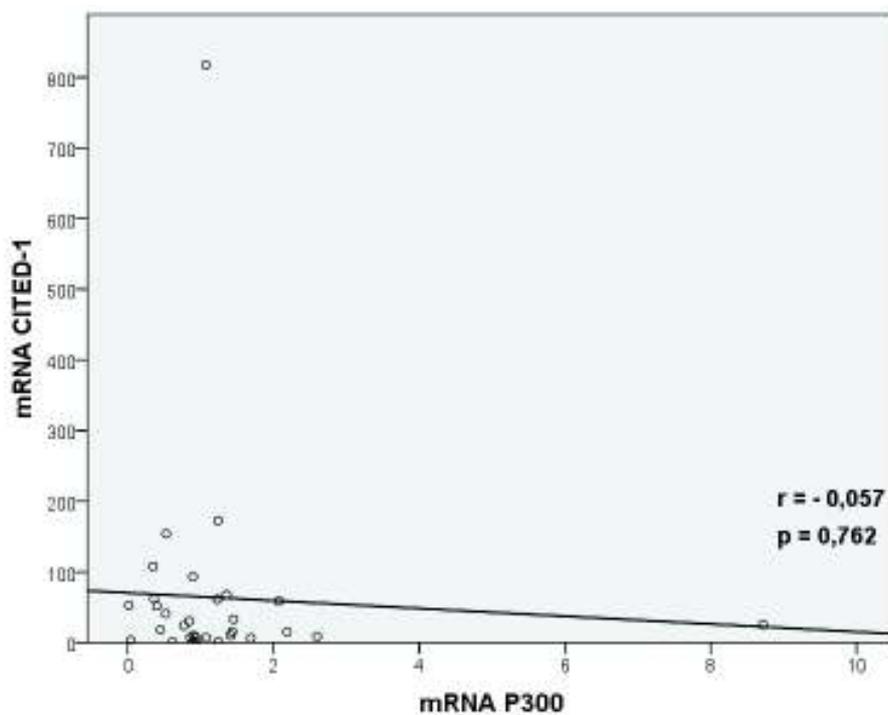


Figura 15. Correlação entre os níveis de expressão do mRNA de *P300* e *CITED-1*.

Diferenças entre as medianas da expressão de mRNA de *P300* e *CITED-1*, utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, e as características clinicopatológicas dos tumores foram investigadas por meio do teste de Mann-Whitney e são apresentadas na Tabela 4. Houve diferença significativa entre os níveis de expressão de *CITED-1* e o tamanho do tumor ($p = 0,016$).

Tabela 3. Associação entre o nível de expressão gênica de *P300* e *CITED-1* e as características clinicopatológicas

Característica	N	<i>P300</i> Mediana (IIQ)	p	<i>CITED-1</i> Mediana (IIQ)	*p
Idade (anos)					
< 55	26	1,002 (0,891)	0,452	16,998 (52,228)	0,555
≥ 55	5	0,888 (0,617)		33,056 (88,568)	
Gênero					
Masculino	5	1,075 (1,355)	0,629	8,879 (61,344)	0,555
Feminino	26	0,916 (0,891)		24,750 (51,351)	
Multifocalidade					
Sim	15	1,231 (0,846)	0,155	15,593 (43,966)	0,722
Não	16	0,892 (0,674)		36,987 (82,997)	
Invasão vascular					
Sim	2	4,975	0,127	43,430	0,469
Não	29	0,899 (0,861)		18,404 (53,343)	
Tumor Primário (T)					
T1	21	0,935 (0,813)	0,735	10,301 (46,245)	0,016
T2+T3	10	0,897 (1,222)		52,428 (67,731)	
Metástase linfonodal					
Sim	7	0,935 (1,344)	0,422	25,667 (144,087)	0,603
Não	24	0,914 (0,930)		21,118 (53,601)	

*Teste de Mann-Whitney

5. DISCUSSÃO

Os carcinomas de tireoide são mais comuns em indivíduos com idades entre 25 e 65 anos, afetando principalmente aqueles com idade superior a 40 anos e do sexo feminino (ZANELLA et al., 2010). Nosso grupo de estudo apresenta características semelhantes aos da literatura. A proporção de mulheres com CPT foi cinco vezes maior do que a de homens. Em relação à idade, a maioria dos CPT foi registrada em pacientes com idades entre 17 e 69 anos, sendo que 83,9% apresentavam menos de 55 anos. Alterações hormonais relacionadas ao ciclo menstrual, gravidez, menopausa e fatores reprodutivos podem explicar os picos de incidência do câncer de tireoide nas mulheres (MANOLE et al., 2001), porém esses dados precisam ser melhor elucidados.

Os carcinomas de tireoide apresentam um bom prognóstico e existem vários fatores prognósticos que determinam a sobrevida desses pacientes (SIPOS; MAZZAFERRI, 2010; AMIN; EDGE, 2017). O presente estudo se baseou nos fatores prognósticos propostos pela classificação baseada em critérios estabelecidos pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC, 2017). Os tumores que integraram o estudo apresentaram características de bom prognóstico. Além da idade e sexo, o tamanho dos nódulos detectados foi avaliado e a maioria dos pacientes apresentou nódulos com tamanho variando de 1 a 2 cm (38,7%), bem como a multifocalidade (45,2%) dos casos. Não foram observadas invasão do tecido adjacente e comprometimento da cápsula tireoidiana (100%) nos casos avaliados. Cerca de 22,6% dos pacientes apresentaram metástases linfonodais e nenhum paciente apresentou metástases à distância.

Para a análise de expressão gênica, utilizamos os RNAs extraídos das amostras normais e tumorais e diferenças significativas ($p < 0,0001$) foram observadas para a expressão de *CITED-1*, que estava hiperexpresso nos tumores em relação aos tecidos normais. O controle da expressão gênica é um mecanismo importante para o desenvolvimento e diferenciação celular. Nos tecidos normais os genes são expressos de forma regulada e falhas no programa de expressão podem levar à carcinogênese. De forma geral, neste estudo, maiores concentrações de RNA foram obtidas nos tecidos tumorais em relação aos tecidos normais. A célula tumoral muda o seu programa de expressão, aumentando a transcrição de determinados genes, através do aumento do número de cópias de mRNA transcritas. Dessa forma, a partir de uma quantidade de DNA molde a transcrição aumentada gera uma quantidade maior de RNAm, que conseqüentemente é traduzido em maior quantidade da proteína correlata (MARTINS & FILHO, 2010). Portanto, a detecção das diferenças de

expressão nos genes de um tecido normal e tumoral são ferramentas valiosas na compreensão do processo da carcinogênese e no auxílio do desenvolvimento de novas drogas que utilizam alvos moleculares tumorais específicos.

Várias alterações genéticas são associadas aos carcinomas papilares de tireoide e o perfil de expressão gênica, através da quantificação por PCR em tempo real, vem sendo crucial no estudo dos genes de interesse. Diante disso, existe uma necessidade de indicadores mais precisos, que vão auxiliar o diagnóstico e o prognóstico do CPT. Este é o primeiro trabalho que avaliou a associação entre a expressão de *P300* e de *CITED-1*, em casos de carcinomas papilíferos da tireoide, a fim de determinar se esses marcadores poderiam compor o perfil de marcadores prognósticos para os CPT.

Os níveis de mRNA de *P300* foram investigados em pacientes com CPT, utilizando o tecido tumoral e o tecido normal adjacente e a diferença entre os níveis de expressão não foi significativa ($p = 0,481$). Estes resultados, portanto, sugerem que *P300* não foi hiperexpresso nos tumores em relação aos tecidos normais. *P300* é um integrador da transcrição bastante importante e associado a diversas vias tumorigênicas (HOLMQVIST & MANNERVIK, 2013; WANG et al., 2009). Visto a importância do complexo *CBP/P300* como alvo terapêutico, compostos inibidores de histona acetilases, foram desenvolvidos para inibir a atividade catalítica das HATs em muitos tipos de câncer e doenças proliferativas (HEERBOTH et al., 2014).

Embora não sejam muito seletivos e capazes de influenciar múltiplas classes de proteínas, os inibidores de HAT parecem ser promissores para o tratamento de diversas doenças. As principais limitações dos inibidores de HAT relacionam-se à baixa especificidade e seletividade para as HATs (DEKKER et al., 2009). Frente a essas limitações, estudos progrediram no aumento da seletividade das drogas em relação às HATs. Por exemplo, a droga Lys-CoA é vista como inibidora de P300 com alta seletividade. Contudo, a Lys-CoA é geralmente inativa em sistemas celulares de mamíferos. C646, outra inibidora de P300, parece ser a única inibidora de HAT potente e seletiva descoberta até o momento. O composto liga-se a P300 e funciona como um competidor de cofator. No entanto, a utilização dessa droga ainda está sendo avaliada (HEERBOTH et al., 2014).

As histonas acetil-transferases participam da transcrição, interagindo com vários genes e participando de grandes complexos multiproteicos. Deste modo, é necessário o estudo mais amplo das diversas interações de P300 e esses complexos, a fim de se avaliar a possibilidade

do uso de P300 como marcador nos CPT, bem como a identificação de alvos terapêuticos mais específicos e seletivos visando o cofator P300 e o complexo CBP/P300.

O diagnóstico diferencial dos carcinomas tireoideanos é baseado exclusivamente na histologia. Embora os carcinomas papilares apresentem características morfológicas relativamente distintas, biomarcadores específicos podem ser ferramentas úteis, especialmente na distinção de casos atípicos, como variantes foliculares de CPT. Um critério principal para um marcador apresentar relevância clínica é a expressão baixa ou ausente em tecido normal e a alta expressão no tecido tumoral (HUANG et al., 2001).

No presente estudo os níveis de mRNA de *CITED-1* foram investigados em pacientes com CPT e foi encontrada uma hiperexpressão do gene nos tumores em relação aos tecidos normais, conforme já descrito na literatura. Isso pode ser explicado em parte porque a alta atividade metabólica da célula tiroideana tumoral, requer maiores níveis de transcrição gênica e consequentemente maior expressão de *CITED-1*, que é um co-ativador transcricional que aumenta a transcrição mediada por importantes genes.

CITED-1 já foi associado à carcinogênese tiroideana. PRASAD et al (2005) descreveram a expressão da proteína *CITED-1* em 87% dos casos de CPT e em nenhum tecido tireoidiano normal. ARORA et al (2009) também demonstraram por meio de *microarray*, que essa proteína foi seis vezes mais expressa em CPT em relação a tumores benignos e tecidos tireoidianos normais. HUANG et al., (2001) descreveram a hiperexpressão de *CITED-1* em todos os casos de CPT utilizando *microarray* de DNA e análise de RT-PCR. *CITED-1* também apresentou um papel promissor na distinção de CPT a partir de lesões benignas na tireoide (LIU et al., 2008; SCOGNAMIGLIO et al., 2006). Esses estudos confirmam que *CITED-1* é hiperexpresso nos tecidos tumorais e que apresenta uma alta especificidade para os CPT, no entanto, é necessário um maior número de estudos para a avaliação do valor preditivo de *CITED-1* como biomarcador nos CPT.

A expressão de *CITED-1* parece estar associada à metilação e à mutação no gene *BRAF*. SASSA et al. (2011) analisaram o status de metilação do promotor de *CITED-1*, em linhagens celulares e espécimes de tecidos de CPT. Foi demonstrado que a hipometilação do promotor de *CITED-1*, está associada à hiperexpressão do RNAm, sugerindo uma regulação epigenética da expressão de *CITED-1* nos CPT. No entanto, existem outros fatores além do padrão de metilação de *CITED-1*, que estão associados à hiperexpressão do RNAm de *CITED-1*. Watanabe et al. (2009) relataram, que o silenciamento do gene *BRAF*, foi associado

a um aumento na expressão de *CITED-1*. Contudo, a metilação de um gene envolve vários fatores e a associação entre *CITED-1* e *BRAF* ainda precisa ser elucidada.

CITED-1 parece estar associado à transição epitélio-mesênquima (TEM). A relação de *CITED-1* e TEM parece estar associada à participação de *CITED-1* na via de sinalização de *TGF-β* (YAHATA et al., 2000). A via *TGF-β* atua na promoção de tumores epiteliais avançados e conduz a metástases, ao favorecer a TEM, a proliferação, a disseminação, a angiogênese e facilitar o escape do tumor da vigilância imune (CANTELLI et al., 2015). A jusante de *TGFβ*, *SMAD* e seu adaptador *CITED-1* regulam a característica amoeboidal das células de melanoma. O eixo de sinalização *TGFβ-SMAD-CITED1* induz a ligação de células de melanoma às células endoteliais, facilitando a colonização pulmonar e o crescimento metastático (KUMAR et al., 2017).

Nós investigamos as possíveis diferenças entre a expressão de *P300* e *CITED-1* em relação às características clinicopatológicas dos tumores. Uma diferença entre a expressão de *CITED-1* e o tamanho do tumor ($p = 0,016$), que é um importante fator prognóstico para os carcinomas de tireoide foi demonstrada.

Esses dados juntos sugerem que a expressão de *CITED-1* pode estar associada ao pior prognóstico nos carcinomas, sendo relacionada aos tumores com estágios mais avançados e a ocorrência de metástases. Portanto, *CITED-1* parece desempenhar um papel importante na condução do comportamento pro-metastático, o que o torna um candidato ideal como alvo para a intervenção farmacológica. A interrupção direta da atividade *CITED-1* ou a ablação de sua ligação a *P300* ou *SMAD4* pode ser uma boa oportunidade terapêutica para os CPT (CANTELLI et al., 2015).

É bem estabelecido que *CITED-1* interage com *P300*, através da ligação ao domínio CR2 do complexo *CBP/P300*. Essa interação é crucial para ambos os genes inclusive para o gene *CITED-1*, que é relacionado a respostas transcricionais específicas através de interações com outros fatores de transcrição, e também modifica essas respostas através da interação com os co-ativadores *CBP* e *P300* (PLISOV et al., 2005).

A correlação entre os níveis de expressão dos dois genes foi investigada por meio da Correlação de Pearson. No entanto, não foi encontrada correlação significativa entre os níveis de expressão dos genes analisados. Não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram a co-expressão desses dois fatores, contudo é bem estabelecido que os dois marcadores interagem fisicamente. Nossa hipótese inicial, era de que a expressão de *CITED-1*, era regulada pela interação com o co-ativador da transcrição *P300*. No entanto, isso não foi

observado. *P300* está relacionado à regulação de *CITED-1* e de vários outros genes e *CITED-1* é um co-fator específico da transcrição, que interage por duas vias específicas. Essa afirmação pode explicar em parte os nossos achados para os níveis de expressão de *CITED-1*, em detrimento de *P300*.

Outra hipótese está relacionada aos eventos de fosforilação de *CITED-1*. SHI et al., (2006), demonstraram que *CITED-1* existe tanto em formas não fosforiladas como pelo menos duas formas fosforiladas, e que os níveis de ambas as fosfoproteínas são regulados de forma independente ao longo do ciclo celular (SHI et al., 2006). O mecanismo pelo qual esses eventos de fosforilação influenciam a ligação a *P300* não é claro, pois todos esses sítios não são conhecidos. A fosforilação destes sítios pode alterar a conformação estrutural de *CITED-1* de uma forma que esconde os sítios de ligação a *P300* dentro do domínio CR2 (SHI et al., 2006). Shi et al., (2006) descreveu que a maioria das moléculas de *CITED-1* que interagem com *P300* está na forma não fosforilada. Isso sugere que a indução de fosforilação de *CITED-1* diminui a quantidade de *CITED-1* não fosforilado, disponível para interagir e ativar respostas dependentes de *P300* (SHI et al., 2006). No entanto, se esses eventos de fosforilação também regulam outras funções e interações de *CITED-1*, ainda não está claro.

As análises de expressão baseadas na quantificação do RNAm transcrito têm sido muito importantes para identificação de assinaturas moleculares, no entanto, devem ser aliadas ao estudo das proteínas (OU et al., 2008). Como unidades funcionais centrais em muitas vias biológicas complexas, as proteínas também são um assunto de muito interesse em várias áreas da medicina, incluindo descoberta de biomarcadores diagnósticos, descoberta de novas drogas e medicina personalizada (KOSTI et al., 2016).

O perfil de expressão gênica por PCR em tempo real oferece sensibilidade, rendimento e reprodutibilidade relativamente maior do que a análise proteica, com várias amostras analisadas em um período de tempo relativamente curto. No entanto, a análise por expressão gênica também possui limitações. Muitas vezes há uma correlação menor entre a expressão de genes e proteínas e as variações entre o nível de RNAm de um gene e a sua abundância de proteína podem ser altas, cerca de 30 vezes (OU et al., 2008). Além disso, importantes eventos de modificações pós-transcricionais, incluindo tradução de proteínas, modificação pós-tradução e degradação, podem influenciar o nível de uma proteína presente em um dado tecido e esses efeitos não são capturados por dados de expressão gênica (CHEN et al., 2002).

Nosso estudo apresentou algumas limitações que devem ser reconhecidas. O uso de tecidos tumorais e normais a fresco foi desafiador, visto que a molécula de RNA, principal foco dos testes, é facilmente degradada, então era necessário que após a coleta dos tecidos, o material fosse rapidamente congelado para a conservação e confecção de testes de boa qualidade. O laudo anatomopatológico deve estar claro, contendo as informações sobre a biópsia e o tipo do tumor, no entanto, alguns prontuários apresentavam-se sem os laudos, necessitando-se de buscas das informações que faltavam, e alguns destes casos não foram encontrados e não puderam ser avaliados. Nem todos os tumores coletados, caracterizavam-se como carcinomas papilares, alguns eram apenas bócios coloides ou outras variantes do carcinoma de tireoide e não foram incluídos no trabalho.

Os casos que não apresentaram tecido suficiente para as extrações e que não apresentaram resultados satisfatórios nos testes, também não foram incluídos no estudo. Estes fatores demonstram a perda de um número considerável de casos, totalizando 31 casos finais que puderam compor o corpo do trabalho.

Esses fatores nos mostraram a necessidade de orientação do grupo de pesquisa envolvido, tanto da coleta das amostras, bem como da execução dos testes e talvez a elaboração de um protocolo que abranja essas dificuldades e possa melhorar essas problemáticas, a fim de melhorar o número de amostras avaliadas em estudos posteriores.

Como perspectivas futuras sugerimos aliar ao estudo de expressão do gene por meio da PCR em tempo real, o estudo também das moléculas efetoras, as proteínas, por meio da utilização da técnica de imunohistoquímica. A hiperexpressão de CITED-1 nos CPT, associada a tumores em estágios mais avançados, nós mostra que se fazem necessários mais estudos que elucidem o papel de CITED-1 nos carcinomas papilares e que avaliem seu potencial uso como alvo terapêutico. Sugerimos ainda que estudos funcionais sejam desenvolvidos, a fim de elucidar tanto os mecanismos moleculares envolvidos no controle da expressão de CITED-1, como de P300.

6. CONCLUSÕES

1. Com base nos resultados obtidos neste estudo, foi possível concluir que a expressão diferencial de *P300* não foi observada nos CPT ($p = 0,481$).

2. Apesar de ser bem estabelecido que *CITED-1* e *P300* interagem fisicamente, não foi encontrada uma correlação entre os níveis de expressão dos dois genes analisados ($r = -0,057$) e ($p = 0,762$).

3. Uma associação positiva entre a hiperexpressão de *CITED-1* e os carcinomas papilíferos de tireoide ($p < 0,0001$) foi demonstrada neste estudo, bem como uma associação entre a hiperexpressão de *CITED-1* e o tamanho dos tumores ($p = 0,016$).

4. A hiperexpressão de *CITED-1* nos CPT sugere que o gene pode vir a compor o perfil de marcadores no CPT, e o fato de *CITED-1* estar associado ao tamanho tumoral em tumores em estágios mais avançados, o torna um candidato a alvo terapêutico nesses tumores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERO, A.; LOPÉZ, J. E.; TORRES, A.C.L.; MARTÍN, T. Effectiveness of chemotherapy in advanced differentiated thyroid cancer: a systematic review. **Endocrine-related cancer**, v. 23, n. 2, p. R71-R84, 2016.
- AL-BRAHIM, N.; ASA, L. Papillary thyroid carcinoma: an overview. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 130, n. 7, p. 1057-1062, 2006.
- AL-HUMADI, H. U.; ZARROS, A.; AL-SAIGH, R.L.; LIAPI, C. et al. Genetic basis and gene therapy trials for thyroid cancer. **Cancer Genomics-Proteomics**, v. 7, n. 1, p. 31-49, 2010.
- AMIN, MAHUL B.; EDGE, Stephen B. (Ed.). **AJCC cancer staging manual**. Springer, 2017.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures**. The Society, 2015.
- ARIGHI, E.; BORRELLO, M.G.; SARIOLA, H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 16, n. 4, p. 441-467, 2005.
- ARORA, N.; SCOGNAMIGLIO, T.; LUBITZ, C. C.; MOO, T. A. et al. Identification of borderline thyroid tumors by gene expression array analysis. **Cancer**, v. 115, n. 23, p. 5421-5431, 2009.
- BARRA, G. B.; VELASCO, L.F.R.; PESSANHA, R.P et al. Mecanismo Molecular da Ação do Hormônio Tireoideano. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 2004; 48(1): 25-39.
- BARNES, P. J.; ADCOCK, I. M.; ITO, K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. **European Respiratory Journal**, v. 25, n. 3, p. 552-563, 2005.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Fisiologia**. 6ª edição. Editora Elsevier. Rio de Janeiro. 2009.
- BRASIL, M. DA S. Câncer da glândula tireoide. In: **Estimativa\ 2018 Incidência de câncer no Brasil**. p. 47-48.
- CANTELLI, G.; ORGAZ, J.L.; RODRIGUEZ-HERNANDEZ, I.; KARAGIANNIS, P. et al. TGF- β -induced transcription sustains amoeboid melanoma migration and dissemination. **Current biology**, v. 25, n. 22, p. 2899-2914, 2015.
- CAPP, C.; ZENNIG, N.; WAJNER, S.; MAIA, A. L. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireóide. **Clinical & Biomedical Research**, v. 29, n. 1, 2009.
- CARVALHO, S.R.C. Avaliação molecular da ciclooxigenase-2 em carcinomas papilíferos de tireoide. **Tese de Mestrado - Pontifícia Universidade Católica de Goiás**. 2012.
- CHAUDHARY, V.; BANO, S. Imaging of the thyroid: Recent advances. **Indian J Endocrinol Metab**, 16(3): 371-376. 2012.

CHEN, G.; GHARIB, T. G.; HUANG, C. C.; TAYLOR, J. M. et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. **Molecular & cellular proteomics**, v. 1, n. 4, p. 304-313, 2002.

CHEN, J.; ST-GERMAIN, J.R.; LI, Q. B56 regulatory subunit of protein phosphatase 2A mediates valproic acid-induced p300 degradation. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 2, p. 525-532, 2005.

CHEN, YUN-JU.; WANG, YING-NAI.; CHANG, WEN-CHANG. ERK2-mediated C-terminal serine phosphorylation of p300 is vital to the regulation of epidermal growth factor-induced keratin 16 gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 37, p. 27215-27228, 2007.

CHEN, J; LI, Q. Life and death of transcriptional co-activator p300. **Epigenetics**, v. 6, n. 8, p. 957-961, 2011.

CORBOY, M.J.; THOMAS, P.J.; WIGLEY, W. C. Aggresome formation. **Ubiquitin-Proteasome Protocols**, p. 305-327, 2005.

CIAMPI, R.; NIKIFOROV, Y. E. RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. **Endocrinology**, v. 148, n. 3, p. 936-941, 2007.

CZARNIECKA, A.; OCZKO-WOJCIECHOWSKA, M.; BARCZYŃSKI, M. BRAF V600E mutation in prognostication of papillary thyroid cancer (PTC) recurrence. **Gland surgery**, v. 5, n. 5, p. 495, 2016.

DELELLIS, R.A.; LLOYD, R.V.; HEITZ, P.U. et al. (Eds). World Health Organization Classification of Tumours. **Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs**. IARC Press, Lyon, France, Vol. 8, 2004.

DEKKER, Frank J.; HAISMA, Hidde J. Histone acetyl transferases as emerging drug targets. **Drug discovery today**, v. 14, n. 19-20, p. 942-948, 2009.

DIETRICH, J.W.; LANDGRAFE, G; FOTIADOU, E.H. TSH and thyrotropic agonists: key actors in thyroid homeostasis. **Journal of thyroid research**, v. 2012, 2012.

DILLON, R. L.; BROWN, S. T.; LING, C.; SHIODA, T.; MULLER, W. J. An EGR2/CITED1 transcription factor complex and the 14-3-3 σ tumor suppressor are involved in regulating ErbB2 expression in a transgenic-mouse model of human breast cancer. **Molecular and cellular biology**, v. 27, n. 24, p. 8648-8657, 2007.

DIRINCK, E.; DIRTU, A. C.; MALARVANNAN, G. et al. A preliminary link between hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls and free thyroxin in humans. **International journal of environmental research and public health**, v. 13, n. 4, p. 421, 2016.

FELSENFELD, A. J.; LEVINE, B. S. Calcitonin, the forgotten hormone: does it deserve to be forgotten?. **Clinical kidney journal**, v. 8, n. 2, p. 180-187, 2015.

GALVÃO, T.N.; CASTRO, D.T.; MATUO, R. Câncer da tireoide causado por efeitos biológicos da radiação ionizante. **IJC Radio**. 2017.

GERSTNER, J.R.; LANDRY, C.F. Expression of the transcriptional coactivator CITED1 in the adult and developing murine brain. **Developmental neuroscience**, v. 29, n. 3, p. 203-212, 2007.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. Cecil: **Tratado de Medicina Interna**. 22ª edição. Editora Elsevier. 2005.

GIUSTI, F., FALCHETTI, A., FRANCESCHELLI, ET AL. Thyroid cancer: current molecular perspectives. **Journal of oncology**, v. 2010, 2010.

GROSSMAN, S.R.; DEATO, M.E.; BRIGNONE, C.; CHAN, H. M. et al. Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. **Science**, v. 300, n. 5617, p. 342-344, 2003.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12ª edição. Editora ELSEVIER. Rio de Janeiro. 2011.

HASSAN, A.; SIDDIQUI, M.; JAHANGIR, S. A rare case of medullary carcinoma thyroid metastasizing to bilateral breast parenchyma. **Nuclear Medicine Review**, v. 19, n. B, p. 17-19, 2016.

HEERBOTH, S.; LAPINSKA, K.; SNYDER, N.; LEARY, M.; ROLLINSON, S.; SARKAR, S. Use of epigenetic drugs in disease: an overview. **Genetics & epigenetics**, v. 6, p. GEG. S12270, 2014.

HENRY, R.A.; KUO, YIN-MING; ANDREWS, A.J. Differences in specificity and selectivity between CBP and p300 acetylation of histone H3 and H3/H4. **Biochemistry**, v. 52, n. 34, p. 5746-5759, 2013.

HOLMQVIST, P.; MANNERVIK, M. Genomic occupancy of the transcriptional co-activators p300 and CBP. **Transcription**, v. 4, n. 1, p. 18-23, 2013.

HOWLIN, J.; MCBRYAN, J.; NAPOLETANO, S.; LAMBE, T. et al. CITED1 homozygous null mice display aberrant pubertal mammary ductal morphogenesis. **Oncogene**, v. 25, n. 10, p. 1532-1542, 2006.

HUANG, Y.; PRASAD, M.; LEMON, W.J.; et al: Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98(26):15044, 2001.

IGLESIAS, M. L.; SCHMIDT, A.; GHUZLAN, A. A.; LACROIX, L. et al. Radiation exposure and thyroid cancer: a review. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 61, n. 2, p. 180-187, 2017.

IYER, N. G.; ÖZDAG, H.; CALDAS, C. p300/CBP and cancer. **Oncogene**, v. 23, n. 24, p. 4225-4231, 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara , 2013.

KARANAM, B.; JIANG, L.; WANG, L.; KELLEHER, N. L.; COLE, P. A. Kinetic and mass spectrometric analysis of p300 histone acetyltransferase domain autoacetylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 40292-40301, 2006.

KARUKURICHI, K.R.; COLE, P.A. Probing the reaction coordinate of the p300/CBP histone acetyltransferase with bisubstrate analogs. **Bioorganic chemistry**, v. 39, n. 1, p. 42-47, 2011.

KATOH, H.; YAMASHITA, K.; ENOMOTO, T.; WATANABE, M. Classification and general considerations of thyroid cancer. **Ann Clin Pathol**, v. 3, n. 1, p. 1045, 2015.

KONDO, T.; EZZAT, S.; ASA, S. L. Pathogenetic Mechanisms in thyroid follicular – cell neoplasia. **Nature Reviews**. 2006; 6: 292-306.

KRAMER, J.M. Epigenetic regulation of memory: implications in human cognitive disorders. **Biomolecular concepts**, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2013.

KOSTI, I.; JAIN, N.; ARAN, D.; BUTTE, A. J.; SIROTA, M. KOSTI, Idit et al. Cross-tissue analysis of gene and protein expression in normal and cancer tissues. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

KUMAR, D.; GORAIN, M.; KUNDU, G.; KUNDU, G.C. Therapeutic implications of cellular and molecular biology of cancer stem cells in melanoma. *Molecular cancer*, v. 16, n. 1, p. 7, 2017.

LIAO, Z.W.; ZHOU, T.C.; TAN, X.J.; SONG, X.L. et al. High expression of p300 is linked to aggressive features and poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma. **Journal of translational medicine**, v. 10, n. 1, p. 110, 2012.

LISKA, J.; ALTANEROVA, V.; GALBAVY, S.; STVRTINA, S.; BRTKO, J. Thyroid tumors: histological classification and genetic factors involved in the development of thyroid cancer. **Endocrine regulations**, v. 39, n. 3, p. 73-83, 2005.

LOPES, J.P.R.C. Mutação do gene BRAF na história natural do carcinoma papilar da tireoide: implicações diagnósticas e prognósticas. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Medicina – Universidade do Porto, 2011.

LOVVORN, H. N.; BOYLE, S.; SHI, G.; SHYR, Y. et al. Wilms' tumorigenesis is altered by misexpression of the transcriptional co-activator, CITED1. **Journal of pediatric surgery**, v. 42, n. 3, p. 474-481, 2007.

MAKAZLIEVA, T.; VASKOVA, O.; MAJSTOROV, V. Etiopathogenesis of Differentiated Thyroid Carcinomas. **Open access Macedonian journal of medical sciences**, v. 4, n. 3, p. 517, 2016.

MAKSIMOSKA, J.; SEGURA-PEÑA, D.; COLE, P. A.; MARMORSTEIN, R. Structure of the p300 histone acetyltransferase bound to acetyl-coenzyme A and its analogues. **Biochemistry**, v. 53, n. 21, p. 3415-3422, 2014.

MANOLE, D.; SCHILDKNECHT, B.; GOSNELL, B.; ADAMS, E.; DERWAHL, M. Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 3, p. 1072-1077, 2001.

MAROTTA, V.; SCIAMMARELLA, C.; COLAO, A.; FAGGIANO, A. Application of molecular biology of differentiated thyroid cancer for clinical prognostication. **Endocrine-related cancer**, v. 23, n. 11, p. 499-515, 2016.

MARTINS, E.A.C.; MACIEL, F., P.R. Mecanismos de expressão gênica em eucariotos. **Revista da Biologia**, 2010.

MCCUBREY, J. A.; STEELMAN, L. S.; CHAPPELL, W. H.; ABRAMS, S. L. et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 8, p. 1263-1284, 2007.

MIFTARI, R.; TOPÇIU, V.; NURA, A.; HAXHIBEQIRI, V. Management of the Patient with Aggressive and Resistant Papillary Thyroid Carcinoma. **Medical Archives**, v. 70, n. 4, p. 314, 2016.

MOHAMMADI, M.; HEDAYATI, Mehdi. A Brief Review on The Molecular Basis of Medullary Thyroid Carcinoma. **Cell Journal (Yakhteh)**, v. 18, n. 4, p. 485, 2017.

NAIR, S. S.; CHAUBAL, V. A.; SHIODA, T.; COSER, K. R.; MOJAMDAR, M. Over-expression of MSG1 Transcriptional Co- activator Increases Melanin in B16 Melanoma Cells: A Possible Role for MSG1 in Melanogenesis. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 14, n. 3, p. 206-209, 2001.

PATEL, K. N.; SINGH, B. Genetic Considerations in Thyroid Cancer. **Cancer Control**. 2006; 13(2): 111-118.

PEZZI, T. A.; MOHAMED, A. S.; SHEU, T.; BLANCHARD, P. et al. Radiation therapy dose is associated with improved survival for unresected anaplastic thyroid carcinoma: Outcomes from the National Cancer Data Base. **Cancer**, v. 123, n. 9, p. 1653-1661, 2017.

PLISOV, S., TSANG, M., SHI, G., BOYLE, S. et al. CITED1 is a bifunctional transcriptional cofactor that regulates early nephronic patterning. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 6, p. 1632-1644, 2005.

POIZAT, C.; PURI, P.L.; BAI, Y.; KEDES, L. Phosphorylation-dependent degradation of p300 by doxorubicin-activated p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac cells. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 7, p. 2673-2687, 2005.

PRASAD, M.L.; PELLEGATA, N.S.; KLOOS, R.T.; BARBACIORU, C. et al. CITED1 protein expression suggests papillary thyroid carcinoma in high throughput tissue microarray-based study. **Thyroid**, v. 14, n. 3, p. 169-175, 2004.

PRASAD, M. L.; PELLEGGATA, N. S.; HUANG, Y.; NAGARAJA, H. N. ET AL. Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors. **Modern Pathology**, v. 18, n. 1, p. 48-57, 2005.

OU, K., YU, K.; KESUMA, D.; HOOL, M. et al. Novel breast cancer biomarkers identified by integrative proteomic and gene expression mapping. **Journal of proteome research**, v. 7, n. 4, p. 1518-1528, 2008.

RAO, X.; HUANG, X.; ZHOU, Z.; LIN, X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. **Biostatistics, bioinformatics and biomathematics**, v. 3, n. 3, p. 71, 2013.

REZEK, A.J. J. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
RODRIGUEZ, T. A.; SPARROW, D.B.; SCOTT, A.N.; WITHINGTON, S.L. et al. CITED1 is required in trophoblasts for placental development and for embryo growth and survival. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 1, p. 228-244, 2004.

ROTTE, A.; BHANDARU, M.; CHENG, Y.; SJOESTROEM, C.; MARTINKA, M. Decreased expression of nuclear p300 is associated with disease progression and worse prognosis of melanoma patients. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e75405, 2013.

SADDI, V.A. Detecção de HPV e Identificação de Genes hiper-expressos em Adenocarcinomas de colo uterino. **Tese de Doutorado**. Programa de Fisiologia Humana. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, 2004.

SASSA, M.; HAYASHI, Y.; WATANABE, R.; KIKUMORI, T. et al. Aberrant promoter methylation in overexpression of CITED1 in papillary thyroid cancer. **Thyroid**, v. 21, n. 5, p. 511-517, 2011.

SCOGNAMIGLIO, T.; HYJEK, E.; KAO, J.; CHEN, Y. T. Diagnostic usefulness of HBME1, galectin-3, CK19, and CITED1 and evaluation of their expression in encapsulated lesions with questionable features of papillary thyroid carcinoma. **American journal of clinical pathology**, v. 126, n. 5, p. 700-708, 2006.

SHI, D.; POP, M. S.; KULIKOV, R.; LOVE, I. M.; KUNG, A. L.; GROSSMAN, S. R. CBP and p300 are cytoplasmic E4 polyubiquitin ligases for p53. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 38, p. 16275-16280, 2009.

SIPOS, J. A.; MAZZAFERRI, E. L. Thyroid Cancer Epidemiology and Prognostic Variables. **Clinical Oncology**. 2010; 22: 395.

SCHULTEN, H. J; SALAMA, S.; AL-AHMADI, A. et al. Comprehensive survey of HRAS, KRAS, and NRAS mutations in proliferative thyroid lesions from an ethnically diverse population. **Anticancer research**, v. 33, n. 11, p. 4779-4784, 2013.

SHI, G.; BOYLE, S. C.; SPARROW, D. B.; DUNWOODIE, S. L.; SHIODA, T.; DE CAESTECKER, M. P. The transcriptional activity of CITED1 is regulated by phosphorylation in a cell cycle-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 37, p. 27426-27435, 2006.

SHIODA, T.; FENNER, M.H.; ISSELBACHER, K.J. msg1, a novel melanocyte-specific gene, encodes a nuclear protein and is associated with pigmentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 22, p. 12298-12303, 1996.

SHIODA, T.; FENNER, M.H.; ISSELBACHER, K.J. MSG1 and its related protein MRG1 share a transcription activating domain. **Gene**, v. 204, n. 1, p. 235-241, 1997.

SHIODA, T., LECHLEIDER, R. J., DUNWOODIE, S. L., LI, H., YAHATA, T. et al. Transcriptional activating activity of Smad4: roles of SMAD hetero-oligomerization and enhancement by an associating transactivator. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 17, p. 9785-9790, 1998.

SUN, W.; LAN, X.; ZHANG, H.; DONG, W.; WANG, Z.; HE, L. et al. Risk Factors for central lymph node metastasis in CN0 papillary thyroid carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0139021, 2015.

SUZUKI, K.; MITSUTAKE, N.; SAENKO, V.; YAMASHITA, S. Radiation signatures in childhood thyroid cancers after the Chernobyl accident: possible roles of radiation in carcinogenesis. **Cancer science**, v. 106, n. 2, p. 127-133, 2015.

TANG, K.; LEE, Chen-Hsen. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 73, n. 3, p. 113-128, 2010.

THOMPSON, P. R.; WANG, D.; WANG, L.; FULCO, M.; PEDICONI, N. et al. Regulation of the p300 HAT domain via a novel activation loop. **Nature structural & molecular biology**, v. 11, n. 4, p. 308-315, 2004.

TRONKO, M. D.; HOWE, G.R.; BOGDANOVA, T. I. et al. A cohort study of thyroid cancer and other thyroid diseases after the Chernobyl accident: thyroid cancer in Ukraine detected during first screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 13, p. 897-903, 2006.

VAISMAN, M.; ROSENTHAL, D.; CARVALHO, D.P. Enzymes involved in thyroid iodide organification. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 1, p. 9-15, 2004.

VOGELSTEIN, B., PAPADOPOULOS, N., VELCULESCU, V. E. et al. Cancer genome landscapes. **science**, v. 339, n. 6127, p. 1546-1558, 2013.

WARD, L.S. Epidemiologia do Câncer da Tireóide no Brasil: Apontando Direções na Política de Saúde do País. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 49(4):474, 2005.

WARD, L. S.; ASSUMPCÃO, L.V. Câncer diferenciado da tiroide: fatores prognósticos e tratamento. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2004.

WATANABE, R., HAYASHI, Y., SASSA, M., KIKUMORI, T. et al. Possible involvement of BRAFV600E in altered gene expression in papillary thyroid cancer. **Endocrine journal**, v. 56, n. 3, p. 407-414, 2009.

WANG, F.; MARSHALL, C.B.; IKURA, M. Transcriptional/epigenetic regulator CBP/p300 in tumorigenesis: structural and functional versatility in target recognition. **Cellular and molecular life sciences**, v. 70, n. 21, p. 3989-4008, 2013.

WANG, L.; TANG, Y.; COLE, P. A. Marmorstein, R. Structure and chemistry of the p300/CBP and Rtt109 histone acetyltransferases: implications for histone acetyltransferase evolution and function. **Current opinion in structural biology**, v. 18, n. 6, p. 741-747, 2008.

WANG, S.A.; HUNG, C. Y.; CHUANG, J. Y.; CHANG, W.C. et al. Phosphorylation of p300 increases its protein degradation to enhance the lung cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 6, p. 1135-1149, 2014.

WENDLER, J.; KROISS, M.; GAST, K. et al. Clinical presentation, treatment and outcome of anaplastic thyroid carcinoma: Results of a multicenter study in Germany. **European journal of endocrinology**, v. 175, n. 6, p. 521-529, 2016.

WERNER, B.; CAMPOS, A C., NADJI, M.; TORRES, L.F. B. Uso prático da imunohistoquímica em patologia cirúrgica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 5, p. 353-364, 2005.

XAVIER, A. M.; LIMA, A.G.D.; VIGNA, C. R. M.; VERBI, F. M. et al. Marcos da história da radioatividade e tendências atuais. **Química Nova**, 2007.

XUE, F.; LI, D.; HU, C.; WANG, Z.; HE, X.; WU, Y. Application of intensity-modulated radiotherapy in unresectable poorly differentiated thyroid carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 9, p. 15934, 2017.

YAHATA, T.; DE CAESTECKER, M. P.; LECHLEIDER, R. J.; ANDRIOLE, S. et al. The MSG1 non-DNA-binding transactivator binds to the p300/CBP coactivators, enhancing their functional link to the Smad transcription factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 12, p. 8825-8834, 2000.

YAHATA, T.; SHAO, W.; ENDOH, H.; HUR, J. et al. Selective coactivation of estrogen-dependent transcription by CITED1 CBP/p300-binding protein. **Genes & development**, v. 15, n. 19, p. 2598-2612, 2001.

YI, KA HEE. The revised 2016 Korean Thyroid Association guidelines for thyroid nodules and cancers: differences from the 2015 American Thyroid Association guidelines. **Endocrinology and Metabolism**, v. 31, n. 3, p. 373-378, 2016.

YU, G. P.; LI, J. C. L.; BRANOVAN, D.; MCCORMICK, S.; SCHANTZ, S. P. Thyroid cancer incidence and survival in the national cancer institute surveillance, epidemiology, and end results race/ethnicity groups. **Thyroid**, v. 20, n. 5, p. 465-473, 2010.

ZABEL, E. W.; ALEXANDER, B. H.; MONGIN, S. J. et al: Thyroid cancer and employment as a radiologic technologist. **International journal of cancer**, v. 119, n. 8, p. 1940-1945, 2006.

ZANELLA, A.B.; MEYER, E.L.; BALZAN, L.; SILVA, A.C. et al. Thyroglobulin measurements in washout of fine needle aspirates in cervical lymph nodes for detection of papillary thyroid cancer metastases. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 54, n. 6, p. 550-554, 2010.

ANEXO A: PARECER CONSUBSTANCIADO ÉTICO

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE
AO CÂNCER EM GOIÁS -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE BRAF, CITED-1, P300 E IGFBP7 EM CARCINOMAS PAPILÍFEROS DE TIREÓIDE

Pesquisador: Wilmar José Manoel

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 36385214.1.0000.0031

Instituição Proponente: ACCG - Hospital Araújo Jorge

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE GOIÁS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 867.323

Data da Relatoria: 02/10/2014

Apresentação do Projeto:

O câncer de tireóide é o tumor maligno mais comum do sistema endócrino, representando cerca de 1% de todas as neoplasias malignas humanas. O carcinoma papilífero de tireóide (CPT) é o tipo histológico mais comum, sendo responsável por 80-90% de todos os cânceres de tireóide. Alterações genéticas envolvendo a via da MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) são frequentemente demonstradas em carcinomas de tireóide, como o rearranjo RET/PTC e mutações nos genes RAS e BRAF. Mais de 90% das mutações no gene BRAF são resultados da transversoão T1799A, resultando na mutação BRAFV600E. Essa mutação, presente em cerca de 50% dos CPT, está relacionada com características clinicopatológicas agressivas e taxas elevadas de recorrência. A hiperexpressão de CITED-1 e p300, proteínas envolvidas na regulação de diversos fatores transcricionais, tem sido evidenciada em diversos tumores, incluindo os CPT. Apesar de poucos dados, evidências sugerem a relação entre a expressão dessas proteínas com a mutação BRAFV600E. Recentes estudos demonstram que a mutação BRAFV600E também age reprimindo a expressão do IGFBP7, um gene supressor tumoral descrito em vários tipos de cânceres, incluindo o CPT. A perda de expressão do IGFBP7 é uma etapa crítica no desenvolvimento tumoral. Entretanto, apesar dos inúmeros estudos sobre o tema, poucos trabalhos tem investigado a expressão diferencial de mRNAs e proteínas resultantes da mutação BRAFV600, assim como sua correlação

Endereço: 239

Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITARIO

CEP: 74.605-070

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3243-7050

Fax: (62)3243-7050

E-mail: cepaccg@accg.org.br

Continuação do Parecer: 857.323

com CITED-1, p300 e IGFBP7. O objetivo desse estudo consiste em avaliar a expressão gênica de BRAF, CITED-1, p300 e IGFBP7 em carcinomas papilíferos de tireóide, por meio de análises de DNA, mRNAs e proteínas, e as possíveis associações entre esses genes e os aspectos clinicopatológicos desses tumores. O presente projeto de pesquisa será desenvolvido no Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia e Setor de Anatomia Patológica da Associação de Combate ao Câncer em Goiás do Hospital Araújo Jorge, que possui todos os equipamentos e a estrutura necessária para realização dos experimentos. Os reagentes e insumos necessários serão adquiridos por meio de verba advinda da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (Fapeg), visto que o presente projeto de pesquisa foi contemplado na chamada pública nº 05/2012 (Fapeg/Universal). Como metodologia serão selecionados 30 casos de CPT de pacientes diagnosticados e submetidos à cirurgia no Hospital Araújo Jorge (HAJ), a partir da aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa. Os pacientes a serem incluídos devem apresentar dados clínicos e histopatológicos satisfatórios, além de amostras de tecido normal e tumoral disponíveis para extração de DNA e RNA. A confirmação do diagnóstico de CPT e a separação do tecido normal e tumoral deverão ser feitas no Serviço de Anatomia Patológica do HAJ. A seleção dos casos será feita pelos cirurgiões do Serviço de Cabeça e Pescoço. Os colaboradores do projeto serão responsáveis pelo contato com o paciente e aplicação do TCLE, antes da cirurgia para remoção do tumor. Imediatamente após a cirurgia, o espécime enviado ao Setor de Anatomia Patológica deverá ser avaliado para separação do tecido normal e tumoral. Os fragmentos de tecido devidamente identificados serão congelados em nitrogênio líquido e posteriormente transferidos para freezer -80°C no Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia até o processamento para as análises moleculares. Os tecidos remanescentes no Setor de Anatomia Patológica serão fixados em formol e processados em parafina para análise histopatológica convencional e análise imuno-histoquímica. A separação do tecido para análise molecular deverá acontecer somente quando o material disponível for suficiente, sem comprometer a análise histopatológica. As amostras biológicas utilizadas nesse projeto serão depositadas e armazenadas como biorrepositório no Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia do Hospital Araújo Jorge, sob a responsabilidade da coordenadora do laboratório, Dra. Vera Aparecida Saddi, seguindo as Resoluções nº 347/2005 e 441/2011 do Conselho Nacional de Saúde e Portaria nº 2.201/2011 do Ministério da Saúde. Os dados clinicopatológicos serão colhidos dos respectivos prontuários e utilizados para a confecção de um banco de dados. Extração do DNA: As amostras de tecidos congelados em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C serão colocadas em microtubos à temperatura ambiente até o processamento. A extração de DNA das amostras teciduais utilizará o KIT comercial de purificação

Endereço: 239

Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITARIO CEP: 74.605-070

UF: GO Município: GOIANIA

Telefone: (62)3243-7050 Fax: (62)3243-7050 E-mail: cepaccg@accg.org.br

Continuação do Parecer: 857.323

do material genômico Pure Link Invitrogen® (Invitrogen, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Análise da mutação – sequenciamento gênico: A análise da mutação BRAFV600E será realizada por meio da técnica de sequenciamento de DNA automatizado, no Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia do Hospital Araújo Jorge. Extração do RNA: O RNA total será extraído das amostras teciduais congeladas em nitrogênio líquido usando o reagente TRIZOL (Invitrogen). A análise dos níveis de expressão gênica será expressa como média \pm desvio padrão. As análises serão realizadas com o uso do teste t de Student. A correlação entre os níveis de expressão gênica será analisada pelo método do Coeficiente de Correlação de Pearson. Também será utilizado o teste de regressão linear simples, múltiplo e logístico para determinar possíveis relações e correlações entre as co-variáveis investigadas. Para as análises comparativas das variáveis qualitativas serão utilizados os testes exato de Fisher e Qui-quadrado. Os dados obtidos serão armazenados em uma planilha do Software Microsoft Excel® (Microsoft Corp., EUA), junto com os dados de prontuários clínicos dos pacientes estudados. Todos os cálculos estatísticos serão efetuados com auxílio do programa estatístico SPSS (versão 17.0, SPSS Inc., EUA), utilizando o intervalo de confiança de 95%. Assim, a hipótese desse estudo é que a expressão do mRNA e da proteína BRAF seja influenciada pela mutação BRAFV600E, presente em cerca de 50% dos casos de CPT. Espera-se ainda que a expressão de BRAFV600E esteja associada positivamente com CITED-1 e p300 e que essa mutação iniba a expressão do IGFBP7, o que resultaria numa proliferação descontrolada e aspectos clinicopatológicos mais agressivos dos CPT.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a expressão dos genes BRAF, CITED-1, p300 e IGFBP7 em carcinomas papilíferos de tireóide, visando esclarecer as possíveis associações entre esses genes e os aspectos clínico-patológicos desses tumores.

Objetivos Secundários:

- 1) Avaliar a presença da mutação BRAFV600E em 30 casos de CPT colhidos a fresco e congelados em nitrogênio líquido.
- 2) Comparar a expressão diferencial do mRNA de BRAF (mutado e selvagem) e do CITED-1, p300 e IGFBP7 em 30 casos de CPT em relação aos tecidos tireoidianos normais (correlatos), colhidos a fresco e congelados em nitrogênio líquido.
- 3) Investigar as possíveis associações entre a expressão do mRNA de BRAF (mutado e selvagem) e CITED-1, p300 e IGFBP7 nos 30 casos de CPT e 30 tecidos tireoidianos normais (correlatos).
- 4) Investigar as possíveis associações entre a imunodeteção de BRAF, CITED-1, p300 e IGFBP7 e os

Endereço: 239
Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITARIO CEP: 74.605-070
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3243-7050 Fax: (62)3243-7050 E-mail: cepaccg@accg.org.br

Continuação do Parecer: 857.323

aspectos clinicopatológicos dos CPT.

5)Evidenciar as principais alterações em níveis de DNA, RNA e proteína decorrentes da mutação BRAFV600E em tumores mutados, não mutados e em tecidos normais adjacentes.

6)Contribuir para melhor elucidação da via de sinalização da MAPK e outras vias correlatas e seu papel na tumorigênese papilífera tireoidiana.

7)Propor possíveis marcadores diagnósticos e terapêuticos envolvidos na carcinogênese tireoidiana.

8)Promover e incentivar o desenvolvimento científico regional por meio de qualificação profissional e treinamentos metodológicos.

9)Contribuir para formação acadêmica e profissional dos envolvidos no projeto, com reflexos na melhora no atendimento, diagnóstico e tratamento de pacientes com carcinoma de tireóide, por meio da inserção de possíveis novas ferramentas diagnósticas, discussão de novos parâmetros terapêuticos e constante atualização científica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

- Não são previstos riscos ou transtornos evidentes aos sujeitos que participarem do estudo, uma vez que a cirurgia a que serão submetidos deve ter sido previamente prescrita pelo cirurgião de cabeça e pescoço, em função do diagnóstico de carcinoma de tireóide, a partir da análise clínica, citológica e de imagem. Entretanto, caso o sujeito da pesquisa se sinta incomodado durante a entrevista com o pesquisador e a aplicação do TCLE, a entrevista será paralisada e suspensa, até que ele se sinta mais confortável e disposto a continuar o processo. A fim de garantir a integridade do material usado no diagnóstico histopatológico, os casos a serem utilizados na pesquisa serão somente aqueles cuja quantidade de tumor e tecido normal forem suficientes.

Benefícios:Espera-se com o desenvolvimento deste projeto, uma contribuição para melhor elucidação da via de sinalização da MAPK e outras vias correlatas e seu papel na tumorigênese do carcinoma papilífero tireoidiano. Tais resultados permitirão um conhecimento mais detalhado da expressão gênica nesse tipo tumoral, assim como os efeitos clínicos relacionados, permitindo assim um planejamento terapêutico mais adequado que possa beneficiar os pacientes já comprometidos com a doença. Assim, a identificação de mecanismos moleculares poderá beneficiar futuros pacientes, sugerindo novos protocolos terapêuticos e diagnósticos, reduzindo os custos do modo, o papel da proteína p300 ainda não está elucidado em CPT. Apesar de ser alvo

Endereço: 239
Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITARIO CEP: 74.605-070
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3243-7050 Fax: (62)3243-7050 E-mail: cepaccg@accg.org.br

Continuação do Parecer: 857.323

de diversos estudos, não há dados na literatura da expressão dessa proteína, assim como correlações com fatores clinicopatológicos, nesse tipo tumoral.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto apresenta proposta inovadora no campo de genética do tumor papilífero de tireóide, buscando explicações genéticas para as manifestações clínicas que possam fornecer subsídios para pesquisa e novos tratamentos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos completos entregues. TCLE inteligível.

Recomendações:

Não se aplica no momento, tendo em vista o projeto bem delineado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer acatado. Aprovado

GOIANIA, 11 de Novembro de 2014

Assinado por:
Adriano de Paula
(Coordenador)

Endereço: 239
Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITARIO CEP: 74.605-070
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3243-7050 Fax: (62)3243-7050 E-mail: cepaccg@accg.org.br

ANEXO B: QUANTIFICAÇÃO DO CDNA APÓS A TRANSCRIÇÃO REVERSA

<i>Amostras de cDNA</i>	<i>Normal (ng/μL)</i>	<i>Tumor (ng/μL)</i>
N1	1.367,3	1.362,7
N2	1.371,8	1.325,3
N3	1.314,5	1.330,3
N4	1.314,8	1.328,2
N5	1.333,9	1.298,7
N6	1.379,7	1.274,4
N7	1.369,2	1.311,5
N8	1.331,9	1.380,3
N9	1.289,2	1.205,3
N10	1.272,3	1.324,5
N11	1.376,4	1.356,0
N12	1.337,6	1.350,2
N13	1.344,4	1.343,6
N14	1.067,1	1.320,8
N15	1.228,0	1.100,0
N16	1.247,0	1.127,0
N17	1.182,0	1.260,0
N18	1.261,0	1.383,0
N19	1.198,0	1.263,0
N20	1289,5	1.295,7
N21	1.218,7	1.249,5
N22	1.246,2	1.053,2
N23	1.290,1	1.275,2
N24	1.170,1	1.287,0
N25	663,9	662,8
N26	662,1	727,9
N27	669,2	652,3
N28	663,6	660,3
N29	665,8	672,8
N30	653,7	674,7
N31	678,2	655,1

ANEXO C: CONCENTRAÇÃO DE RNA NAS AMOSTRAS NORMAIS E TUMORAIS

	RNA – NORMAL	RNA – TUMOR
Amostras	Concentração de RNA (ng/μL)	Concentração de RNA (ng/μL)
N1	1.126	2.016
N2	116	567
N3	264	1.530
N4	528	471
N5	357	972
N6	495	2.510
N7	405	704
N8	702	377
N9	944	963
N10	1.020	3.386
N11	218	749
N12	815	2.450
N13	370	671
N14	848	898
N15	1179	1194
N16	470	547
N17	734	1283
N18	708	2037
N19	444	550
N20	412	2011
N21	430	836
N22	782	603
N23	479	2571
N24	452	753
N25	433,5	624
N26	891,1	133,5
N27	578,2	1874,75
N28	450,6	674,5
N29	1846,9	886,8
N30	1360	1803,5
N31	1355,9	2153,3