



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Leonardo Prado Stuchi

**Expressão dos Genes *VEGFA* e *NFE2L2* e
Regulação por MicroRNAs em Câncer Papilífero
de Tireoide**

São José do Rio Preto
2017

Leonardo Prado Stuchi

**Expressão dos Genes *VEGFA* e *NFE2L2* e
Regulação por MicroRNAs em Câncer Papilífero
de Tireoide**

**Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio
Preto para obtenção do Título de
Doutor no Curso de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde.**

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo

**São José do Rio Preto
2017**

Stuchi, Leonardo Prado

Expressão dos Genes *VEGFA* e *NFE2L2* e Regulação por MicroRNAs
em Câncer Papilífero de Tireoide/ Leonardo Prado Stuchi

São José do Rio Preto, 2017.

68 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto –
FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eny Maria Goloni Bertollo

1. Câncer de tireoide; 2. Bócio; 3. Fator de crescimento endotelial vascular;
4. Fator 2 relacionado a NF-E2; 5. MicroRNAs.

LEONARDO PRADO STUCHI

**Expressão dos Genes *VEGFA* e *NFE2L2* e Regulação por MicroRNAs
em Câncer Papilífero de Tireoide**

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientadora: Eny Maria Goloni Bertollo

Examinador: Marília de Freitas Calmon Saiki

Examinador: Ana Paula Girol

Examinador: João Armando Padovani Júnior

Examinador: Érika Cristina Pavarino

Suplentes: Márcia Maria Urbanin Castanhole-Nunes

Atílio Maximino Fernandes

São José do Rio Preto, 29/11/2017

Sumário

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
EPÍGRAFE	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS E QUADROS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vii
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Tireoide	2
1.2 Bócio Coloide e Câncer Papilífero.....	3
1.3 Angiogênese e os genes <i>NFE2L2</i> e <i>VEGFA</i> em tireoide.	8
1.4 MicroRNAs e Câncer de Tireoide	15
1.5 Objetivos	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS	22
2.1 Considerações Éticas.....	22
2.2 Amostras	23
2.3 Predição computacional de miRs.	23
2.4 Análise de expressão dos genes <i>NFE2L2</i> e <i>VEGFA</i> e dos miR-17-5p e miR-612.	23
2.5 Quantificação e expressão proteica das amostras de tecido.....	24
2.5.1 Quantificação da proteína VEGFA por Ensaio Imunoenzimático (ELISA) ..	24
2.5.2 Imuno-histoquímica das amostras de tecido para a proteína NFE2L2.....	25
2.6 Linhagem Celular	26
2.7 Transfecção dos miRs na linhagem celular TPC-1	26
2.8 Análise Estatística.....	27
3. RESULTADOS	30
3.1 Caracterização das amostras.	30
3.2 Expressão do RNAm dos genes <i>VEGFA</i> e <i>NFE2L2</i> e dos miR-17-5p e miR-612 nas amostras de tecido fresco.	30
3.3 Correlação entre a expressão dos genes <i>VEGFA</i> e <i>NFE2L2</i> e dos miR-17-5p e miR-612.	35
3.4 Expressão Proteica do VEGFA e NFE2L2 nos tecidos	36
3.4.1 Expressão proteica de VEGFA.	36
3.4.2 Expressão proteica de Nrf2.	37
3.5 Transfecção celular.....	39
3.5.1 Ensaio de superexpressão do miR-612 em linhagem celular TPC-1	39
3.5.2 Ensaio de inibição do miR-17-5p em linhagem celular TPC-1	39
4. DISCUSSÃO	42
5. CONCLUSÕES	51
6. REFERÊNCIAS	53
7. ANEXOS	66

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese primeiramente a Deus que sempre esteve e está ao meu lado nos momentos difíceis e alegres me abençoando com saúde, paz e discernimento para enfrentar os obstáculos de uma forma serena e principalmente com amor.

Dedico também aos meus pais Roberto e Elizabeth pelo amor incondicional, pelo apoio e por sempre mostrar o caminho justo, honesto e amor a Deus.

A minha esposa Nathalia por me incentivar e ajudar durante essa jornada e finalmente ao meu filho Miguel, criança abençoada que me ensina a cada dia que o amor é imensurável e simples.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me mostrar o caminho certo e justo na minha vida.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Eny Maria Bertollo-Goloni por essa oportunidade e pela sua luta a frente da pesquisa no laboratório da qual demanda saúde, paciência e perseverança.

A todos os meus amigos do laboratório e do bloco pela ajuda no andamento e desenvolvimento do trabalho, todos têm a participação.

À Prof.^a Dr.^a Márcia Maria Urbanin Castanhole-Nunes e Prof.^a Dr.^a Patrícia Matos Biselli-Chitote pela disposição e ajuda nos experimentos e nas análises dos dados, muito obrigado.

Ao Hospital de Base de São José do Rio Preto principalmente ao departamento de otorrinolaringologia que deu o suporte para que essa pesquisa fosse possível, permitindo o acesso para a coleta do material biológico.

Ao departamento de patologia em especial à Dinha, secretária que sempre me ajudou de forma atenciosa e ao chefe do setor médico Dr. Dalisio de Santi Neto pela sua paciência e preocupação com o desenvolvimento do projeto.

A todos os pacientes que em um momento tão delicado se dispuseram a doar e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido para que pudéssemos junto ao departamento de Otorrinolaringologia e a Patologia realizar a coleta do material biológico.

Às Faculdades Integradas Padre Albino – Catanduva –SP (FIPA) pela colaboração no experimento e análise da imuno-histoquímica, aos técnicos Sara e Elena, e à Prof.^a Dr.^a Ana Paula Girol por abrir as portas do laboratório multidisciplinar, minha gratidão.

À Prof.^a Dr.^a Janete Cerutti, diretora do Laboratório as Bases Genéticas dos Tumores da Tiroide da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) pela doação da linhagem celular TPC-1.

Aos meus pais Roberto e Elizabeth que sempre me orientaram e amaram incondicionalmente mostrando sempre o caminho da honestidade, humildade e amor a Deus.

À minha irmã Ana Paula pelo exemplo de luta e força para enfrentar as dificuldades da vida

À minha sobrinha Beatriz, pela qual tenho muito amor e me sinto responsável por ela como uma filha,

Aos meus avós Geraldo e Encarnação (*in memoriam*) e Durval (*in memoriam*) e Maria como base de toda essa conquista pela luta e por passarem sempre a honestidade como um bem a ser seguido e praticado

Aos meus sogros, José e Stella e ao meu cunhado Thales, pela ajuda e por passar a tranquilidade nos momentos de angústia e por me acolher como um filho e membro da família

E finalmente à minha esposa uma mulher de fibra, inteligente e que sempre me deu suporte nas minhas escolhas, mostrando sempre um ponto de vista de carinho e amor pela ajuda nessa jornada de quatro anos, na qual a nossa maior conquista e presente de Deus, foi o nosso filho Miguel que fortaleceu ainda mais o nosso amor e nos motiva a cada dia para a busca de um mundo mais justo.

EPÍGRAFE

Salmo, 22

Salmo de Davi

O Senhor é meu pastor, nada me faltará.

2.Em verdes prados ele me faz repousar. Conduz-me junto às águas refrescantes,

3.restaura as forças de minha alma. Pelos caminhos retos ele me leva, por amor do seu
nome.

4.Ainda que eu atravesse o vale escuro, nada temerei, pois estais comigo. Vosso bordão
e vosso báculo são o meu amparo.

5.Preparais para mim a mesa à vista de meus inimigos. Derramais o perfume sobre
minha cabeça, e transborda minha taça.

6.A vossa bondade e misericórdia não de seguir-me por todos os dias de minha vida. E
habitarei na casa do Senhor por longos dias.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Nrf2 sob estresse oxidativo.....	11
Figura 2. Envolvimento de Nrf2 na angiogênese tumoral.....	13
Figura 3: Biogênese e ação dos miRs.....	15
Figura 4. Expressão de RNAm de <i>VEGFA</i> nos tecidos de tumor e bócio e seus respectivos tecidos adjacentes.....	31
Figura 5. Expressão de RNAm de <i>NFE2L2</i> nos tecidos de tumor e bócio e seus respectivos tecidos adjacentes.....	32
Figura 6. Expressão do miR-17-5p nos tecidos de tumor e bócio e seus respectivos tecidos adjacentes.....	33
Figura 7. Expressão do miR-612 nos tecidos de tumor e bócio e seus respectivos tecidos adjacentes.....	34
Figura 8. Expressão proteica de VEGFA das amostras de tumor, bócio e tecido normal.....	36
Figura 9: Expressão Nrf2 na glândula da tireoide.....	37
Figura 10. Resultados do ensaio de transfecção de células TPC-1 com o <i>mirVana</i> TM <i>miRNA Mimic</i> para miR-612.....	39
Figura 11. Resultados do ensaio de transfecção de células TPC-1 com o <i>mirVana</i> TM <i>miRNA Inhibitor</i> para miR-17-5p.....	39

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Características das amostras coletadas.....	29
Tabela2. Expressão gênica e microRNAs em tumor de tireoide e bócio em relação ao tecido normal de tireoide.....	30
Tabela3. Expressão gênica e microRNAs nos tecidos adjacentes de tumor de tireoide e bócio em relação ao tecido normal de tireoide.	30
Tabela 4. Correlação entre a expressão dos genes <i>VEGFA</i> e <i>NFE2L2</i> e dos miR-17-5p e miR-612 em tumores de tireoide e bócio colóide.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μ l	Micro-litro
μ m	Micrometro
β -actina	Do inglês <i>actin beta</i>
AKT2	Do inglês <i>AKT serine/threonine kinase 2</i>
Bp	Do inglês <i>base pairs</i>
BSA	Do inglês <i>bovine serum albumin</i>
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento pessoal de nível superior
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO ₂	Dióxido de carbono
CUL3	Do inglês <i>cullin 3</i>
DAB	Do inglês <i>3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride</i>
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DIP	Do inglês <i>di-iodinated tyrosine</i>
DNA	Do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNAc	DNA complementar
EDTA	Do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<i>EGFR</i>	Do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	Do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ELK1	Do inglês <i>ETS transcription factor</i>
ERA	Elemento de resposta antioxidante
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FFPE	Do inglês <i>formalin-fixed paraffin embedded</i>

<i>GAPDH</i>	Do inglês <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
<i>HMGA2</i>	Do inglês <i>High mobility group AT-hook 2</i>
hsa-miR	MicroRNA da espécie <i>Homo sapiens</i>
HO-1	Do inglês heme oxygenase-1
<i>HIF-1 α</i>	Do inglês <i>hypoxia inducible factor 1 alpha</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
<i>IL-8</i>	Do inglês <i>Interleukin 8</i>
iNOS	Do inglês <i>inducible nitric oxide synthase</i>
KEAP1	Do inglês <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
M	Metástase a distância
Maf	Do inglês <i>multicopy associated filamentation</i>
MAPK	Do inglês <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MIT	Do inglês <i>mono-iodinated tyrosine</i>
miR	Do inglês <i>small non-coding RNA molecule</i>
mg	Miligrama
mM	Mili-molar
MMP-1	Do inglês <i>Matrix metalloproteinase-1</i>
N	Envolvimento de linfonodos regionais
Na ⁺	Íon sódio
<i>NFE2L2</i>	Do inglês <i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
NF-κB	do inglês <i>Factor nuclear kappa B</i>
Nrf2	Do inglês <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
Onco-miR	Do inglês <i>oncogenic miRs</i>

PAAF	Punção aspirativa com agulha fina
PBS	Do inglês <i>Phosphate-buffered saline</i>
PDS	Do inglês <i>Pendrin</i>
pg	picograma
PTEN	Do inglês <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
qPCR	Do inglês <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RISC	Do inglês <i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RQ	Quantificação Relativa
ROS	Do inglês <i>Reactive oxygen species</i>
RT	Do inglês <i>Reverse transcriptase</i>
SEER	Do inglês <i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
T	Tamanho do tumor
T3	Tri-iodotironina
T4	Tetraiodotironina ou Tiroxina
Tg	Tireoglobulina
TNM	Classificação dos tumores
TNF	Do inglês <i>Tumor necrosis fator</i>
TP53	Do inglês <i>Tumor Protein p53</i>
TPC-1	Do inglês <i>Thyroid papillary carcinoma</i>
TPO	Tireoperoxidase
TSH	Do inglês <i>Thyroid-Stimulating Hormone</i>
TWF1	Do inglês <i>Twinfilin Actin-Binding Protein 1</i>
UPGEM	Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular

UTR 3'	Do inglês <i>Untranslated region</i>
<i>VEGF</i>	Do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Wnt/ β -catenin	do inglês <i>Wingless-type MMTV integration site family</i>

RESUMO

Introdução: O bócio colóide e o câncer papilífero de tireoide são as alterações mais comuns da glândula tireoide. A angiogênese e o estresse oxidativo desempenham papéis fundamentais na progressão do câncer, com destaque para os genes *VEGFA* e *NFE2L2*, envolvidos nesses processos. A expressão gênica pode ser regulada por microRNAs (miRNAs, miR), uma classe de reguladores gênicos que controla processos celulares como o crescimento celular, diferenciação, proliferação e apoptose. Hsa-miR-17-5p e hsa-miR-612 são possíveis reguladores dos genes *VEGFA* e *NFE2L2* e podem participar dos processos que resultam em alteração celular na tireoide e desenvolvimento de distúrbios como o bócio colóide e o câncer papilífero. **Objetivos:** Avaliar a expressão gênica e proteica de *VEGFA* e *NFE2L2* e expressão dos miRs hsa-miR-17-5p e hsa-miR-612 em amostras humanas de câncer papilífero de tireoide, bócio colóide e tecido normal de tireoide. Além disso, investigar o envolvimento dos miRs hsa-miR-17-5p e hsa-miR-612 na regulação dos genes *VEGFA* e *NFE2L2* em linhagem celular de câncer papilífero de tireoide (linhagem TPC-1). **Materiais e Métodos:** Foram incluídas no estudo 15 amostras de câncer papilífero de tireoide, 15 de bócio colóide e seus respectivos tecidos adjacentes, e seis amostras de tecido normal de tireoide. As quantificações dos genes e dos miRs foi realizada por meio da técnica de PCR em tempo real quantitativa (PCRq). A quantificação da proteína *VEGFA* foi realizada utilizando o ensaio imunoenzimático (ELISA), e a expressão da proteína *NFE2L2* foi quantificada pela técnica de imuno-histoquímica. Para avaliar a regulação gênica pelos miRs, a linhagem celular TPC-1 foi transfectada com o inibidor do miR-17-5p e o mimetizador do miR-612 e a expressão dos genes *VEGFA* e *NFE2L2* foi quantificada por PCRq. **Resultados:** O gene *VEGFA* apresentou alta expressão no tumor e seu tecido

adjacente ($P=0,0125$ e $P=0,0023$, respectivamente) no b6cio e tecido adjacente ($P < 0,0001$ para ambos os tecidos) em compara76o ao tecido normal, assim como o gene *NFE2L2* (tumor: $P=0,0061$ e adjacente: $P=0,0149$; b6cio: $P=0,0009$ e adjacente: $P<0,0001$). A express6o g6nica de *VEGFA* foi mais elevada no b6cio em rela76o ao tumor ($P<0,0001$) e aos respectivos tecidos adjacentes ($P<0,0001$). Hsa-miR-612 apresentou express6o reduzida no tecido adjacente do tumor ($P=0,016$), no b6cio e tecido adjacente ao b6cio ($P=0,015$; $P=0,0131$, respectivamente). Hsa-miR-17-5p apresentou express6o reduzida apenas no b6cio e seu tecido adjacente ($P<0,0001$; $P=0,0448$, respectivamente). Hsa-miR-17-5p foi mais expresso no tumor em rela76o ao b6cio ($P=0,033$). Correla76o negativa foi observada entre a express6o do hsa-miR-612 e a express6o de *VEGFA* e *NFE2L2* no tumor ($P=0,038$; $P=0,007$) e no b6cio com *NFE2L2* ($P=0,002$). A express6o do miR-17-5p foi negativamente correlacionada 6 do gene *NFE2L2* no tumor ($p=0,019$). A quantifica76o proteica do VEGFA mostrou que no c6ncer papil6fero, no tecido adjacente ao tumor e no b6cio col6ide ($P=0,0009$; $P=0,0138$; $P=0,0397$, respectivamente) houve aumento em rela76o ao tecido normal. O tumor apresentou express6o mais elevada da prote6na VEGFA em rela76o ao b6cio e seu tecido adjacente ($P=0,022$; $P=0,0003$). A an6lise de quantifica76o da prote6na Nrf2 mostrou que no citoplasma do tumor sua express6o foi mais elevada em rela76o ao b6cio ($P<0,0001$) e tecido normal ($P<0,0001$). O tumor tamb6m apresentou no n6cleo aumento da express6o de Nrf2 em rela76o ao b6cio ($P<0,0001$). A transfec76o do inibidor do miR-17-5p na linhagem celular TPC-1 resultou em inibi76o da express6o do gene *NFE2L2* em aproximadamente 73%. **Conclus6o:** Os genes *NFE2L2* e *VEGFA* e seus produtos proteicos s6o amplamente expressos no c6ncer papil6fero de tire6ide e b6cio col6ide. Hsa-miR-612 apresentou express6o diferencial no tumor de tire6ide e

bócio colóide e hsa-miR-17-5p apresentou expressão diferencial somente no bócio. Hsa-miR-17-5p regula positivamente a expressão do gene *NFE2L2* em câncer papilífero de tireóide. Hsa-mir-612 não participa da regulação da expressão dos genes *VEGFA* e *NFE2L2* nesse tipo tumoral.

Palavras-chave: Câncer de tireoide; bócio; fator de crescimento endotelial vascular; fator 2 relacionado a NF-E2; microRNAs

ABSTRACT

Introduction: Colloid goiter and papillary thyroid cancer are the most common alterations of the thyroid gland. Angiogenesis and oxidative stress play key roles in the progression of cancer, especially the genes *VEGFA* and *NFE2L2*, involved in these processes. Gene expression can be regulated by microRNAs (miRNAs, miR), a class of gene regulators that controls cellular processes such as cell growth, differentiation, proliferation, and apoptosis. Hsa-miR-17-5p and hsa-miR-612 are possible regulators of the *VEGFA* and *NFE2L2* genes and may participate in the processes that result in cellular changes in the thyroid and development of disorders such as colloid goiter and papillary cancer. **Objectives:** To evaluate the gene and protein expression of *VEGFA* and *NFE2L2* and expression of hsa-miR-17-5p and hsa-miR-612 in human papillary thyroid, colloid goiter and normal thyroid tissue samples. Moreover, to investigate the involvement of hsa-miR-17-5p and hsa-miR-612 in the regulation of *VEGFA* and *NFE2L2* genes using thyroid papillary cancer cell line (TPC-1 strain). **Materials and Methods:** Fifteen samples of papillary thyroid cancer, 15 colloid goiter and their respective adjacent tissues, and six samples of normal thyroid tissue were included in the study. The genes and miRs' analysis were performed using the quantitative real-time PCR technique (qPCR). The quantification of the *VEGFA* protein was performed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the expression of *NFE2L2* protein was evaluated by the immunohistochemistry technique. The TPC-1 cell line was transfected with the miR-17-5p inhibitor and the miR-612 mimic in order to evaluate the gene regulation by miRs; the expression of the *VEGFA* and *NFE2L2* genes was quantified by qPCR. **Results:** The *VEGFA* gene presented high expression in the tumor and its adjacent tissue ($P = 0.0125$ and $P = 0.0023$, respectively) and goiter and adjacent tissue ($P < 0.0001$ for both tissues) compared to normal tissue, as well as the gene

NFE2L2 (tumor: $P = 0.0061$ and adjacent: $P = 0.0149$; goiter: $P = 0.0009$ and adjacent: $P < 0.0001$). Gene expression of *VEGFA* was higher in the goiter than in the tumor ($P < 0.0001$) and adjacent tissues ($P < 0.0001$). Hsa-miR-612 showed reduced expression in adjacent tumor tissue ($P = 0.016$), goiter and tissue adjacent to goiter ($P = 0.015$, $P = 0.0131$, respectively). Hsa-miR-17-5p showed reduced expression only in goiter and its adjacent tissue ($P < 0.0001$; $P = 0.0448$, respectively). Hsa-miR-17-5p was more expressed in the tumor than in the goiter ($P = 0.033$). Negative correlation was observed between expression of hsa-miR-612 and expression of *VEGFA* and *NFE2L2* in the tumor ($P = 0.038$, $P = 0.007$) and in the goiter with *NFE2L2* ($P = 0.002$). Expression of miR-17-5p was negatively correlated to *NFE2L2* gene in the tumor ($p = 0.019$). Protein quantification of VEGFA was increased in papillary cancer, adjacent tissue and goiter ($P = 0.0009$, $P = 0.0138$, $P = 0.0397$, respectively) compared to normal tissue. The tumor showed higher expression of the VEGFA protein in relation to goiter and its adjacent tissue ($P = 0.022$, $P = 0.0003$). The quantification analysis of the Nrf2 protein showed higher expression in the tumor's cytoplasm in relation to goiter ($P < 0.0001$) and normal tissue ($P < 0.0001$). The tumor also presented an increased Nrf2 expression in relation to goiter ($P < 0.0001$) in the nucleus. Transfection of the miR-17-5p inhibitor into the TPC-1 cell line resulted in inhibition of *NFE2L2* gene expression by approximately 73%.

Conclusion: The *NFE2L2* and *VEGFA* genes and their protein products are widely expressed in papillary thyroid cancer and colloid goiter. Hsa-miR-612 has differential expression in the thyroid tumor and colloid goiter, and hsa-miR-17-5p has differential expression only in colloid goiter. Hsa-miR-17-5p positively regulates expression of the *NFE2L2* gene in papillary thyroid cancer. Hsa-miR-612 does not participate in the regulation of *VEGFA* and *NFE2L2* gene expression in this tumor type.

Keywords: Thyroid neoplasms; goiter; vascular endothelial growth factor; NF-E2-related factor 2; microRNAs.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tireoide

A glândula tireoide (do grego *thureoeidês*, com a forma de um escudo) está situada na frente dos anéis da traqueia, entre o pomo de adão (proeminência da laringe no meio da região anterior do pescoço) e a base do pescoço, onde se localiza a fúrcula esternal. Consiste num istmo central com um lobo do lado esquerdo e outro do lado direito. ⁽¹⁾

A glândula contém dois tipos de célula, as células foliculares ou tireócitos, responsáveis pela produção de hormônios triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) e as células parafoliculares ou células C, responsáveis pela produção da calcitonina. Os hormônios T3 e T4 são essenciais para o desenvolvimento, crescimento e regulação dos processos metabólicos em todo o corpo, e o hormônio calcitonina está envolvido no metabolismo e homeostase do cálcio nos ossos. ⁽²⁾

O iodo é a matéria-prima principal para a síntese dos hormônios T3 e T4, e representa 58% e 65% do peso, respectivamente. O iodo é absorvido pelo intestino delgado e transportado pelo sistema circulatório até a tireoide e introduzido na célula na forma de iodeto juntamente com íons sódio (Na⁺) pela proteína transportadora de membrana do tipo simporte. No citoplasma, o iodeto é levado à região apical da célula até o lúmen do folículo pela proteína de membrana apical pendrina (PDS), onde o iodo é oxidado pela tireoperoxidase (TPO), enzima presente na membrana apical dos tireócitos. Essa reação é catalisada pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como doador de oxigênio. O iodo oxidado é, então, incorporado aos resíduos de tirosina (Tyr) da molécula de tireoglobulina (Tg) em uma reação catalisada pela TPO. A Tg é sintetizada pelo retículo endoplasmático rugoso e pelo Complexo de Golgi da própria célula. O iodo incorporado à Tg resulta em uma monoiodotirosina (MIT), e outras duas moléculas

de iodo resultam em uma diiodotirosina (DIT). A junção de uma MIT com uma DIT, catalisada pela TPO, dá origem ao T3, enquanto a junção de duas DIT dá origem ao T4. Os hormônios T3 e T4 permanecem no lúmen folicular ligados à Tg na glândula tireoide. Caso a glândula pare de produzir e estocar esses hormônios, o órgão ainda tem estoque suficiente de hormônio por até 50 dias. Essa capacidade de estocar os hormônios produzidos no coloide é uma particularidade da glândula tireoide. Após a digestão da Tg, os hormônios T4 e T3 são liberados para a circulação. ⁽³⁻⁵⁾

O desequilíbrio das funções da tireoide provocado por fatores como irradiação externa, alterações genéticas, fatores endógenos, sexo feminino, idade superior a 45 anos, hábitos alimentares e estilo de vida acarreta distúrbios e doenças na glândula tireoide. O bócio coloide é o distúrbio mais comum da tireoide, enquanto que o câncer do tipo papilífero é o mais frequente. ⁽⁵⁻⁶⁾

1.2 Bócio Coloide e Câncer Papilífero

O bócio coloide é o mais comum de todos os distúrbios da glândula tireoide, mesmo em regiões não endêmicas, é clinicamente detectado em torno de 4% de todos os adultos com idade superior a 30 anos. Essa condição clínica é detectada como um aumento da glândula, podendo causar pressão na região, disfagia, tosse e rouquidão. Em raros casos, a paralisia do nervo laríngeo pode ocorrer quando o nervo é afetado pela expansão do bócio. ⁽⁷⁾

Alguns fatores como a heterogeneidade funcional de células foliculares normais, o gênero feminino, mutações nos genes *Tiroglobulina*, *Tireoperoxidase*, e do receptor de TSH (*Thyroid-Stimulating Hormone*) e o aumento do TSH sérico provocado por eventos como deficiência de iodo e erros inatos da síntese de hormônio da tireoide desempenham um papel importante na fisiologia e na síntese de hormônios da tireoide e essas desregulações predispõem ao desenvolvimento de bócio coloide. ^(6, 8)

Pesquisas realizadas nas Associações Americana, Europeia e Latino-americana de tireoide indicaram que os norte-americanos são bastante restritivos na escolha de testes laboratoriais. No entanto a maioria dos especialistas realizam exames para observar os níveis de TSH e T4 livres no sangue, e também os níveis totais de T4 e T3 por causa da secreção preferencial de T3 sobre T4 na condição de deficiência leve de iodo. ⁽⁶⁾

A presença de bócio coloide pode indicar o início de um processo de transformação maligna da tireoide, sendo que normalmente o câncer papilífero é o de maior frequência. Um estudo retrospectivo demonstrou que em 13,7% dos pacientes operados com bócio, a presença de câncer foi observada no exame histopatológico. ⁽⁹⁾ Outro estudo de 2015 com 134 pacientes mostrou incidência significativa (46,3%) de câncer papilífero de tireoide em pacientes com bócio coloide. ⁽¹⁰⁾

A crescente incidência de câncer em pacientes com bócio coloide reflete a necessidade de gerenciamento multidisciplinar para determinação da extensão da cirurgia de bócio evitando, assim, a realização de novas cirurgias, já que a tireoidectomia parcial apresenta alta taxa de recorrência em longo prazo. ⁽¹¹⁻¹²⁾

O câncer de tireoide é a neoplasia endócrina mais comum e soma cerca de 1,7% de todos os diagnósticos de câncer no mundo. ⁽¹³⁾ Apenas em alguns países, como Noruega e Suécia, a incidência de câncer de tireoide é reduzida. ⁽¹⁴⁾ As taxas de incidência do câncer de tireoide aumentaram desde o início de 1980 e mais dramaticamente na última década, com incidência de 3,8% ao ano. Dados epidemiológicos do *Surveillance Epidemiology and Results* (SEER), de 2010 até 2014, mostram que o câncer de tireoide é mais comum em mulheres do que em homens e entre aqueles com antecedentes familiares de doença tireoide. O número de novos casos

de câncer de tireoide foi de 14,2 por 100.000 homens e mulheres por ano. O aumento da incidência é indicado pela variação percentual anual, que nos EUA foi de 2,4% de 1980 a 1997 e de 6,6% de 1997 a 2009. ⁽¹⁵⁻¹⁶⁾

No mundo o tumor maligno de tireoide é o quinto tipo de câncer mais comum em mulheres ⁽¹⁶⁾. Relatórios recentes mostraram uma variação percentual anual entre o sexo masculino e feminino, que foi de 6,3% e 7,1% para os brancos, 4,3% e 8,4% para os negros, 4,2% e 6,7% para os hispânicos e 3,4% e 6,4% para asiáticos (Ilhas do Pacífico), respectivamente. Embora as taxas mais baixas de câncer de tireoide sejam observadas em negros, a maior taxa de aumento em incidência para o câncer papilífero de tireoide ocorre em mulheres negras. ⁽¹⁷⁾

No Brasil os casos de câncer de tireoide para o ano de 2016 foram estimados para o sexo masculino 1.090 casos e para o sexo feminino 5.870, e risco estimado de 1,08 casos a cada 100 mil homens e 5,70 casos a cada 100 mil mulheres, sendo que no sexo feminino o câncer de tireoide ocupa o oitavo lugar em incidência de os cânceres, exceto pele não melanoma. ⁽¹⁸⁾

Em contraste com a maioria dos tumores, incluindo o da mama, do cólon, do pulmão e da próstata, cuja mortalidade diminuiu nas últimas duas décadas, a taxa de mortalidade por câncer de tireoide apresentou um ligeiro aumento, relatado pelo SEER, para o período 1988-2009, apesar do diagnóstico precoce e melhora no tratamento dos cânceres de tireoide de alto risco. ⁽¹⁹⁾

Entre os fatores de risco para o câncer de tireoide destacam-se a exposição à radiação ionizante, ⁽²⁰⁾ o histórico familiar, as condições benignas da tireoide (por exemplo, bócio e nódulos tireoidianos), ⁽²¹⁾ a obesidade, estilo de vida ocidentalizado,

fatores dietéticos, deficiência ou excesso de iodo, e a poluição antropogênica, isto é, causada por atividades humanas. ⁽²²⁻²³⁾

O câncer da tireoide representa um modelo atrativo de estudo, já que, compreende vários tipos histopatológicos de tumores originários de uma mesma célula e com distintos níveis de diferenciação. A maioria dos carcinomas (95%) origina-se de células foliculares da tireoide e é subdividido em carcinoma papilífero (80%), carcinoma folicular (10%), células de Hurthle (3%) e anaplásico (2%). Os 5% restantes são de células do interior da glândula da tireoide, as células-C, que dão origem ao carcinoma de tireoide medular. ⁽²⁴⁻²⁶⁾

O câncer papilífero de tireoide (CPT) também pode ser multifocal, mas normalmente é de crescimento lento, com tendência a se espalhar para os nódulos linfáticos e geralmente tem um bom prognóstico. ⁽²⁷⁻²⁸⁾

O carcinoma folicular da tireoide (CFT) é responsável por aproximadamente 15% dos cânceres de tireoide de células foliculares e é definido pelas suas características invasivas, que resultam na infiltração dos vasos sanguíneos e / ou penetração completa da cápsula do tumor. O CFT raramente é multifocal e geralmente não apresenta metástases para os nódulos linfáticos regionais, mas tende a espalhar-se através da corrente sanguínea para o pulmão e os ossos. Uma importante variante histológica do CFT é conhecida como carcinoma de células de Hürthle ou carcinoma folicular oncótico, composto de células eosinofílicas repletas de mitocôndrias. ⁽²⁹⁾

O câncer anaplásico de tireoide (CAT), representado por menos de 5% dos casos, é uma das formas mais letais de tumores humanos. A metástase está presente em 40% dos pacientes com CAT, sendo que, na grande maioria (80%) ocorre no pulmão ⁽³⁰⁾. Apesar do tratamento, o CAT apresenta crescimento e invasão local rápida,

ocasionando dificuldade na respiração ou na deglutição do paciente e a traqueotomia é frequentemente necessária. O prognóstico desses pacientes é ruim, pois no momento do diagnóstico a doença já se apresenta em estágio avançado e a maioria dos pacientes morre dentro de 6 meses a 1 ano. ⁽³¹⁾

Nódulos palpáveis são comuns na população adulta, com uma prevalência estimada nos Estados Unidos na faixa de 4-7% ⁽³²⁾. Um dos principais problemas de diagnóstico de problemas relacionados à tireoide envolve a avaliação pré-operatória de nódulos tireoidianos. Muitas vezes os exames como, ultrassonografia, tomografia computadorizada, e punção aspirativa com agulha fina (PAAF), não fornecem um diagnóstico definitivo, e nos casos indeterminados a cirurgia de hemitireoidectomia é muitas vezes realizada, sendo que até 75% destes pacientes apresentam doença benigna. ⁽³³⁾

O padrão ouro para a avaliação diagnóstica de nódulos de tireoide é a citologia de PAAF. Os resultados falsos positivos e falsos negativos estão entre 1-11% e 0-7%, respectivamente. Com base nas biópsias de PAAF, o nódulo pode ser diagnosticado como benigno (60% -70%) ou maligno (5% -7%). Em 30% das biópsias não há diagnóstico conclusivo, sendo considerados indeterminados ou atípicos e a hemitireoidectomia é indicada para o diagnóstico histológico definitivo. ⁽³⁴⁻³⁵⁾ Devido à dificuldade de diagnóstico preciso para o câncer de tireoide, a cirurgia pode ser realizada em nódulos benignos, e aproximadamente de 8 a 17% dos nódulos são diagnosticados como malignos. ⁽³⁶⁻³⁸⁾

Visando sempre a melhoria do diagnóstico o uso do Doppler tem sido de extrema importância para auxiliar o diagnóstico de câncer, visto que o crescimento tumoral está associado ao aumento da vascularização. Assim, Chammas e colaboradores

(2005) adotaram um sistema de classificação, utilizando o Doppler, para analisar os padrões vasculares, que consistem nos seguintes: padrão I, ausência de fluxo sanguíneo; padrão II, fluxo sanguíneo exclusivamente perinodular; padrão III, fluxo sanguíneo perinodular = fluxo sanguíneo central; padrão IV, fluxo sanguíneo central > fluxo sanguíneo perinodular; e padrão V, exclusivamente fluxo sanguíneo central. Os resultados demonstram que o risco de malignidade aumenta à medida que o fluxo sanguíneo intranodular se torna mais dominante. De acordo com os pesquisadores foi possível observar que nódulos com fluxo sanguíneo padrão III (2 de 81) foram malignos, enquanto 6 dos 14 nódulos com fluxo sanguíneo padrão IV e todos os 5 nódulos com fluxo sanguíneo padrão V foram malignos. ⁽³⁹⁾

No entanto, este método depende de muitas configurações técnicas, tais como: sensibilidade *Doppler*, tipos de filtros utilizados, amplificação de sinal, frequência de repetição de pulso, profundidade de região de interesse e atenuação do sinal no tecido. Além disso, movimentos como respiração e deglutição, bem como a pulsatilidade das artérias circundantes, podem produzir artefatos. ⁽³⁹⁻⁴⁰⁾ Portanto, métodos adicionais para melhora do diagnóstico pré-operatório são altamente desejáveis e resultaria em um impacto importante sobre o atendimento clínico.

1.3 Angiogênese e os genes *NFE2L2* e *VEGFA* em tireoide.

A angiogenese desempenha papel fundamental na progressão do câncer e no surgimento de metástases, pois, são os novos vasos sanguíneos que fornecem nutrientes e oxigênio, necessários à manutenção do crescimento tumoral. ⁽⁴¹⁾ A estimulação da angiogênese pode ser terapêutica na doença cardíaca isquêmica, doença arterial periférica e cicatrização de feridas, já sua inibição pode ter efeito terapêutico em câncer, condições oftálmicas, artrite reumatóide e outras doenças. ⁽⁴²⁾ Considerando o papel da

angiogênese na tumorigênese, a identificação de biomarcadores relacionados a este processo poderá auxiliar no diagnóstico, prognóstico e tratamento.

Os órgãos endócrinos apresentam alta vascularização, com a presença do epitélio fenestrado revestindo os vasos sanguíneos, o que permite a fácil transferência de substâncias através dessa parede permeável do vaso, visto que, o suprimento de sangue é essencial para funções metabólicas e endócrinas normais. Há a necessidade de uma regulação rápida desses sistemas, pois mesmo uma pequena liberação de hormônios exige um suprimento de sangue eficiente. ⁽⁴³⁾

A tireoide apresenta aumento da vascularização tanto no câncer como no bócio quando comparado com tecidos normais. Estudos demonstram que uma maior vascularização aumenta o risco de recorrência e menor sobrevivência no câncer papilífero, já no câncer do tipo folicular e anaplásico desempenha um papel na disseminação tumoral. Esse aumento da vascularização mostra-se importante no câncer folicular, em que as células tendem a se espalhar pela corrente sanguínea, enquanto a disseminação do câncer papilífero tireoide ocorre por meio do sistema linfático. ⁽⁴³⁻⁴⁴⁾

Um dos principais fatores para o desenvolvimento da angiogênese fisiológica e também na maioria das patologias como o câncer, é a família do Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que inclui cinco isoformas, denominadas *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC*, *VEGFD* e *PIGF*, todas descritas em mamíferos. O *VEGFA* promove a angiogênese, a permeabilidade vascular, a migração celular e expressão gênica. *VEGFB* protege contra a degeneração de neurônios sensoriais, o *VEGFC* é expresso durante a embriogênese, enquanto o *VEGFD* é expresso somente na idade adulta e está envolvido no desenvolvimento dos vasos linfáticos. *PIGF* é o fator de crescimento placentário. ⁽⁴⁵⁻

O *VEGFA* é o primeiro fator angiogênico que quando induzido pela hipóxia promove os processos de proliferação, brotamento, migração e formação da matriz endotelial. ⁽⁴⁷⁻⁴⁸⁾ Em vista disso, é um alvo considerável para novas terapias contra o câncer em modelos pré-clínicos. A inibição de *VEGFA* tem mostrado eficácia no tratamento de vários tipos de câncer, com redução no crescimento tumoral e aumento das taxas de sobrevivência. ⁽⁴¹⁾

A função endócrina da tireoide requer a regulação precisa da sua rede microvascular. A expressão do gene *VEGFA* na tireoide é elevada quando comparada a outros tecidos. A desregulação do *VEGFA* tem um papel importante tanto em doenças benignas como em malignas. No desenvolvimento do bócio primeiramente ocorre o aumento das células endoteliais, para que depois ocorra a proliferação das células foliculares da tireoide. ⁽⁴⁹⁾ No câncer, o *VEGFA* tem sua expressão alterada nos diferentes estágios, tipos e na progressão dos cânceres de tireoide. ⁽⁵⁰⁻⁵²⁾

Outro importante fator para o desenvolvimento angiogênico é o gene *NFE2L2* (*Nuclear factor (erythroid-derived 2) -like 2*), que codifica o fator de transcrição nuclear relacionado 2 (Nrf2). Este gene regula a expressão de proteínas antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo em vários tecidos. ⁽⁵³⁾ Em condições basais a proteína Nrf2 é mantida inativa por meio da ligação dos inibidores KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) e CUL3 (*Cullin 3*), que a seleciona para a degradação proteossomal (Figura 1). No entanto, sob estresse oxidativo, Nrf2 dissocia-se dos inibidores e é transportado para o núcleo para a regulação de genes dos elementos de resposta antioxidante (ARE), genes estes envolvidos em resposta a lesões e inflamações que incluem a produção de radicais livres. ⁽⁵³⁻⁵⁴⁾

Um exemplo de ação do Nrf2 é a participação no processo de homeostase dos níveis de espécies reativas de nitrogênio (ERN) e oxigênio (ERO), controlando diretamente a formação de tais moléculas enzimáticas. No caso de óxido nítrico, o controle se dá por meio da supressão da enzima indutora de óxido nítrico sintase (iNOS), também conhecida como NOS2, ou pela sua capacidade de induzir a expressão de enzimas, tais como a catalase, que destroem H_2O_2 .⁽⁵⁵⁾

Evidências sugerem que o estresse oxidativo também é capaz de induzir a angiogênese⁽⁵⁶⁾. A tireoide apresenta alta capacidade de defesa contra o estresse oxidativo, provavelmente porque uma quantidade mínima de oxidantes é um pré-requisito para o seu funcionamento normal.⁽⁵⁷⁾ O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os metabólitos reativos e a sua eliminação por sistemas antioxidativos.⁽⁵⁸⁾

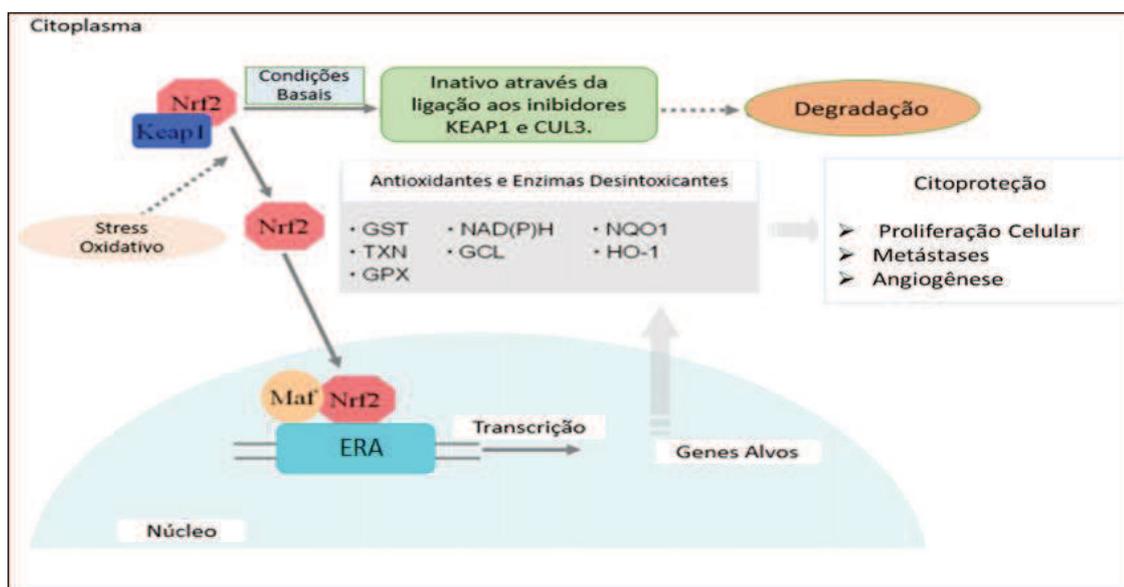


Figura 1. Nrf2 sob estresse oxidativo. Normalmente, o complexo Nrf2 e Keap1 é inativado no citoplasma por degradação proteasomal. Sob estresse oxidativo, Nrf2 dissocia-se de Keap1 e transloca-se para o núcleo para formar um heterodímero com pequenas proteínas Maf (*multicopy associated filamentation*) e subsequentemente liga-se ao elemento de resposta antioxidante (ERA), resultando em efeito antioxidante e citoproteção (Figura adaptada Zhou *et al.*, 2012).⁽⁵⁴⁾

Uma série de fatores de estresse celular, incluindo hipóxia, privação de nutrientes e ERO, são estímulos importantes para a sinalização angiogênica.⁽⁵⁹⁾ A hipóxia, um dos principais elementos do microambiente tumoral, é responsável pela progressão tumoral por várias etapas, incluindo angiogênese tumoral. O fator de transcrição Nrf2 desempenha um papel importante na angiogênese tumoral sendo a hipóxia um importante indutor do fator de transcrição Nrf2 como ativador de EROs, resultando em aumento da expressão da heme oxigenase-1 (HO-1) e interleucina-8 (IL-8). Por sua vez, esse aumento da HO-1 desencadeia a produção do VEGF e a regulação positiva do VEGF ativará Nrf2, resultando no aumento desse *feedback*. Além disso, a produção de VEGF induzida por Nrf2 é regulada pelo fator induzível por hipóxia (HIF)-

1 α , e também pode afetar a angiogênese tumoral ao participar da regulação do HIF-1 α e de IL-8. Finalmente, os fatores proangiogênicos afetam o comportamento biológico das células endoteliais, incluindo proliferação, migração e formação de estruturas capilares e redução da adesão das proteínas na matriz extracelular, que contribuem para a angiogênese tumoral. ⁽⁵⁴⁾ (Figura 2).

Há fortes indícios que o desenvolvimento farmacológico de drogas que aumentam a atividade do Nrf2 deve ser realizado para a prevenção não só do câncer, mas também de muitas outras doenças em que o estresse oxidativo e inflamatório são cruciais para a patogênese. No entanto, como um sistema de proteção, a sinalização pelo Nrf2 também pode conferir benefícios às células cancerosas, pois sua ativação constitutiva por mutações somáticas ou eventos epigenéticos é observada em vários cânceres humanos e está ligada à quimiorresistência ⁽⁶⁰⁾. Por outro lado, um estudo mostrou que a degradação do Nrf2 mediada pelo aumento da Cul3 resultou em melhor modulação dos sistemas de desintoxicação celular e quimiossensibilidade a medicamentos citotóxicos utilizados na terapia do câncer de mama. ⁽⁶¹⁾ Estudos em linhagens celulares de câncer de tireoide mostram que o Nrf2 atua como mediador da resistência à atividade quimioterapêutica de inibidores de proteassoma, e assim, se torna um novo alvo potencial para o tratamento do câncer de tireoide. No entanto, a relevância clínica destes resultados é incerta, uma vez que a atividade de Nrf2 em câncer de tireoide humana permanece desconhecida. ^(60, 62)

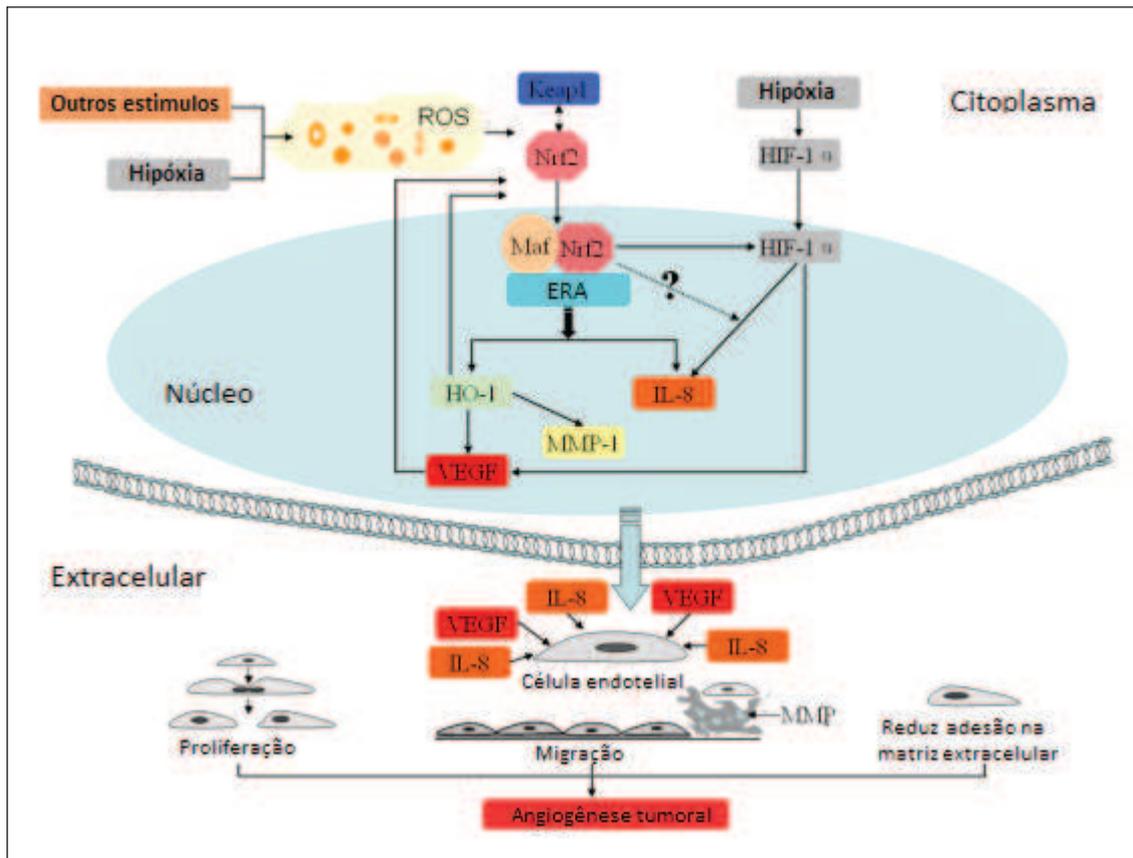


Figura 2. Envolvimento de Nrf2 na angiogênese tumoral (Zhou *et al.*, 2012, com modificações).⁽⁵⁴⁾ Metaloproteinase-1 de matriz (MMP-1); elemento de resposta antioxidante (ERA); espécies reativas de oxigênio (ERO).

Ziros e colaboradores (2013)⁽⁴⁵⁾ mostraram a relação de Nrf2 com câncer papilífero de tireoide, porém, é necessária ampliação dos estudos com metodologias adicionais, bem como realizá-los em diferentes populações, tendo em vista a alta variabilidade genética da população brasileira devido à miscigenação étnica, e a influência dos diferentes fatores de risco aos quais estas populações são expostas, o que se torna crucial nos casos de câncer de tireoide, já que esta neoplasia não apresenta apenas um fator de risco predominante para seu desenvolvimento.

Dado o seu papel de regulador da angiogênese, os genes *VEGFA* e *NFE2L2* tem sido considerado potenciais alvos para novas terapias antiangiogênicas. Portanto, esclarecer a relação entre esses genes pode fornecer informações importantes para o desenvolvimento de técnicas ou medicamentos que limitam ou reduzem o crescimento tumoral e também restauram a sensibilidade dos tumores aos quimioterápicos.

1.4 MicroRNAs e Câncer de Tireoide

Uma classe de moléculas com potencial no diagnóstico são os microRNAs (miRNAs, miR), uma classe de reguladores gênicos de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento em sua forma ativa. Os miRs funcionam como reguladores de genes controlando muitos processos celulares, incluindo crescimento celular, diferenciação, proliferação e apoptose. ⁽⁶³⁻⁶⁴⁾ Os miRs são RNAs não codificantes e endógenos que regulam a expressão de genes codificadores de proteínas, promovendo diminuição do produto gênico e proteico. O silenciamento pós-transcricional mediado por miRs pode ocorrer pela degradação de RNA mensageiro (RNAm) alvo ⁽⁶⁵⁾ e / ou inibição da síntese proteica no estágio de iniciação. ⁽⁶⁶⁻⁶⁷⁾ Devido ao seu tamanho pequeno e alinhamento de base imperfeito com os alvos, os miRs têm a capacidade de regular muitos RNAm alvo, atuando como reguladores globais para a expressão gênica. ⁽⁶⁸⁾

Os miRs são transcritos pela RNA polimerase II e são processados ainda no núcleo pela enzima Drosha, dando origem ao pré-miRs, os quais são exportados para o citoplasma se tornando miRs maduros pela ação da enzima Dicer. Uma das fitas geradas pelo miR maduro conduzirá a repressão do RNAm alvo ao se integrar ao complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) ⁽⁶³⁾. O RNAm alvo é reconhecido pelos miRs maduros, resultando na degradação do mesmo quando houver complementariedade total e a repressão da tradução quando houver complementariedade parcial (Figura 3). ⁽⁶⁹⁾

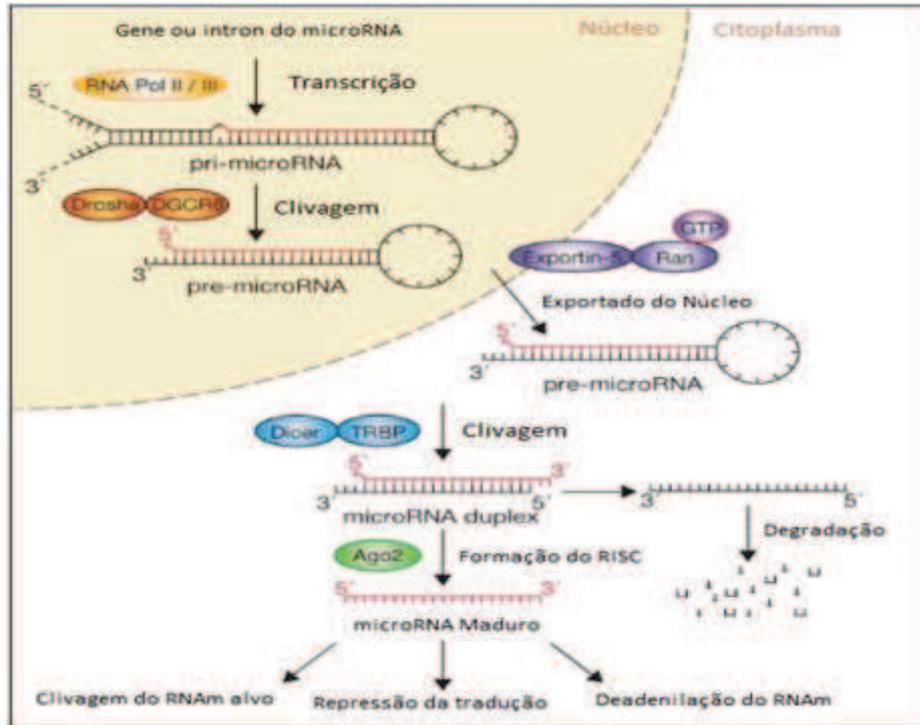


Figura 3: Biogênese e ação dos miRs. Os miRs são transcritos pela RNA polimerase II e no núcleo sofrem a ação da enzima Drosha, originando os pré-miRs. Estes são exportados para o citoplasma pela proteína Exportin 5, e são reconhecidos pela enzima Dicer, que processa os pré-miRs em miRs maduros. Uma das fitas deste miR é selecionada para integrar o complexo RISC, que conduzirá a repressão da tradução do RNAm alvo por meio do pareamento parcial ou completo entre o miR maduro e a região UTR 3' (untranslated region) do RNAm. (Adaptado de Winter et al., 2009).⁽⁶⁹⁾

É bem estabelecido que alguns miRs apresentam expressão diferencial em diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer de tireoide, o que sugere que as alterações na expressão de miRs podem ser importantes no processo de tumorigênese.⁽⁷⁰⁾

Ao longo das décadas, evidências emergentes sugeriram que os miRs poderiam ser utilizados como biomarcadores para a detecção do câncer, pois os miRs podem ser facilmente obtidos a partir de fluidos corporais, como soro, urina e plasma sem a necessidade de procedimento invasivo. Também foi relatado que mais de 30% dos

RNAm humanos são regulados por miRs, o que reforça a importância dos miRs no diagnóstico de câncer. ⁽⁷¹⁾

Muitos miRs são expressos na célula de modo específico, tendo sua expressão aumentada ou reprimida em tumores, proporcionando assim, uma base lógica para o seu uso potencial de diagnóstico. Vários miRs, incluindo miR-146b, miR-221, miR-222, miR-181b, miR-155 e miR-224, têm expressão significativamente elevada em câncer papilífero de tireoide. ⁽⁷²⁾ Interessantemente, a expressão dos miRs é correlacionada com o padrão mutacional dos carcinomas papilíferos. Por exemplo, o miR-187 foi expresso em níveis mais elevados em tumores que possuem rearranjos no oncogene *retPTC*. Em outros estudos correlacionou-se o aumento da expressão do miR-221 e do miR-222 com maior frequência de mutações nos genes *BRAF* e *RAS* em tumores papilíferos. ^(70, 73)

1.4.1 miR-17 e miR-612

Um dos principais miRs policistrônicos é o miR-17-92, um oncomiR localizado no cromossomo 13q31. Esse cluster miR-17-92 produz seis miRs maduros incluindo miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 e miR-92a-1, envolvidos na sobrevivência, proliferação, diferenciação e angiogênese celular. ⁽⁷⁴⁾

Estudos mostraram que a exclusão do cluster miR-17-92 em ratos é letal no período perinatal, visto que os embriões exibem anormalidades esqueléticas graves, são menores do que os embriões normais e morrem por defeitos cardíacos e hipoplasia pulmonar ⁽⁷⁴⁻⁷⁵⁾. A superexpressão do cluster miR-17-92 leva à proliferação do epitélio pulmonar e sugere um papel no câncer de pulmão. ⁽⁷⁶⁾

O cluster miR-17-92 foi inicialmente amplificado em linfomas celulares difusos, e o nocaute do miR-17-92 nessas células resultou em aumento da apoptose, na redução da tumorigenicidade e da progressão tumoral. ⁽⁷⁷⁾ Os membros do cluster têm papéis fundamentais no desenvolvimento normal e a sua desregulação leva a uma ampla

gama de doenças. Estudos relataram que a família miR-17-92 tem sua expressão alterada em diferentes tipos de câncer, como o miR-93 no câncer de mama, ⁽⁷⁸⁾ miR-20a em câncer cervical, ⁽⁷⁹⁾ miR-106b em linfoma ⁽⁸⁰⁾ e câncer gástrico. ⁽⁸¹⁾ A expressão elevada do cluster mir-17-92 também é observada em neoplasias malignas hematopoiéticas, doenças imunes, neurodegenerativas e cardiovasculares. ^(74, 82-83) Em tireoide o mir-17-5p tem sua expressão elevada na linhagem de câncer anaplásico ⁽⁸⁴⁾ e em amostras de câncer papilífero de tireoide. ⁽⁸⁵⁾

Um estudo de meta-análise concluiu que o *cluster* miR-17-92 pode ser usado como biomarcador de rastreamento não-invasivo para o diagnóstico e prognóstico de vários tipos de câncer, atuando como um método complementar de triagem inicial de câncer na prática clínica. ⁽⁸³⁾

Estudos funcionais mostraram o envolvimento de alguns dos membros do cluster miR-17-92 em câncer de tireoide. Zhao & Li, 2015 mostraram que a inibição de miR-17 resultou em aumentou significativamente da migração das células foliculares de tireoide. ⁽⁸⁶⁾ Outro estudo recente mostrou que as células transfectadas com inibidor do miR-17-5p resultou em inibição da progressão do ciclo celular na linhagem celular do tipo papilífero (TPC-1). ⁽⁸⁷⁾

O miR-612 está localizado no cromossomo 13q31 e apresenta efeitos inibitórios na proliferação celular, migração, invasão e metástase do carcinoma hepatocelular (CHC). O gene *AKT2* (*AKT serine/threonine kinase 2*) foi verificado como sendo um dos alvos diretos do miR-612, resultando na inibição da transição epitélio-mesenquimal e metástase. Os níveis de miR-612 em pacientes com CHC foi inversamente associado ao tamanho do tumor, estágio, transição epitélio-mesenquimal e metástase. De particular importância, o miR-612 está envolvido nos eventos iniciais e

finais da cascata metastática, reprimindo a invasão local e a colonização à distância. ⁽⁸⁸⁻⁸⁹⁾

Sheng e colaboradores, 2015, ⁷¹ verificaram que a expressão de miR-612 foi significativamente menor nos tecidos e nas linhagens celulares de câncer colorretal (CCR) em comparação com os tecidos adjacentes e linhagem celular normal, e menor nos espécimes de CCR metastáticos em comparação com espécimes não metastáticos. A superexpressão do miR-612 pela técnica de transfecção reduziu a proliferação celular e migração tanto em *in vitro* quanto *in vivo*. ⁽⁹⁰⁾

Há poucos relatos na literatura que contrastam a relação entre os miR-17-5p e miR-612 com os genes *NFE2L2* e *VEGFA* em câncer papilífero de tireoide e bócio colóide. Nosso grupo de pesquisa tem anos de experiência em estudos moleculares de neoplasias, porém nos últimos anos tem se observado a crescente necessidade em correlacionar as análises moleculares às práticas clínicas, e traduzir esta relação em benefício ao paciente.

1.5 Objetivos

- Avaliar a expressão gênica de *VEGFA* e *NFE2L2* em amostras humanas de câncer papilífero de tireoide, bócio coloide e seus respectivos tecidos adjacentes, e tecido normal de tireoide.
- Investigar a expressão proteica de VEGFA e NFE2L2 nos tecidos tumorais, bócio coloide e tecido normal de tireoide.
- Analisar a expressão dos MicroRNAs hsa-miR-17-5p e hsa-miR-612 nos tecidos de tireoide analisados.
- Investigar o envolvimento dos miRs hsa-miR-17-5p e hsa-miR-612 na regulação dos genes *VEGFA* e *NFE2L2* em linhagem celular de câncer papilífero de tireoide (linhagem TPC-1) transfectada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido na Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular (UPGEM), que apresenta a estrutura básica necessária para os estudos moleculares propostos no presente projeto. Foram utilizadas amostras de tecido fresco (tumor, bócio e seus tecidos adjacentes) e como amostras controle (normais) foram utilizadas biópsias de tecido normal de tireoide provenientes de autopsias realizadas pelo Serviço de Verificação de Óbitos do Hospital de Base de São José do Rio Preto. As amostras com diagnóstico de câncer papilífero de tireoide e bócio coloide foram coletadas em colaboração com o Serviço de Patologia com a supervisão do Dr. Dalisio de Santi Neto e com o Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base/ Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP sob responsabilidade do Prof. Dr. José Victor Maniglia. Os pacientes submetidos à cirurgia para retirada do tumor responderam a um questionário específico com informações sobre fatores de risco e dados familiares (Anexo I).

2.1 Considerações Éticas

As amostras de tecido fresco colhidas em cirurgia foram incluídas no estudo após assinatura do Termo de Consentimento livre e esclarecido (Anexo II), conforme submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP (CAAE 20549313.0.0000.5415, parecer nº 468.393) (Anexo III). Em relação às amostras controle, foi solicitada a dispensa do Termo de Consentimento, por conta da dificuldade na localização dos familiares desses pacientes. O presente projeto foi desenvolvido segundo as Normas Regulamentadoras de Pesquisas em Seres Humanos, Resolução CNS 466/12 (versão atualizada da Resolução CNS 196/96).

2.2 Amostras

Foram investigados um total de 66 amostras, 15 de câncer papilífero de tireoide e 15 de tecido adjacente; 15 amostras de bócio colóide e 15 de tecido adjacente e seis amostras de tecido normal. As amostras de câncer e bócio colóide de tireoide coletadas foram encaminhadas ao Serviço de Patologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto - SP, sob a supervisão do Dr. Dalisio de Santi Neto, para o diagnóstico e macrodissecção para separação dos tecidos tumorais, de bócio e seus respectivos tecidos adjacentes. Os tumores foram classificados pela equipe médica participante do projeto de acordo com os parâmetros da *American Joint Committee for Cancer (AJCC)* ⁽⁹¹⁾ em três critérios: tamanho do tumor (T), presença de linfonodos regionais comprometidos (N) e presença de metástase à distância (M).

2.3 Predição computacional de miRs.

Os miRs foram selecionados nos bancos de dados DIANA-TarBase v7.0 (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index>), TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_71) e miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>). Esses bancos de dados foram desenvolvidos para a predição computacional das interações conservadas dos miRs e as regiões UTR 3' de mRNAs alvo. Foram selecionados dois miRs que apresentaram maiores *scores* para a regulação dos genes *NFE2L2* e *VEGFA*.

2.4 Análise de expressão dos genes *NFE2L2* e *VEGFA* e dos miR-17-5p e miR-612.

Para análise da expressão gênica das amostras e das células os RNAs foram extraídos utilizando o Kit *mirVana PARIS (Applied Biosystems)*, conforme instrução do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas utilizando o equipamento Nanodrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*).

O DNA complementar (DNAC) para todas as amostras foi sintetizado em uma reação de 20µl contendo 2-5µg de RNA total e o kit *High Capacity cDNA Archive Kit* (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. Para a conversão do miRNAs em DNAC será utilizado o kit *TaqMan- Micro RNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems).

As análises de expressão dos genes *NFE2L2* (*Hs00975961_g1*) e *VEGFA* (*Hs00900055_m1*) e dos miRNAs hsa-miR-17-5p (002308) e hsa-miR-612 (001579) foram realizadas por PCR quantitativa em tempo real (PCRq), utilizando sondas *TaqMan* específicas, de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific) no equipamento *CFX 96 Real Time System* (Bio-Rad). Todas as reações foram realizadas em duplicata e incluíram um controle de contaminação (branco). Os genes *β-actina* (*Hs01060665_g1*) e *GAPDH* (*Hs03929097_g1*) foram utilizados como genes de referência para os genes alvos *NFE2L2* e *VEGFA*, e para os miRNAs miR-17-5p e miR-612 foram utilizados *RNU6B* (001093) e *RNU48B* (001006) (Thermo Fisher Scientific). A quantificação relativa (RQ) da expressão gênica e do miRNAs foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.⁽⁹²⁾ O tecido normal foi usado como calibrador.

2.5 Quantificação e expressão proteica das amostras de tecido

As proteínas foram extraídas com o Kit *MirVana Paris* e *Trizol Reagent* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante, e quantificadas utilizando-se o kit *BCA Protein Assay* (Pierce).

2.5.1 Quantificação da proteína VEGFA por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A quantificação da proteína VEGFA das amostras de tecido fresco foi realizada utilizando-se o kit *ELISA Duo Set VEGFA* (R&D Systems). A placa foi sensibilizada com anticorpo de captura e mantida por 12 horas em temperatura ambiente. Após esse período, a placa foi lavada com tampão de lavagem (3X) e incubada por uma hora em

temperatura ambiente com o reagente diluente. Logo após, foi repetida a lavagem com o tampão de lavagem (3X). Os padrões e as amostras de proteína, na concentração de 2µg/µl, foram inseridos nos poços em duplicata e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. Após lavagem, foi adicionado o anticorpo de detecção e incubou-se por 2 horas em temperatura ambiente. Após lavagem, adicionou-se a estreptavidina e incubou-se por 20 minutos em ausência de luz. Novamente a placa foi lavada (3X) e a solução de substrato foi adicionada e incubada por 20 minutos em temperatura ambiente. Ao final foi adicionada a solução de parada. A leitura da absorbância foi realizada por espectrofotômetro com filtro de 450 nm e as análises foram realizadas pelo *software* Skanlt (*Thermo Scientific*). A proteína VEGFA recombinante foi utilizada para a curva padrão e cálculo das concentrações das proteínas VEGFA das amostras.

2.5.2 Imuno-histoquímica das amostras de tecido para a proteína NFE2L2

A imunocoloração endógena de NFE2L2 foi avaliada em seções histológicas (5 µm) de cada amostra (tumor, áreas adjacentes e normais). Após a desparafinação, as seções foram reidratadas em etanol graduado (100, 90, 80 e 50%). Para recuperação de antígenos, as lâminas foram incubadas em solução tampão de citrato. Utilizou-se o anticorpo primário anti-Nrf2 (PA5-27882) de coelho policlonal (*Thermo Fisher Scientific*), na diluição de 1: 100 em albumina de soro bovino (BSA) a 1%. Algumas lâminas foram incubadas somente com 1% de BSA primário para fornecer um controle negativo para a reação. Após o período de incubação, foram submetidas a incubação com anticorpo secundário biotilado (Histostain-Plus IHC Kit, DAB, broad spectrum (95-9943B, *Invitrogen*). Posteriormente, as lâminas foram incubadas com o complexo de estreptavidina conjugada com peroxidase. As lâminas foram incubadas no escuro com 3,3'-diaminobenzidina (DAB 750118, *Invitrogen*). A hematoxilina de Harris foi utilizada como contra coloração. As lâminas foram desidratadas em etanol, banhadas

em xileno para montagem com Bálsamo do Canadá. Para a análise da densitometria, as seções foram fotografadas na objetiva de 40x (três campos por lâmina) no microscópio Leica DM750, com o software Leica LAS EZ, em uma escala arbitrária de 0 a 255, e os dados foram expressos como média \pm SEM. As análises foram realizadas utilizando-se o software *GraphPad Prism*, versão 6. Para cada amostra foram avaliados o citoplasma e núcleo de células epiteliais em 20 pontos distribuídos igualmente no citoplasma e 10 pontos no núcleo.

2.6 Linhagem Celular

A linhagem celular TPC-1 derivada de câncer papilífero foi cultivada em frasco de cultivo de 25 ou 75 cm², com meio de Cultura DMEM high glicose (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Cultilab), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab), 100U/mL de Penicilina sódica e 100 mg/mL de Estreptomicina (Cultilab) e 1% de L-glutamina (Cultilab), a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. A troca do meio foi realizada a cada três dias e quando atingida a confluência de, aproximadamente, 80% as células foram repicadas. Para esse procedimento as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e tratadas com Tripsina/EDTA (0,125%/0,05%) para desprendimento das células aderentes. A tripsinização foi interrompida com a adição de Meio de Cultura Completo e as células subdivididas em novos frascos, para a obtenção do número de células necessário para os procedimentos propostos.

2.7 Transfecção dos miRs na linhagem celular TPC-1

De acordo com dados da literatura sobre a expressão dos miR-17-5p e miR-612 em tecidos tumorais, os ensaios para análise funcional de regulação da expressão gênica foram selecionados. O miR-17-5p é frequentemente observado em alta expressão em tumores^(83, 85). Portanto, optou-se por realizar o ensaio de inibição deste miR para melhor avaliar seu papel na expressão dos genes *VEGFA* e *NFE2L2*. Por outro lado, o

miR-612 apresenta expressão reduzida em amostras tumorais, assim o ensaio de mimetização deste miR foi realizado.

Foi adicionado em cada poço 100 μ l de meio livre de soro Opti-MEM (*Invitrogen*), 1 μ l de *Lipofectamine RNAiMax* (*Invitrogen*) e 10mM do inibidor para o miR-17-5p (MH12412, *Thermo Scientific*) e do mimetizador do miR-612 (MC11461, *Thermo Scientific*), em placas de 24 poços contendo em cada poço 80.000 células. As células foram cultivadas por 48h, submetidas à extração de RNA para verificação da eficiência da transfecção, utilizando os respectivos controles positivos e negativos pelo método de PCRq.

Como controle positivo para o mimetizador do miR-612 foi utilizado o *mirVana™ miRNA Mimic miR-1 Positive Control*, desenhado para imitar o miR-1 no ambiente intracelular. Para o inibidor do miR-17-5p foi utilizado o *mirVana™ miRNA Inhibitor, let-7c positive control*. O monitoramento da atividade desses controles positivos se dá por meio da quantificação dos transcritos de um de seus genes-alvo conhecidos, o gene *TWF1* (*Twinfilin Actin-Binding Protein 1*) para o *Mimic miR-1 Positive Control* e o gene *HMG2* (*High mobility group AT-hook 2*) para o *mirVana™ miRNA Inhibitor, let-7c positive control*. Como controles negativos foram utilizados o *mirVana™ miRNA Mimic, Negative Control* e o *mirVana™ miRNA Inhibitor Negative Control*, que não apresentam RNAm alvo no transcriptoma humano e é usado como referência (calibrador) nas análises de quantificação relativa para avaliação do efeito dos microRNA na expressão dos genes-alvo.

2.8 Análise Estatística

O tipo de análise estatística para cada caso foi escolhido após a realização de um teste de Normalização para verificar se os valores apresentavam distribuição normal. As análises foram realizadas no programa estatístico *GraphPad Prism*, versão 6.

A distribuição de dados contínuos foi avaliada utilizando o teste de normalidade de D'Agostino e Pearson. *Wilcoxon Signed rank test* e *Mann Whitney test* foi utilizado para avaliar os dados de expressão gênica. A correlação entre a expressão dos miRNAs com os genes foi analisada por Correlação de *Spearman*. *Mann-Whitney test* foi utilizado para avaliar os dados de expressão proteica. Os valores $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização das amostras.

A tabela 1 apresenta as características das amostras incluídas no estudo. Os tumores foram subdivididos de acordo com a classificação TNM, na qual T é a localização e tamanho do tumor, N é o número de linfonodos comprometidos e M a presença ou não de metástases.

Tabela 1. Características das amostras coletadas.

Características	Tumor	Bócio
Idade		
<45	8 (53.4%)	6 (40%)
≥45	7 (46.6%)	9 (60%)
Gênero		
Feminino	13 (86.7%)	14 (93.4%)
Masculino	2 (13.3%)	1 (6.6%)
TNM		
T		
I	8(53.4%)	
II & III	7 (46.6%)	
N	2 (13.3%)	
M	2 (13.3%)	

TNM: Classificação dos tumores; T: tamanho do tumor; N: envolvimento de linfonodos regionais; M: metástase a distância.

3.2 Expressão do RNAm dos genes *VEGFA* e *NFE2L2* e dos miR-17-5p e miR-612 nas amostras de tecido fresco.

As expressões dos tecidos tumorais e de bócio coloide e seus respectivos tecidos adjacentes foram comparadas aquelas observadas no tecido normal. Os genes *VEGFA* e *NFE2L2* apresentaram expressão elevada no tumor e no bócio, comparada ao tecido normal. Já os miR-17-5p e miR-612 não apresentaram expressão diferencial no tumor, porém, no bócio a expressão de ambos os miRs foi reduzida (Tabela 2).

Tabela 2. Expressão gênica e miRs em tumor de tireoide e bócio em relação ao tecido normal de tireoide.

Gene	Tumor				Bócio			
	Mediana RQ**	Mín	Máx	P	Mediana RQ**	Mín	Máx	P
<i>VEGFA</i>	1,516	0,059	6,605	0,0125*	20,01	8,595	32,26	<0,0001*
<i>NFE2L2</i>	5,446	0,045	40,76	0,0061*	23,38	0,278	68,78	0,0009*
MicroRNAs								
miR-17-5p	0,206	0,007	3,305	0,094	0,099	0,006	0,879	<0,0001*
miR-612	0,181	0,002	7,097	0,135	0,044	0,003	0,238	0,015*

RQ: Quantificação Relativa; P: valor de P; * *Wilcoxon Signed rank test*. **Em relação às amostras de tecido normal (RQ = 1).

Os genes *VEGFA* e *NFE2L2*, também apresentaram expressão elevada nos tecidos adjacentes de tumor e bócio. O miR-612 apresentou expressão reduzida no tecido adjacente do tumor, no tecido adjacente ao bócio, enquanto que o miR-17-5p apresentou expressão reduzida apenas no tecido adjacente ao bócio (Tabela 3).

Tabela3. Expressão gênica e miRs nos tecidos adjacentes de tumor de tireoide e bócio em relação ao tecido normal de tireoide.

Gene	Adjacente Tumor				Adjacente Bócio			
	Mediana RQ**	Mín	Máx	P	Mediana RQ**	Mín	Máx	P
<i>VEGFA</i>	3,405	0,010	8,190	0,0023*	20,72	13,82	55,97	<0,0001*
<i>NFE2L2</i>	23,99	0,039	76,92	0,0149*	15,87	2,417	83,74	<0,0001*
MicroRNAs								
miR-17-5p	0,256	0,059	11,02	0,118	0,209	0,043	10,93	0,0448*
miR-612	0,128	0,003	20,79	0,016*	0,092	0,001	4,413	0,0131*

RQ: Quantificação Relativa; P: valor de P; * *Wilcoxon Signed rank test*. **Em relação às amostras de tecido normal (RQ = 1).

Nas comparações entre os grupos a expressão do gene *VEGFA* foi mais elevada em bócio comparado ao tumor (mediana RQ = 20,28 vs 1,5; $p < 0,0001$) e também no tecido adjacente ao bócio comparando ao adjacente ao tumor (mediana RQ = 20,72 vs

3,40; $p < 0,0001$) (Figura 4). Em relação ao gene *NFE2L2*, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 5).

Em relação ao miR-17-5p sua expressão foi mais elevada no tumor quando comparado ao bócio (mediana RQ = 0,20 vs 0,09; $p = 0,033$) (Figura 6). A expressão do miR-612 não diferiu significante entre os grupos (Figura 7).

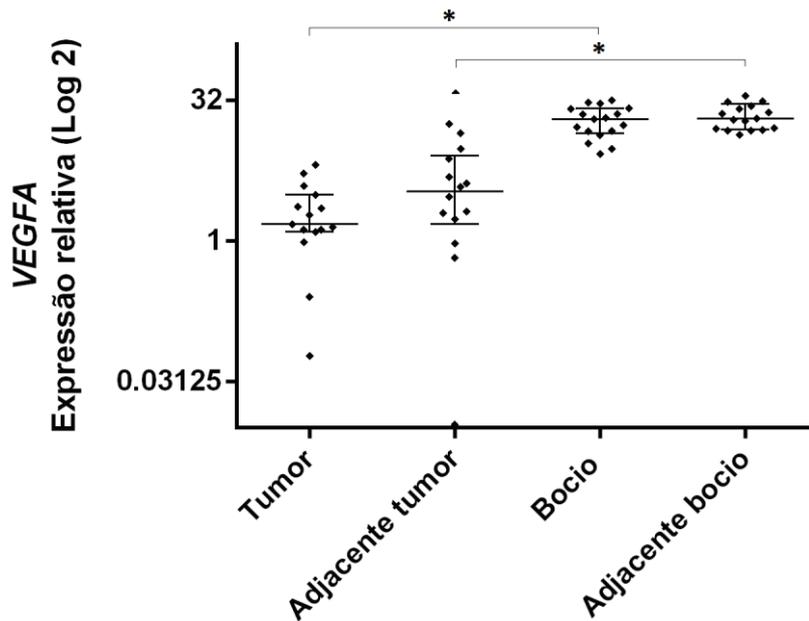


Figura 4. Expressão de RNAm de *VEGFA* nos tecidos de tumor e bócio e seus respectivos tecidos adjacentes. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2. * Estatisticamente significativa. (*Mann-Whitney*, $P < 0,0001$). RQ tecido normal = 1.

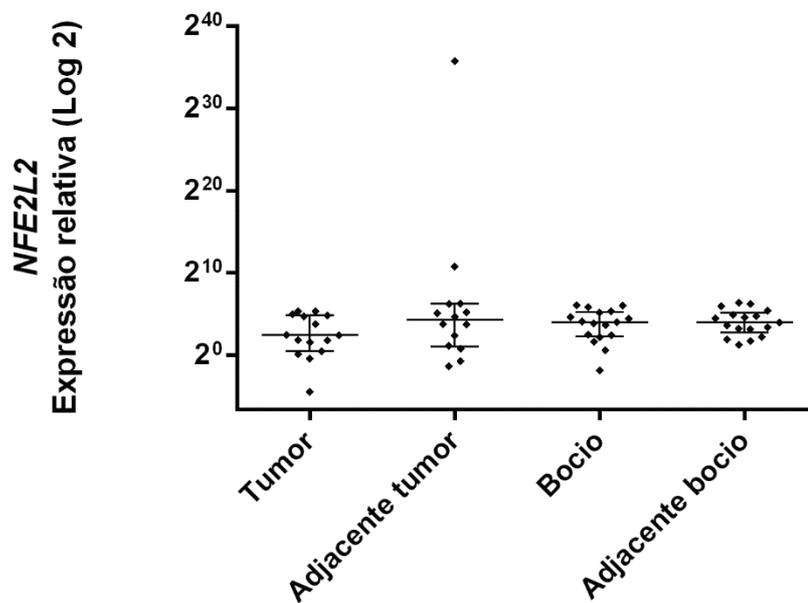


Figura 5. Expressão de RNAm de *NFE2L2* nos tecidos de tumor e bócio e seus respectivos tecidos adjacentes. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2. RQ tecido normal = 1.

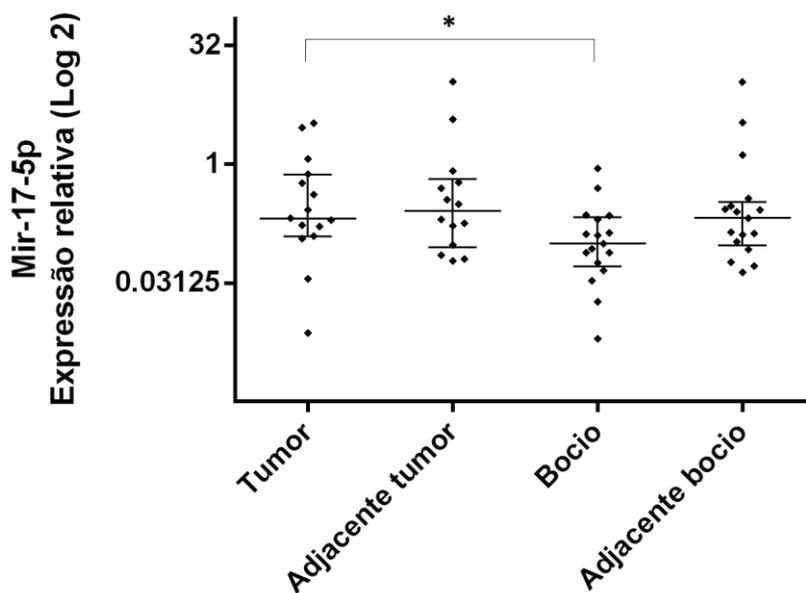


Figura 6. Expressão do miR-17-5p nos tecidos de tumor e bocio e seus respectivos tecidos adjacentes. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2. * Estatisticamente significante. (*Mann-Whitney*, $P = 0,033$). RQ tecido normal = 1.

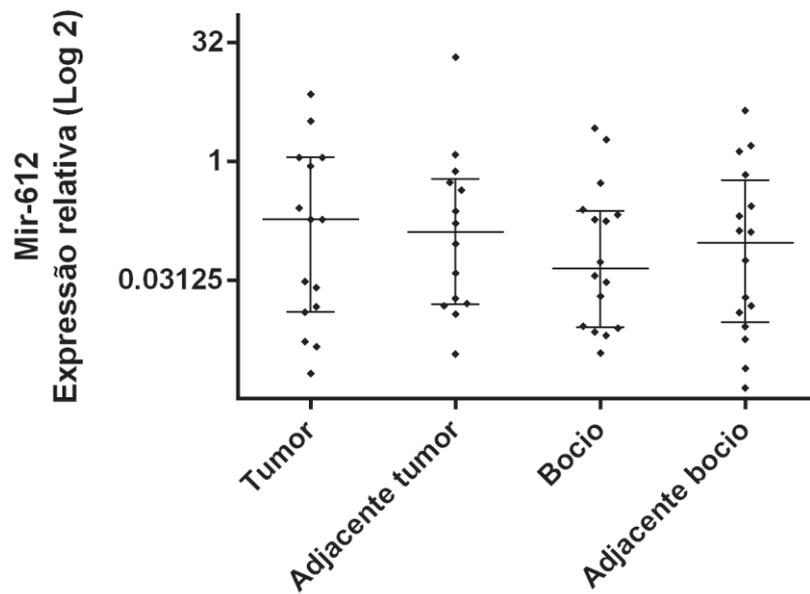


Figura 7. Expressão do miR-612 nos tecidos de tumor e bócio e seus respectivos tecidos adjacentes. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2. RQ tecido normal = 1.

3.3 Correlação entre a expressão dos genes *VEGFA* e *NFE2L2* e dos miR-17-5p e miR-612.

Para a análise de correlação foi utilizada o teste de Correlação de *Spearman* para avaliar a correlação entre a expressão dos genes *VEGFA* e *NFE2L2* e dos miR-17-5p e miR-612. Houve correlação negativa no tecido tumoral entre o miR-612 e o *VEGFA* e entre os miRs miR-612 e miR-17-5p e o gene *NFE2L2*. Em relação ao bócio somente o miR-612 apresentou correlação negativa com o gene *NFE2L2* (Tabela 4).

Tabela 4. Correlação entre a expressão dos genes *VEGFA* e *NFE2L2* e dos miR-17-5p e miR-612 em tumores de tireoide e bócio colóide.

	Tumor				Bócio			
	<i>VEGFA</i>		<i>NFE2L2</i>		<i>VEGFA</i>		<i>NFE2L2</i>	
	R ²	P	R ²	P	R ²	P	R ²	P
miR17-5p	-0,411	0,130	-0,067	0,019*	-0,118	0,653	-0,174	0,503
miR-612	-0,546	0,038*	-0,679	0,007*	-0,479	0,062	-0,724	0,002*

R²: Coeficiente de correlação; P: valor de P; * Correlação de *Spearman*.

3.4 Expressão Proteica do VEGFA e NFE2L2 nos tecidos

3.4.1 Expressão proteica de VEGFA.

A quantificação da proteína VEGFA foi realizada pela técnica de ELISA e o resultado da quantificação foi expresso pela concentração em pg/ml. Foram quantificadas as amostras de tecido tumoral e bócio, seus respectivos tecidos adjacentes e tecido normal. A expressão proteica de VEGFA foi maior no tumor em relação ao tecido normal (P = 0,0009) ao bócio (P = 0,0222) e ao tecido adjacente ao bócio (P = 0,0003). O tecido adjacente do tumor também apresentou expressão elevada de VEGFA em relação ao tecido normal (P = 0,0138). A expressão de VEGFA no bócio foi maior em relação ao tecido normal (P = 0,0397) (Figura 8).

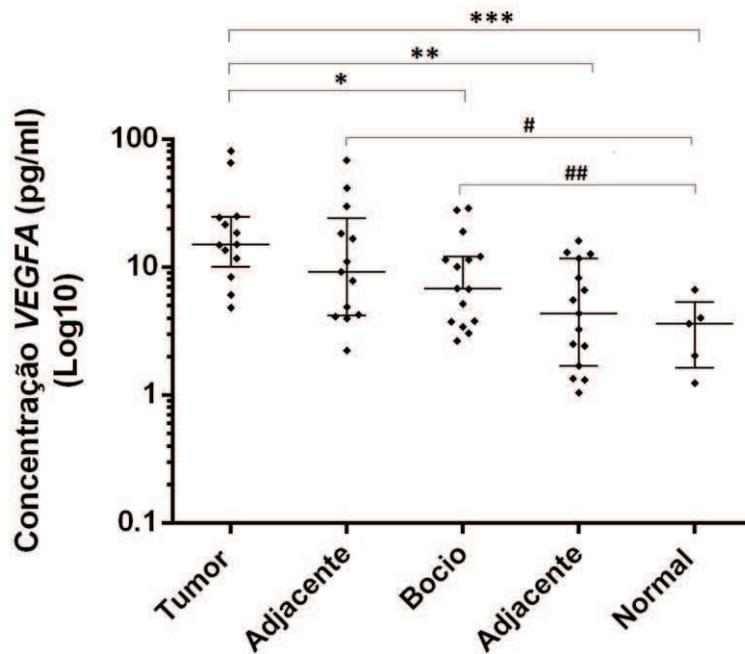


Figura 8. Expressão proteica de VEGFA das amostras de tumor, bócio e tecido normal. Os dados foram apresentados pela concentração (pg/ml) em escala logarítmica de base 10. Teste Mann Whitney (*P = 0,0222; ** P = 0,0003; *** P = 0,0009; # P = 0,0138; ## P = 0,0397).

3.4.2 Expressão proteica de Nrf2.

A expressão da proteína Nrf2 por meio da técnica de imuno-histoquímica dos tecidos tumorais, de bócio colóide e tecidos normais está apresentada na Figura 9. A expressão de Nrf2 foi maior no tecido tumoral em relação ao tecido normal ($P < 0,001$) e ao bócio ($P < 0,001$) no citoplasma celular. No núcleo, também foi observada maior marcação no tumor em relação ao bócio ($P < 0,001$). Não houve marcação nuclear no tecido normal de tireoide. A especificidade do anticorpo foi comprovada pelo controle de reação.

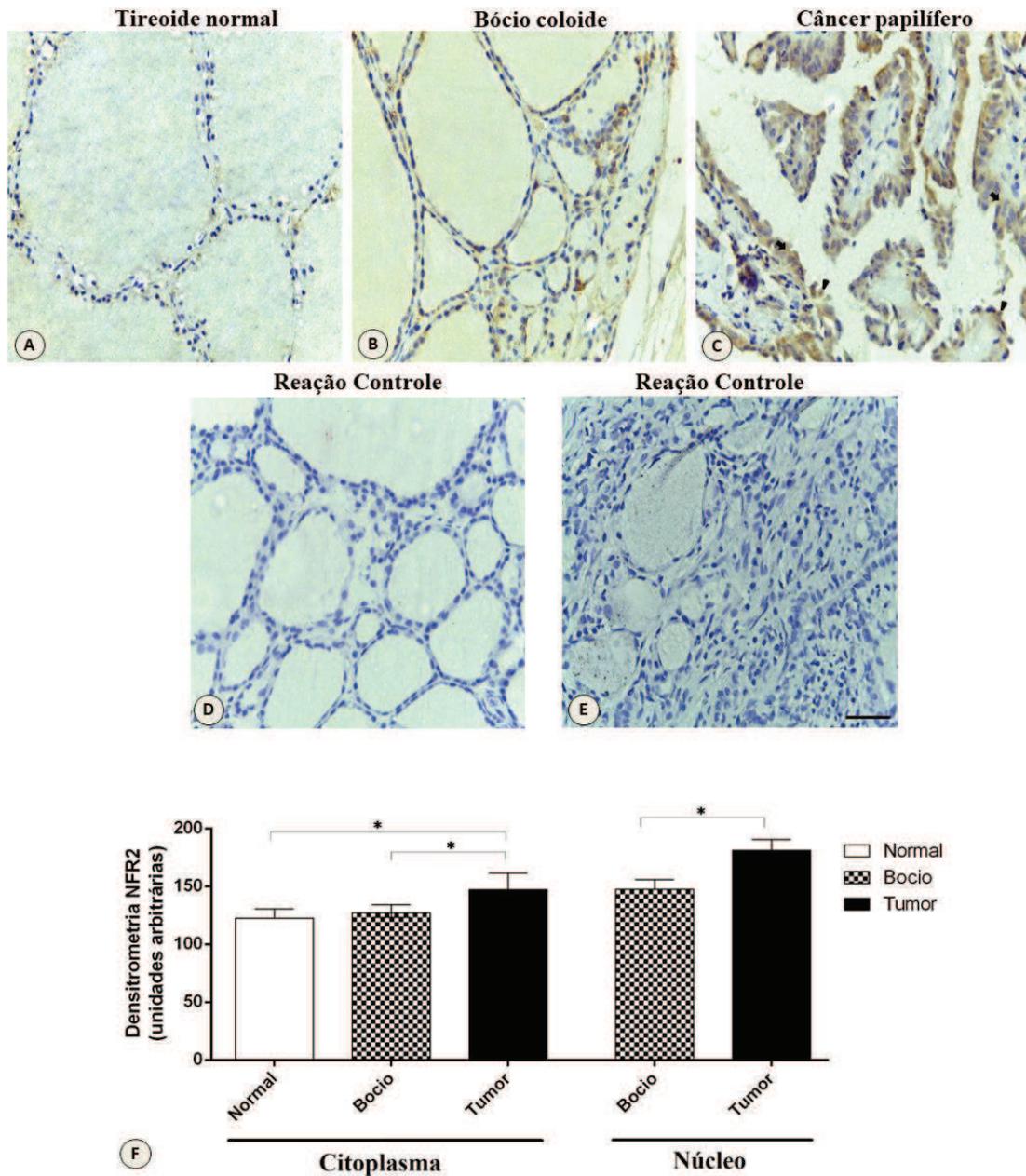


Figura 9: Expressão da proteína Nrf2 na glândula da tireoide. Aumento da expressão no citoplasma e núcleo nos diferentes tecidos. (A) Tecido normal de tireoide (B) Bócio coloide (C) Câncer papilífero de tireoide. Controle de reação do bócio (D) e do tumor (E). Secções: 5 µm. Contra-coloração: hematoxilina. Barras de escala, 20 µm. Análise densitométrica de Nrf2 (F). Os dados representam a média ± SEM do índice densitométrico. * $P < 0,0001$. Barra: 20µm. Setas: Citoplasma; Cabeça de seta: Núcleo.

3.5 Transfecção celular

3.5.1 Ensaio de superexpressão do miR-612 em linhagem celular TPC-1

O teste de eficiência da transfecção nas células TPC-1 com o microRNA sintético miR-612 foi realizado com os controles positivo e negativo, conforme descrito em Materiais e Métodos. Após o cálculo da quantificação relativa (método $2^{-\Delta\Delta Ct}$) do gene *TWF1* nas células tratadas com o *mirVana*TM *miRNA Mimic miR-1 Positive Control* utilizando-se as células tratadas com *mirVana*TM *miRNA Mimic, Negative Control #1* como calibrador, foi observada redução de 60% da expressão do gene *TWF1*. Os ensaios para avaliar a influência do miR-612 na expressão dos genes *VEGFA* e *NFE2L2* mostraram que não houve diferença significativa na expressão desses genes após a transfecção com o miR-612 (Figura 10).

3.5.2 Ensaio de inibição do miR-17-5p em linhagem celular TPC-1

O teste de eficiência da transfecção do inibidor do miR-17-5p, utilizando a expressão do controle positivo *mirVana*TM *miRNA Inhibitor, let-7c positive control*, mostrou redução de 60% da expressão do gene *HMGA2*. Após a transfecção do inibidor do miR-17-5p nas células TPC-1 não foi observada diferença na expressão do gene *VEGFA*, porém houve inibição de aproximadamente 73% da expressão do gene *NFE2L2* (Figura 11).

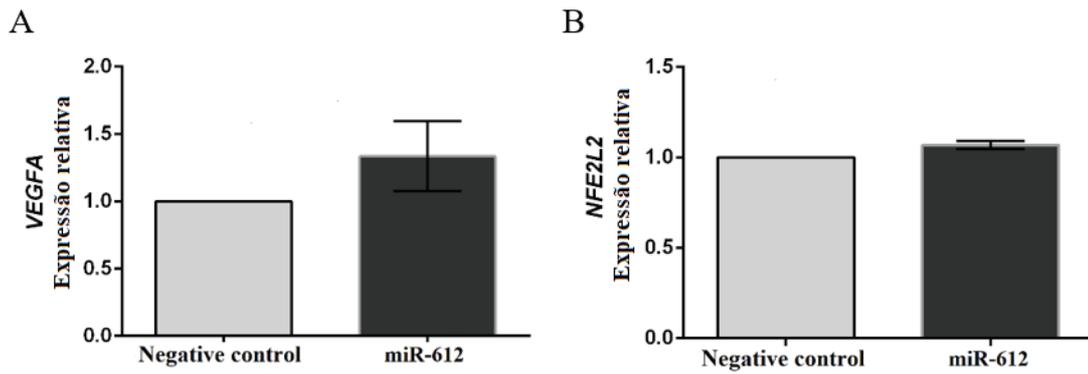


Figura 10. Resultados do ensaio de transfecção de células TPC-1 com o *mirVana*TM *miRNA Mimic* para miR-612. A expressão do gene *VEGFA* (A) e *NFE2L2* (B) não apresentou diferença entre células transfectadas e não transfectadas com o miR-612.

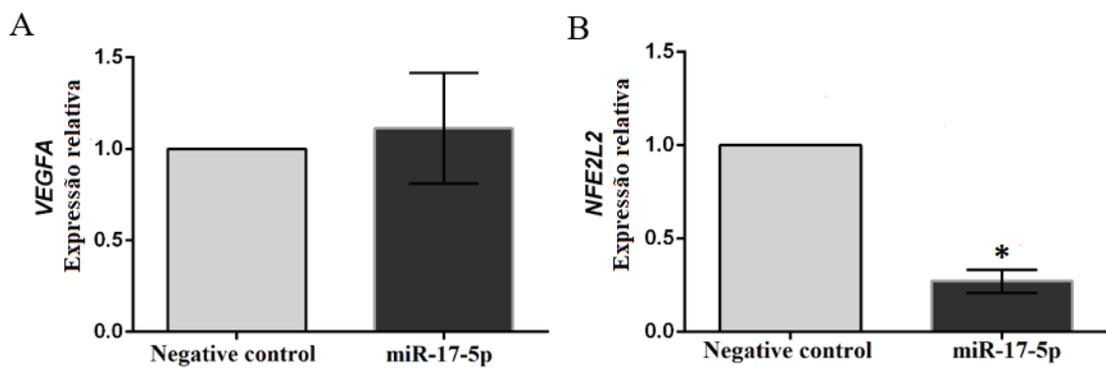


Figura 11. Resultados do ensaio de transfecção de células TPC-1 com o *mirVana*TM *miRNA Inhibitor* para miR-17-5p. (A) A expressão do gene *VEGFA* não apresentou diferença entre células transfectadas e não transfectadas com o inibidor para miR-17-5p. (B) A expressão do gene *NFE2L2* apresentou redução de aproximadamente 73%. *Redução de aproximadamente 73% em relação ao controle negativo.

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

A angiogênese está presente no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, sendo um processo crucial na fisiologia normal do desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas e ciclo menstrual, porém, também está presente em processos patogênicos, como aterosclerose, artrite, retinopatia diabética, psoríase e no desenvolvimento de tumores. ⁽⁴³⁾ Os dois genes *VEGFA* e *NFE2L2* estudados desempenham papéis fundamentais na angiogênese ^(41, 54).

O gene *VEGFA* é um dos primeiros a ser induzido na angiogênese, sendo a hipóxia um importante indutor desse gene. A diminuição da oxigenação dos tecidos é um dos principais elementos no microambiente tumoral e é responsável por promover a progressão do tumor por meio de vários eventos, incluindo a angiogênese. Esse evento também é relevante para o gene *NFE2L2*, pois durante a hipóxia ocorre aumento do estresse oxidativo e a indução e a tradução do gene na proteína Nrf2, um importante fator de transcrição. Durante este processo há a expressão da heme oxigenase-1 (HO-1), que por sua vez desencadeia a síntese de *VEGFA*, e esse aumento do *VEGFA* ativa a proteína Nrf2, mostrando que esse *feedback* entre os genes *VEGFA* e *NFE2L2* é relevante para a angiogênese. ⁽⁵⁴⁾ Portanto, o entendimento da relação entre *VEGFA* e *NFE2L2* na tireoide apresenta grande importância, já que neste tecido a vascularização e o estresse oxidativo são processos presentes na fisiologia normal da glândula.

Sabe-se que os órgãos endócrinos como a tireoide necessitam de bom suprimento de sangue para um bom funcionamento das funções metabólicas e endócrinas do órgão. Assim, a angiogênese tem grande importância para o desenvolvimento dos tumores malignos, mas também está presente em tecidos normais e aqueles com alterações benignas, como o caso do bócio colóide, onde também há aumento da expressão do fator de crescimento angiogênico e da vascularização. ^(43, 52)

O presente trabalho mostrou que os tecidos afetados pelo câncer papilífero de tireoide ou por bócio colóide e seus respectivos tecidos adjacentes apresentaram expressão aumentada de ambos os genes analisados, *VEGFA* e *NFE2L2*, evidenciando que a vascularização e o estresse oxidativo estão em desequilíbrio nesses tecidos. Corroborando com os nossos resultados, estudo de Salajegheh e colaboradores (2013)⁽⁵¹⁾ mostrou que a expressão do gene *VEGFA* é maior em câncer de tireoide em comparação com tecidos não neoplásicos da tireoide. Malkomes e colaboradores (2013)^(37C) observaram que a expressão aumentada do gene *VEGFA* é crucial para o desenvolvimento do bócio, pois a proliferação de células endoteliais antecede a dos tireócitos. Em relação ao gene *NFE2L2*, estudos mostram que defeitos funcionais e o aumento da expressão do gene *NFE2L2* ocorrem na tireoide, já que esse gene está presente na manutenção da homeostase contra o estresse oxidativo fisiologicamente gerado durante a síntese do hormônio da tireoide, podendo contribuir para o desenvolvimento do bócio assim como para a tumorigênese neste órgão.^(60, 93-94) Vale ressaltar que os níveis de expressões desses genes aumentam de acordo com o tipo e grau de progressão do câncer de tireoide.^(51, 95)

Observamos também a expressão elevada desses genes nos tecidos adjacentes em relação ao tecido normal, evidenciando que o órgão afetado tanto pelo câncer como bócio tem sua fisiologia alterada. Esse resultado mostra a importância do tecido normal como normalizador das amostras afetadas nos estudos de expressão gênica, já que o tecido adjacente não mostra a real normalidade do tecido, possivelmente por apresentarem alterações celulares que antecedem essas doenças.

A comparação entre tumor e bócio colóide e entre tecido adjacente ao tumor e tecido adjacente ao bócio, mostrou que as amostras de bócio colóide e seu tecido

adjacente apresentaram expressão significativamente mais elevada do gene *VEGFA*. Alguns fatores podem explicar esse aumento de expressão do gene *VEGFA* no bócio. O aumento das células endoteliais é o primeiro passo para a formação do bócio, que apresenta níveis de expressão de *VEGFA* semelhantes àqueles observados em alguns tipos de câncer de tireoide. ^(46, 49, 96) Também vale ressaltar que a maioria das amostras de câncer papilífero analisadas no presente estudo apresentam estágios iniciais na classificação TNM e que os níveis de expressão do gene *VEGFA* aumentam de acordo com os tipos e estágios tumorais. ⁽⁵¹⁾

Em relação à expressão do gene *NFE2L2*, as comparações entre os tecidos não indicaram diferenças significativas. Alguns estudos mostraram que a diferença entre os tecidos é mais evidenciada pela análise proteica de Nrf2, pois, é nessa fase que esse fator é degradado no tecido normal. Nas lesões benignas, essa degradação sofre um desequilíbrio e no tecido tumoral é possível observar sua migração para o núcleo onde esse fator é responsável pela resposta ao estresse oxidativo e ativação de enzimas antioxidantes. ^(60, 95)

Adicionalmente também foi verificada a expressão dos hsa-miR-17-5p e hsa-miR-612 nas amostras de câncer papilífero e bócio colóide e seus respectivos tecidos adjacentes em relação ao tecido normal, visto que esses miRs podem estar relacionados à regulação dos genes estudados. Os resultados mostraram que miR-17-5p e miR-612 não apresentaram expressão diferencial nas amostras tumorais, e somente o miR-612 apresentou expressão reduzida no seu respectivo tecido adjacente. Nas amostras de bócio colóide e adjacente as expressões desses miRs foram reduzidas.

O miR-17-5p é bem estudado em vários tipos de cânceres, entre eles o de tireoide, e na maioria dos resultados publicados esse miR mostra expressão elevada nos

tecidos tumorais, ⁽⁸³⁻⁸⁵⁾ porém, para o câncer papilífero de tireoide há resultados controversos como os encontrados pelos autores Zhao e Li em 2015, ⁽⁶²⁾ no qual a expressão deste miR estava significativamente reduzida nas amostras de câncer papilífero de tireoide em relação ao tecido adjacente não tumoral. Os resultados do presente estudo não evidenciaram diferenças significativas entre as expressões dos tecidos tumorais e tecidos não tumorais adjacentes em relação ao miR-17-5p, porém foi observada diminuição da expressão do mesmo que poderia ser comprovada com o aumento do número amostral. No entanto, a expressão do miR-17-5p foi significativamente reduzida nas amostras de bócio colóide em relação ao tecido normal. Não foram encontrados dados na literatura que corroborem ou contrastem com os achados do presente estudo. Na comparação entre tumor e bócio houve aumento significativo da expressão do miR-17-5p nas amostras tumorais, evidenciando que mesmo que nossas amostras apresentaram estágios iniciais já é possível observar essa alteração do tecido maligno em relação ao benigno.

A expressão do miR-612 não apresentou diferença significativa no tecido tumoral, apesar de sua expressão relativa ter sido baixa nessas amostras. Porém, no tecido adjacente ao tumor, no bócio colóide e seu respectivo tecido adjacente sua expressão foi significativamente reduzida comparada com a expressão do tecido normal. Outros pesquisadores mostraram que esse miR apresenta expressão reduzida em câncer colorretal ⁽⁹⁰⁾ e em carcinoma hepatocelular (CHC), onde observaram que sua expressão é inversamente proporcional à progressão e agressividade do tumor. ⁽⁸⁸⁾ Nossos resultados, diferentemente dos resultados apresentados em CHC e câncer colorretal, sugerem que a expressão desse miR poderia aumentar de acordo com o grau de alterações celulares que levam à formação do tumor, uma vez que seu tecido adjacente e

amostras de bócio apresentam expressão significativamente reduzida do miR-612. Considerando que não existem dados sobre a expressão do miR-612 em tumores papilíferos de tireoide, investigações adicionais são necessárias para esclarecer o seu papel do miR-612 neste e em outros tipos de alterações da tireoide.

No presente trabalho as proteínas VEGFA e Nrf2 também foram avaliadas nos tecidos frescos e parafinizados, respectivamente. Os resultados da quantificação proteica de VEGFA mostraram que o câncer papilífero, o tecido adjacente ao tumor e o bócio colóide apresentaram aumento da expressão dessa proteína em relação ao tecido normal. Já nas comparações entre bócio e seu tecido adjacente, e tumor e seu tecido adjacente não foi observada diferença, assim como o resultado da expressão gênica. A comparação da quantificação da proteína VEGFA entre tumor e bócio mostrou expressão significativamente elevada no tumor, resultado que contradiz com o nosso resultado da expressão gênica. Esse resultado contraditório entre a quantificação proteica e gênica sugere que o tecido tumoral e o bócio podem apresentar diferentes mecanismos de regulação pós transcricional que poderiam resultar em menores quantidades de proteína produzida pelo bócio em relação ao tumor.

Além disso, o *VEGFA* também participa da estimulação angiogênica por meio da inibição da expressão de *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*). *VEGFA* desencadeia uma cascata de eventos de sinalização, incluindo a ativação de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e a fosforilação do fator de transcrição Elk-1. Isso aumenta a expressão dos membros do grupo miR-17-92, reprimindo a expressão de *PTEN*. Sabe-se que a expressão reduzida da proteína PTEN está associada ao desenvolvimento de câncer de tireoide, por meio da proliferação das células endoteliais. Por outro lado, a inativação genética do miR-17-92 nas células endoteliais resulta em

comprometimento vascular periférico *in vivo*.⁽⁹⁷⁻⁹⁸⁾ Esses achados reforçam a importância do aumento da proteína *VEGFA* nos tumores e podem explicar em parte a maior quantificação proteica nas amostras tumorais em relação ao bócio.

Por meio da técnica de imuno-histoquímica, foi possível observar a presença da proteína Nrf2, a qual é ativada pelo estresse oxidativo, migrando do citoplasma para o núcleo da célula onde exerce sua função de fator de transcrição. Os resultados observados no presente estudo mostraram que a expressão dessa proteína no tecido normal é muito fraca (quase indetectável), marcando apenas o citoplasma. No bócio a marcação é intensificada e já é possível, em alguns casos, observar a proteína no núcleo. Finalmente, no tecido tumoral é possível ver uma forte marcação no citoplasma e em grande parte do núcleo. Esses dados indicam que a proteína Nrf2 é ativada no câncer papilífero de tireoide. Corroborando com nossos dados, Ziros e colaboradores (2013)⁽⁴⁵⁾ também observaram o mesmo padrão de marcação no tecido normal da tireoide, lesões benignas e câncer papilífero. Um trabalho recente de Geng e colaboradores (2017)⁽⁷⁴⁾ indica que a via Nrf2 é comumente ativada no CPT e, ocasionalmente, é ativada em lesões benignas da tireoide sugerindo que a ativação prolongada de Nrf2 e a sua expressão elevada pode ser um fator que contribui para a ocorrência de bócio nodular e de câncer papilífero de tireoide. A presença de forte marcação da proteína Nrf2 no núcleo das células tumorais reforça o seu papel na regulação de genes relacionados à resposta antioxidante.⁽⁵⁴⁾

Para obter informações sobre os possíveis miRs envolvidos na regulação dos genes *NFE2L2* e *VEGFA*, foi realizada uma busca nos bancos de dados. Após as análises por bioinformática, observou-se que o miR-17-5p tem como alvo ambos os genes *VEGFA* e *NFE2L2*. Dados da literatura mostram as interações entre o miR-17 e

VEGFA em pele ⁽⁹⁹⁾ e rim. ⁽¹⁰⁰⁻¹⁰¹⁾ A interação deste miR com o gene *NFE2L2* foi observada na glândula mamária. ⁽¹⁰²⁾ O miR-612 mostrou regular a expressão do gene *VEGFA* na medula óssea. ⁽⁸⁰⁾ Para o *NFE2L2*, até o momento não há na literatura trabalhos que comprovem a interação com o miR-612, entretanto, de acordo com as bases de dados consultadas, esse miR é predito como regulador do gene *NFE2L2*.

Após as análises por bioinformática, foram selecionados para a transfecção na linhagem TPC-1 o inibidor para o miR-17-5p e o mimetizador para o miR-612, pois o miR-17-5p é super expresso em tumores e o miR-612 tem sua expressão reduzida em tecidos tumorais. O presente estudo mostrou que a inibição do miR-17-5p resultou em redução da expressão do gene *NFE2L2* na linhagem TPC-1. Sabe-se que o cluster miR-17 é conhecido como regulador do gene *PTEN*, reduzindo a expressão gênica. O gene *PTEN* tem grande importância na angiogênese por meio da regulação de genes como *NFE2L2*. Rojo e colaboradores (2014) ⁽⁸⁰⁾ mostraram que a inibição do miR-17 aumentou a expressão do *PTEN*, que esse por sua vez tem participação em uma via de degradação do Nrf2. ⁽¹⁰³⁾ Como resultado da inibição do miR-17-5p, no presente estudo, houve diminuição da expressão do *NFE2L2*, corroborando com esse achado, embora os dados de expressão gênica nos tecidos mostraram correlação negativa entre a expressão desse miR e do gene *NFE2L2*. Esses resultados controversos podem refletir a participação de outras vias ativas no câncer de tireoide que poderiam influenciar na expressão do gene *NFE2L2*, é válido ressaltar também as diferenças encontradas entre as amostras de tecido tumoral fresco e os achados em cultura celular, embora os estudos *in vitro* sejam de extrema importância para a realização de estudos funcionais, eles não têm a capacidade de reproduzir a complexidade do microambiente tumoral, bem como mimetizar as diferentes vias expressas no mesmo.

Os genes e os miRs avaliados neste estudo apresentam grande potencial para o diagnóstico do bócio colóide e do câncer papilífero, uma vez que apresentaram expressão diferencial nesses tecidos. As proteínas VEGFA e Nrf2 mostraram-se eficientes para diferenciar os tecidos normais do câncer papilífero de tireoide. A expressão reduzida dos miR-17-5p e miR-612 em bócio colóide também sugerem a atuação desses miRs como biomarcadores para essa condição da tireoide.

A angiogênese, o estresse oxidativo e a desregulação dos miRs são de extrema importância para o desenvolvimento de distúrbios e câncer de tireoide. Os dois genes avaliados no presente estudo mostram-se possíveis alvos terapêuticos na angiogênese de alterações da tireoide, pois o *feedback* entre esses genes e a sua regulação via miRs mostra-se de grande importância para o desenvolvimento tumoral. Este trabalho mostrou a importante relação entre o miR-17-5p e o gene *NFE2L2*, evidenciada pelos experimentos funcionais. Entretanto, destaca-se a necessidade de maiores investigações em relação à influência do miR17-5p nos genes *NFE2L2* e *VEGFA* e na formação de novos vasos no bócio colóide e no câncer papilífero de tireoide.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

- O câncer papilífero de tireoide, bócio coloide e tecidos adjacentes ao tumor e ao bócio apresentam expressão elevada dos genes *NFE2L2* e *VEGFA* em relação ao tecido normal de tireoide. A expressão do gene *VEGFA* é mais elevada em bócio coloide comparada àquela observada no tumor e no tecido adjacente ao bócio em relação ao tecido adjacente ao tumor.

- A proteína VEGFA é altamente expressa nos tumores de tireoide, tecido adjacente ao tumor e bócio coloide, com relação ao tecido normal e apresenta expressão maior no tumor em relação ao bócio coloide e tecido adjacente de bócio. A proteína Nrf2 apresenta expressão baixa nos tecidos normais, moderada no bócio coloide e elevada no câncer de tireoide, também observada no núcleo.

- O hsa-miR-17-5p é menos expresso em bócio coloide e tecido adjacente ao bócio, enquanto que o hsa-miR-612 apresenta expressão reduzida em bócio coloide, tecido adjacente ao bócio e tecido adjacente ao tumor, com relação ao tecido normal. Hsa-miR-17-5p é mais expresso no tumor em relação ao bócio coloide.

- Hsa-miR-17-5p regula positivamente a expressão do gene *NFE2L2* em câncer papilífero de tireoide *in vitro*. Hsa-mir-612 não participa da regulação da expressão dos genes *VEGFA* e *NFE2L2* nesse tipo tumoral.

6. REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

1. Rousset B, Dupuy C, Miot F. Thyroid Hormone Synthesis And Secretion. South Dartmouth (MA): MDText.com; 2015. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285550/.
2. Guyton, Hall. Tratado de Fisiologia Médica. 12 ed: Elsevier; 2011.
3. Aires MM. Fisiologia 4ª ed. 4 ed: Guanabara Koogan; 2012.
4. Medeiros - Neto G, Knobel M. Iodine deficiency disorders. In: De Groot L J JLL, editor. Endocrinology. 6ª Ed. New York: Elsevier; 2010.
5. Rousset B, Dupuy C, Miot F, Dumont J. Chapter 2 Thyroid Hormone Synthesis And Secretion. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. Endotext. South Dartmouth (MA); 2015.
6. Jameson JL, De Groot LJ. Endocrinology: Adult and Pediatric E-Book: Elsevier Health Sciences; 2015.
7. Medeiros-Neto G. Multinodular Goiter. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. Endotext. South Dartmouth (MA); 2016.
8. Medeiros-Neto G. Multinodular Goiter: Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000; 2016 [updated 2016]. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285569/.
9. Gandolfi PP, Frisina A, Raffa M, Renda F, Rocchetti O, Ruggeri C, et al. The incidence of thyroid carcinoma in multinodular goiter: retrospective analysis. Acta bio-medica : Atenei Parmensis. 2004;75(2):114-7.
10. Campbell MJ, Seib CD, Candell L, Gosnell JE, Duh QY, Clark OH, et al. The underestimated risk of cancer in patients with multinodular goiters after a benign fine needle aspiration. World journal of surgery. 2015;39(3):695-700.

11. Kaliszewski K, Strutynska-Karpinska M, Zubkiewicz-Kucharska A, Wojtczak B, Domsolawski P, Balcerzak W, et al. Should the Prevalence of Incidental Thyroid Cancer Determine the Extent of Surgery in Multinodular Goiter? *PloS one*. 2016;11(12):e0168654.
12. Ciftci F, Sakalli E, Abdurrahman I. Total versus bilateral subtotal thyroidectomy for benign multi-nodular goiter. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(3):4596-600.
13. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*. 2010;127(12):2893-917.
14. Kilfoy BA, Zheng T, Holford TR, Han X, Ward MH, Sjodin A, et al. International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973-2002. *Cancer Causes & Control*. 2009;20(5):525-31.
15. Howlader N NA, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA. SEER Cancer Statistics Review 2017 [cited 1975-2014]. Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/.
16. Jemal A. Cancer Statistics, 2010 (vol 60, pg 277, 2010). *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61(2):133-.
17. Aschebrook-Kilfoy B, Kaplan EL, Chiu BC, Angelos P, Grogan RH. The acceleration in papillary thyroid cancer incidence rates is similar among racial and ethnic groups in the United States. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(8):2746-53.
18. INCA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro. 2017. p. 122.

19. Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *Journal of cancer epidemiology*. 2013;2013:965212.
20. Wartofsky L. Increasing world incidence of thyroid cancer: Increased detection or higher radiation exposure? *Hormones-International Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2010;9(2):103-8.
21. Dal Maso L, Bosetti C, La Vecchia C, Franceschi S. Risk factors for thyroid cancer: an epidemiological review focused on nutritional factors. *Cancer causes & control : CCC*. 2009;20(1):75-86.
22. Markaki I, Linos D, Linos A. The influence of dietary patterns on the development of thyroid cancer. *European Journal of Cancer*. 2003;39(13):1912-9.
23. Kitahara CM, Platz EA, Freeman LE, Hsing AW, Linet MS, Park Y, et al. Obesity and thyroid cancer risk among U.S. men and women: a pooled analysis of five prospective studies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2011;20(3):464-72.
24. DeLellis RA. *Pathology and genetics of tumours of endocrine organs*. France: Lyon : IARC Press; 2004. 320 p.
25. Romagnoli S, Moretti S, Voce P, Puxeddu E. Targeted molecular therapies in thyroid carcinoma. *Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia*. 2009;53(9):1061-73.
26. Vriens MR, Suh I, Moses W, Kebebew E. Clinical Features and Genetic Predisposition to Hereditary Nonmedullary Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2009;19(12):1343-9.

-
27. Society CC. Canadian Cancer Statistics In: 2017 CCSsACoCS, editor. Canadian2017.
 28. Bonora E, Tallini G, Romeo G. Genetic Predisposition to Familial Nonmedullary Thyroid Cancer: An Update of Molecular Findings and State-of-the-Art Studies. *Journal of oncology*. 2010;2010:385206.
 29. Thompson LDR, Wieneke JA, Paal E, Frommelt RA, Adair CF, Heffess CS. A clinicopathologic study of minimally invasive follicular carcinoma of the thyroid gland with a review of the English literature. *Cancer*. 2001;91(3):505-24.
 30. Derbel O, Limem S, Segura-Ferlay C, Lifante J-C, Carrie C, Peix J-L, et al. Results of combined treatment of anaplastic thyroid carcinoma (ATC). *Bmc Cancer*. 2011;11.
 31. Pacini F, DeGroot LJ. Thyroid Cancer. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2013.
 32. Schneider DF, Chen H. New Developments in the Diagnosis and Treatment of Thyroid Cancer. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*. 2013;63(6):373-94.
 33. Wiseman SM, Baliski C, Irvine R, Anderson D, Wilkins G, Filipenko D, et al. Hemithyroidectomy: the optimal initial surgical approach for individuals undergoing surgery for a cytological diagnosis of follicular neoplasm. *Ann Surg Oncol*. 2006;13(3):425-32.
 34. Hambleton C, Kandil E. Appropriate and accurate diagnosis of thyroid nodules: a review of thyroid fine-needle aspiration. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2013;6(6):413-22.

35. Cantara S, Marzocchi C, Pilli T, Cardinale S, Forleo R, Castagna MG, et al. Molecular Signature of Indeterminate Thyroid Lesions: Current Methods to Improve Fine Needle Aspiration Cytology (FNAC) Diagnosis. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(4).
36. Mazzaferri EL, Robbins RJ, Spencer CA, Braverman LE, Pacini F, Wartofsky L, et al. A consensus report of the role of serum thyroglobulin as a monitoring method for low-risk patients with papillary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003;88(4):1433-41.
37. Meinhold CL, Ron E, Schonfeld SJ, Alexander BH, Freedman DM, Linet MS, et al. Nonradiation Risk Factors for Thyroid Cancer in the US Radiologic Technologists Study. *American Journal of Epidemiology*. 2010;171(2):242-52.
38. Crippa S, Mazzucchelli L. The Bethesda System for Reporting Thyroid Fine-Needle Aspiration Specimens. *American Journal of Clinical Pathology*. 2010;134(2):343-4.
39. Chammas MC, Gerhard R, de Oliveira IR, Widman A, de Barros N, Durazzo M, et al. Thyroid nodules: evaluation with power Doppler and duplex Doppler ultrasound. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2005;132(6):874-82.
40. Holden A. The role of colour and duplex Doppler ultrasound in the assessment of thyroid nodules. *Australasian radiology*. 1995;39(4):343-9.
41. Biselli-Chicote PM, Oliveira AR, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. VEGF gene alternative splicing: pro- and anti-angiogenic isoforms in cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2012;138(3):363-70.

42. Adair TH, Montani JP. Angiogenesis. *Angiogenesis. Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease*. San Rafael (CA)2010.
43. Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JA. Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocrine reviews*. 2003;24(5):600-32.
44. Segal K, Shpitzer T, Feinmesser M, Stern Y, Feinmesser R. Angiogenesis in follicular tumors of the thyroid. *Journal of surgical oncology*. 1996;63(2):95-8.
45. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & cancer*. 2011;2(12):1097-105.
46. Klein M, Catargi B. VEGF in physiological process and thyroid disease. *Annales d'endocrinologie*. 2007;68(6):438-48.
47. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003;9(6):669-76.
48. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovascular research*. 2005;65(3):550-63.
49. Ramsden JD. Angiogenesis in the thyroid gland. *The Journal of endocrinology*. 2000;166(3):475-80.
50. Bilgici B, Ecemis GC, Tuncel OK, Bayrak IK, Kan EK, Atmaca A. VEGF and GM-CSF levels in nodular thyroid diseases. *Endocrine*. 2014;45(1):61-6.
51. Salajegheh A, Pakneshan S, Rahman A, Dolan-Evans E, Zhang S, Kwong E, et al. Co-regulatory potential of vascular endothelial growth factor-A and vascular endothelial growth factor-C in thyroid carcinoma. *Human pathology*. 2013;44(10):2204-12.

-
52. Malkomes P, Oppermann E, Bechstein WO, Holzer K. Vascular endothelial growth factor--marker for proliferation in thyroid diseases? *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2013;121(1):6-13.
53. Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(8):564-71.
54. Zhou S, Ye W, Zhang M, Liang J. The effects of nrf2 on tumor angiogenesis: a review of the possible mechanisms of action. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. 2012;22(2):149-60.
55. Hayes JD, McMahon M, Chowdhry S, Dinkova-Kostova AT. Cancer Chemoprevention Mechanisms Mediated Through the Keap1-Nrf2 Pathway. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010;13(11):1713-48.
56. Saeidnia S, Abdollahi M. Antioxidants: friends or foe in prevention or treatment of cancer: the debate of the century. *Toxicology and applied pharmacology*. 2013;271(1):49-63.
57. Poncin S, Van Eeckoudt S, Humblet K, Colin IM, Gerard A-C. Oxidative Stress A Required Condition for Thyroid Cell Proliferation. *American Journal of Pathology*. 2010;176(3):1355-63.
58. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017;2017:8416763.
59. North S, Moenner M, Bikfalvi A. Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors. *Cancer letters*. 2005;218(1):1-14.

-
60. Ziros PG, Manolakou SD, Habeos IG, Lilis I, Chartoumpakis DV, Koika V, et al. Nrf2 is commonly activated in papillary thyroid carcinoma, and it controls antioxidant transcriptional responses and viability of cancer cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(8):E1422-7.
61. Loignon M, Miao W, Hu L, Bier A, Bismar TA, Scrivens PJ, et al. Cul3 overexpression depletes Nrf2 in breast cancer and is associated with sensitivity to carcinogens, to oxidative stress, and to chemotherapy. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(8):2432-40.
62. Calkins MJ, Johnson DA, Townsend JA, Vargas MR, Dowell JA, Williamson TP, et al. The Nrf2/ARE Pathway as a Potential Therapeutic Target in Neurodegenerative Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009;11(3):497-508.
63. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
64. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function (Reprinted from *Cell*, vol 116, pg 281-297, 2004). *Cell*. 2007;131(4):11-29.
65. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010;466(7308):835-40.
66. Djuranovic S, Nahvi A, Green R. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science*. 2012;336(6078):237-40.
67. Bazzini AA, Lee MT, Giraldez AJ. Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science*. 2012;336(6078):233-7.

68. Wee LM, Flores-Jasso CF, Salomon WE, Zamore PD. Argonaute divides its RNA guide into domains with distinct functions and RNA-binding properties. *Cell*. 2012;151(5):1055-67.
69. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*. 2009;11(3):228-34.
70. Nikiforova MN, Chiosea SI, Nikiforov YE. MicroRNA Expression Profiles in Thyroid Tumors. *Endocrine Pathology*. 2009;20(2):85-91.
71. Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clinical chemistry*. 2009;55(4):623-31.
72. Lodewijk L, Prins AM, Kist JW, Valk GD, Kranenburg O, Rinkes IHMB, et al. The value of miRNA in diagnosing thyroid cancer: A systematic review. *Cancer Biomarkers*. 2012;11(6):229-38.
73. Tetzlaff MT, Liu A, Xu X, Master SR, Baldwin DA, Tobias JW, et al. Differential expression of miRNAs in papillary thyroid carcinoma compared to multinodular goiter using formalin fixed paraffin embedded tissues. *Endocrine Pathology*. 2007;18(3):163-73.
74. Mogilyansky E, Rigoutsos I. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell death and differentiation*. 2013;20(12):1603-14.
75. Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*. 2008;132(5):875-86.

-
76. Lu Y, Thomson JM, Wong HY, Hammond SM, Hogan BL. Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells. *Developmental biology*. 2007;310(2):442-53.
77. Mu P, Han YC, Betel D, Yao E, Squatrito M, Ogdowski P, et al. Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes & development*. 2009;23(24):2806-11.
78. Eichelser C, Flesch-Janys D, Chang-Claude J, Pantel K, Schwarzenbach H. Deregulated serum concentrations of circulating cell-free microRNAs miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in human breast cancer development and progression. *Clinical chemistry*. 2013;59(10):1489-96.
79. Zhao S, Yao D, Chen J, Ding N. Circulating miRNA-20a and miRNA-203 for screening lymph node metastasis in early stage cervical cancer. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2013;17(8):631-6.
80. Baraniskin A, Kuhnenn J, Schlegel U, Chan A, Deckert M, Gold R, et al. Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as marker for primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *Blood*. 2011;117(11):3140-6.
81. Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Takeshita H, Kosuga T, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *British journal of cancer*. 2010;102(7):1174-9.
82. Olive V, Li Q, He L. mir-17-92: a polycistronic oncomir with pleiotropic functions. *Immunological reviews*. 2013;253(1):158-66.
83. Gu R, Huang S, Huang W, Li Y, Liu H, Yang L, et al. MicroRNA-17 family as novel biomarkers for cancer diagnosis: a meta-analysis based on 19 articles. *Tumour*

biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2016;37(5):6403-11.

84. Yuan ZM, Yang ZL, Zheng Q. Deregulation of microRNA expression in thyroid tumors. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2014;15(3):212-24.

85. Yang Z, Yuan Z, Fan Y, Deng X, Zheng Q. Integrated analyses of microRNA and mRNA expression profiles in aggressive papillary thyroid carcinoma. *Molecular medicine reports*. 2013;8(5):1353-8.

86. Zhao S, Li J. Sphingosine-1-phosphate induces the migration of thyroid follicular carcinoma cells through the microRNA-17/PTK6/ERK1/2 pathway. *PloS one*. 2015;10(3):e0119148.

87. Liu L, Yang J, Zhu X, Li D, Lv Z, Zhang X. Long noncoding RNA H19 competitively binds miR-17-5p to regulate YES1 expression in thyroid cancer. *The FEBS journal*. 2016;283(12):2326-39.

88. Tao ZH, Wan JL, Zeng LY, Xie L, Sun HC, Qin LX, et al. miR-612 suppresses the invasive-metastatic cascade in hepatocellular carcinoma. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210(4):789-803.

89. Tang J, Tao ZH, Wen D, Wan JL, Liu DL, Zhang S, et al. MiR-612 suppresses the stemness of liver cancer via Wnt/beta-catenin signaling. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;447(1):210-5.

90. Sheng L, He P, Yang X, Zhou M, Feng Q. miR-612 negatively regulates colorectal cancer growth and metastasis by targeting AKT2. *Cell death & disease*. 2015;6:e1808.

91. Greene FL. The American Joint Committee on Cancer: updating the strategies in cancer staging. *Bulletin of the American College of Surgeons*. 2002;87(7):13-5.

-
92. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001;29(9):e45.
93. Martinez VD, Vucic EA, Pikor LA, Thu KL, Hubaux R, Lam WL. Frequent concerted genetic mechanisms disrupt multiple components of the NRF2 inhibitor KEAP1/CUL3/RBX1 E3-ubiquitin ligase complex in thyroid cancer. *Molecular cancer*. 2013;12(1):124.
94. Teshiba R, Tajiri T, Sumitomo K, Masumoto K, Taguchi T, Yamamoto K. Identification of a KEAP1 germline mutation in a family with multinodular goitre. *PloS one*. 2013;8(5):e65141.
95. Geng WJ, Shan LB, Wang JS, Li N, Wu YM. [Expression and significance of Nrf2 in papillary thyroid carcinoma and thyroid goiter]. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]*. 2017;39(5):367-8.
96. Wolinski K, Stangierski A, Szczepanek-Parulska E, Gurgul E, Budny B, Wrotkowska E, et al. VEGF-C Is a Thyroid Marker of Malignancy Superior to VEGF-A in the Differential Diagnostics of Thyroid Lesions. *PloS one*. 2016;11(2):e0150124.
97. Fiedler J, Thum T. New Insights Into miR-17-92 Cluster Regulation and Angiogenesis. *Circulation research*. 2016;118(1):9-11.
98. Chamorro-Jorganes A, Lee MY, Araldi E, Landskroner-Eiger S, Fernandez-Fuertes M, Sahraei M, et al. VEGF-Induced Expression of miR-17-92 Cluster in Endothelial Cells Is Mediated by ERK/ELK1 Activation and Regulates Angiogenesis. *Circulation research*. 2016;118(1):38-47.
99. Greenberg E, Hajdu S, Nemlich Y, Cohen R, Itzhaki O, Jacob-Hirsch J, et al. Differential regulation of aggressive features in melanoma cells by members of the miR-17-92 complex. *Open biology*. 2014;4(6):140030.

100. Ye W, Lv Q, Wong CK, Hu S, Fu C, Hua Z, et al. The effect of central loops in miRNA:MRE duplexes on the efficiency of miRNA-mediated gene regulation. *PloS one*. 2008;3(3):e1719.
101. Karginov FV, Hannon GJ. Remodeling of Ago2-mRNA interactions upon cellular stress reflects miRNA complementarity and correlates with altered translation rates. *Genes & development*. 2013;27(14):1624-32.
102. Pillai MM, Gillen AE, Yamamoto TM, Kline E, Brown J, Flory K, et al. HITS-CLIP reveals key regulators of nuclear receptor signaling in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2014;146(1):85-97.
103. Rojo AI, Rada P, Mendiola M, Ortega-Molina A, Wojdyla K, Rogowska-Wrzesinska A, et al. The PTEN/NRF2 axis promotes human carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(18):2498-514.

7. ANEXOS

Questionário do Projeto

I. IDENTIFICAÇÃO

Nome: Prontuário:
 Data de nascimento:/...../..... Idade: Local:.....
 Sexo:Etnia: Profissão atual:
 Endereço: Rua Nº..... Fone:
 Bairro: Cidade: CEP:.....
 DataColeta:...../...../.....

II. DADOS DO TUMOR Data de diagnóstico:/...../..... Biópsia () PAAF ()

TNM: Clínico: T () N () M () Tipo:
 Tumor primário: () Sim () Não Local:
 Recidiva: () Sim () Não Local:
 Início do diagnóstico do câncer: Mês () Ano () Tipo:
 Cirurgia: () Sim () Não Tipo: Data:/...../.....
 Radioterapia: () Sim () Não Data de início - Período:/...../.....
 Quimioterapia: () Sim () Não Data de início..... - Período:/...../.....

III. FATORES DE RISCO AMBIENTAL

Exposição ao tabaco: () Sim () Não () Ex-fumante
 Início: Término: Duração:
 Consumo de álcool: () Sim () Não () Ex-etilista
 Início: Término: Duração:
 Você alguma vez já realizou exames de Raios-X e Tomografia na região da cabeça e pescoço ? () S () N
 Nº vezes.....

IV. HISTÓRICO MÉDICO PESSOAL E FAMILIAR

Antecedentes Pessoais

() Hipotireoidismo há ___ anos
 () Hipertireoidismo há ___ anos
 () Bócio há ___ anos
 () Nódulo há ___ anos
 () Doença de Graves há ___ anos
 Cirurgias anteriores: () S () N Tipo: _____
 Tipo: _____
 Tratamentos anteriores () S () N Tipo: _____

Antecedentes Familiares: Grau de Parentesco: _____

() Câncer Local: _____
 () Hipotireoidismo há ___ anos
 () Hipertireoidismo há ___ anos
 () Bócio há ___ anos
 () Nódulo há ___ anos
 () Doença de Graves há ___ anos
 Cirurgias anteriores: () S () N

Data: ____/____/____

 Responsável pela entrevista

Heredograma Câncer

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Conselho Nacional de Saúde, resolução 466/12)

Título da Pesquisa: Investigação do papel do miR-187 e do gene *NFE2L2* em carcinoma e hiperplasia de tireoide.

Pesquisadora Responsável: Eny Maria Goloni Bertollo – UPGEM: Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular da **Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.**

A) o Sr (a) está sendo convidado (a) a participar desta pesquisa que visa obter maior conhecimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer de tireoide (glândula localizada no pescoço), que poderá melhorar o nosso conhecimento sobre esse tumor e, portanto oferecer novas possibilidades de diagnóstico e de melhora no tratamento e consequentemente na qualidade de vida;

B) este estudo tem como objetivos: 1) Coletar informações da história e obter dados clínicos dos prontuários médicos dos pacientes com câncer de tireoide atendidos no Serviço de Atendimento Ambulatorial vinculado ao Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base / Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP. E dos pacientes atendidos pelos professores Dr. José Victor Maniglia. 2) Analisar alterações em genes (material hereditário) com a finalidade de esclarecer o papel de fatores genéticos no desenvolvimento do tumor;

C) para este estudo serão utilizados dois grupos de pessoas: 1) pacientes com câncer de tireoide; 2) pacientes com hiperplasia de tireoide; 3) indivíduos do grupo controle, não portadores do tumor e de outras doenças crônicas;

D) o estudo será feito utilizando-se de uma amostra de biopsia, que será colhida no Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base / Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP sem qualquer risco para minha saúde;

E) o material genético, ou seja, hereditário, extraído será utilizado para esta pesquisa e armazenado na Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular, todas as informações serão mantidas em sigilo (codificadas). Para novos projetos, haverá nova submissão para avaliação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP).

F) todas as informações por mim fornecidas por meio do questionário e os resultados serão mantidos em sigilo e que, estes últimos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas.

G) O resultado individual não tem significado para o paciente. Trata-se de uma variante populacional que trará benefícios apenas em estudos de grandes amostras realizadas em diferentes países. No futuro poderá ser considerado um marcador específico para o tipo de câncer estudado. Os resultados serão divulgados em conjunto para todos os indivíduos após o término da pesquisa a ser aguardado com o médico responsável pelo paciente.

H) se eu concordar em participar desta pesquisa e se eu concordar com a retirada e uso de minha biopsia, do modo descrito acima, não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se eu não concordar, em doar ou decidir retirar meu consentimento em qualquer momento, minha decisão não influenciará, de nenhum modo, o meu tratamento;

I) esse estudo é importante porque pode colaborar para conhecimento científico dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do tumor.

Declaro que, após ter convenientemente esclarecido pelo pesquisador, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo sem que tenha sido submetido a qualquer tipo de pressão.

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

Nome do(a) participante:

Representante legal:

RG do prontuário médico:

Data:...../...../...../ Assinatura:.....

Declaração de responsabilidade: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para esclarecimento de qualquer dúvida sobre o estudo pelos endereços abaixo indicados.

Nome do(a) pesquisador:

Data:...../...../...../ Assinatura:.....

Inscrição no Conselho Regional:

Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo – Departamento de Biologia Molecular

Av. Brigadeiro Faria Lima, no. 5416

FAMERP - Faculdade de Medicina de S.J. Rio Preto

São José do Rio Preto, SP - CEP 15090-000 Fone: (17) 3201-5720 e-mail: eny.goloni@famerp.br

Em caso de dúvidas contatar a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Av. Brigadeiro Faria Lima, n.º 5416, Telefone: (0xx17) 3201-5700, Ramal 5813.

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – CEP/FAMERP

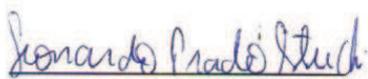
Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 – Vila São Pedro – Fone/fax: 17 –32015813
São José do Rio Preto – SP

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que:

- Tenho ciência dos termos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e que cumprirei os mesmos;
- Que tornarei público os resultados do projeto de pesquisa "Investigação do papel do miR-187 e do gene NFE2L2 em carcinoma e hiperplasia de tireoide." sejam eles favoráveis ou não;
- Que há infraestrutura necessária para o desenvolvimento do referido projeto.

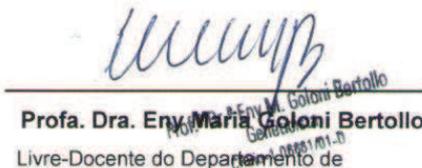
São José do Rio Preto, 22 de Julho de 2013.



Leonardo Prado Stuchi

Pós-Graduanda Programa de
Pós Graduação em Ciências da Saúde

RESPONSÁVEL PELO PROJETO



Profa. Dra. Eny Maria Coloni Bertollo

Livre-Docente do Departamento de
Biologia Molecular - FAMERP

ORIENTADOR



Prof. Dr. José Victor Maniglia

Departamento de Otorrinolaringologia e
Cirurgia de Cabeça e Pescoço

COLABORADOR



Dr. João Armando Padovani Junior

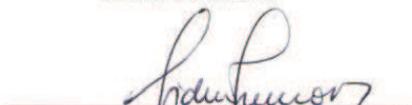
Chefe do Departamento de Otorrinolaringologia
e Cirurgia de Cabeça e Pescoço

COLABORADOR



Dr. Aldenés Albanezi Borin

Diretor Administrativo do Ambulatório
do Hospital de Base



Prof. Dr. Sidney Pinheiro Júnior

Chefe do Departamento de

Biologia Molecular
Prof. Dr. Sidney Pinheiro Júnior
Chefe do Depto. de Biologia Molecular
FAMERP



Dr. Horácio José Ramalho

Diretor Executivo FUNFARME