



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA CARVALHO GARCIA

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE MicroRNAs *IN SILICO* E IDENTIFICAÇÃO
DAS PUNÇÕES DE NÓDULOS DE TIREOIDE COM CATEGORIA
CITOPATOLÓGICAS DO SISTEMA BETHESDA.

CURITIBA - PR

2023

AMANDA CARVALHO GARCIA

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE MicroRNAs *IN SILICO* E IDENTIFICAÇÃO
DAS PUNÇÕES DE NÓDULOS DE TIREOIDE COM CATEGORIA
CITOPATOLÓGICAS DO SISTEMA BETHESDA.

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina Interna e Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Hans Graf.

Coorientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Santos Cavalcanti.

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Martins Collaço.

CURITIBA-PR

2023

G216 Garcia, Amanda Carvalho
Caracterização funcional de micrnas in silico e identificação das punções de nódulos de tireoide com categoria citopatológicas do Sistema Bethesda [recurso eletrônico] / Amanda Carvalho Garcia. – Curitiba, 2023.

Tese(doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.
Orientador: Prof. Dr. Hans Graf
Coorientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Santos Cavalcanti
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Martins Collaço

1. MicroRNAs. 2. RNA. 3. Nódulo da Glândula Tireoide.
I. Graf, Hans. II. Cavalcanti, Teresa Cristina Santos. III. Collaço, Luiz Martins. IV. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

ATA Nº001

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTORA EM MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE**

No dia dezoito de janeiro de dois mil e vinte e tres às 07:30 horas, na sala <https://bit.ly/3jMdqIQ>, MICROSOFT TEAMS, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese da doutoranda **AMANDA CARVALHO GARCIA**, intitulada: **"CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE MICRO RNAs IN SÍLICO E IDENTIFICAÇÃO DAS PUNÇÕES DE NÓDULOS DE TIREÓIDE COM CATEGORIA CITOPATOLÓGICAS DO SISTEMA BETHESDA."**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: LUIZ MARTINS COLLAÇO (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA MEDICA, UFPR), VERA LUCIA PEREIRA DOS SANTOS (CENTRO UNIVERSITÁRIO INTERNACIONAL), MAGDA ELINE GUERRART PORTUGAL (FAC. HERRERO), ALLAN FERNANDO GIOVANINI (FACULDADE EVANGÉLICA MACKENZIE DO PARANÁ - FEMPAR), SOLENA ZIEMER KUSMA FIDALSKI (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutora está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, LUIZ MARTINS COLLAÇO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 18 de Janeiro de 2023.

Assinatura Eletrônica
18/01/2023 09:30:08.0
LUIZ MARTINS COLLAÇO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
18/01/2023 09:27:03.0
VERA LUCIA PEREIRA DOS SANTOS
Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO INTERNACIONAL)

Assinatura Eletrônica
18/01/2023 09:31:23.0
MAGDA ELINE GUERRART PORTUGAL
Avaliador Externo (FAC. HERRERO)

Assinatura Eletrônica
20/01/2023 23:30:27.0
ALLAN FERNANDO GIOVANINI
Avaliador Externo (FACULDADE EVANGÉLICA MACKENZIE DO
PARANÁ - FEMPAR)

Assinatura Eletrônica
19/01/2023 07:44:54.0
SOLENA ZIEMER KUSMA FIDALSKI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua General Carneiro, 181 - Prédio Central - 11º Andar - Curitiba - Paraná - Brasil
CEP 80060-150 - Tel: (41) 3360-1099 - E-mail: ppgmedicina@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 248757

**Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaossinaturas.jsp>
e insira o código 248757**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **AMANDA CARVALHO GARCIA** intitulada: "**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE MICRO RNAs IN SILICO E IDENTIFICAÇÃO DAS PUNÇÕES DE NÓDULOS DE TIREOIDE COM CATEGORIA CITOPATOLÓGICAS DO SISTEMA BETHESDA.**", que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 18 de Janeiro de 2023.

Assinatura Eletrônica
18/01/2023 09:30:08.0
LUIZ MARTINS COLLAÇO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
18/01/2023 09:27:03.0
VERA LUCIA PEREIRA DOS SANTOS
Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO INTERNACIONAL)

Assinatura Eletrônica
18/01/2023 09:31:23.0
MAGDA ELINE GUERRART PORTUGAL
Avaliador Externo (FAC. HERRERO)

Assinatura Eletrônica
20/01/2023 23:30:27.0
ALLAN FERNANDO GIOVANINI
Avaliador Externo (FACULDADE EVANGÉLICA MACKENZIE DO
PARANÁ - FEMPAR)

Assinatura Eletrônica
19/01/2023 07:44:54.0
SOLENA ZIEMER KUSMA FIDALSKI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua General Cameiro, 181 - Prédio Central - 11º Andar - Curitiba - Paraná - Brasil
CEP 80060-150 - Tel: (41) 3360-1099 - E-mail: ppgmedicina@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 248757

**Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 248757**

Dedicatória

Dedico esta Tese ao Senhor Jesus Cristo, Maravilhoso, Conselheiro, Deus Forte, Pai da Eternidade e Príncipe da Paz.

Aos meus pais, Mara Lúcia e Newton Cesar.

Aos meus irmãos, Manoela e Jair Cesar.

Aos meus afilhados e sobrinhos, Maria Eduarda e Benjamim Emanuel.

Aos meus avós, Ana Henrietta e Jair Batista.

Aos meus avós, Alba e Manuel (in memoriam).

A minha família, pelo amor incondicional, por quem sou e por tudo o que alcancei.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela maravilhosa e inestimável oportunidade de trabalhar com o Prof. Dr. Hans Graf, orientador dedicado a ensinar com temperança. Obrigada por me ensinar os passos da pesquisa científica, pelas discussões e pela amizade.

A Dr^a. Tereza Teresa Cristina Santos Cavalcanti pelo apoio, discussões, sugestões e coorientação.

Agradeço ao professor Dr. Luiz Martins Collaço pela sua orientação, conselhos de sabedoria e ensinamentos fundamentais para minha formação, e por me presidir a banca de defesa.

A Prof^a. Dr^a Solena Solena Ziemer Kusma Fidalski do Departamento de Saúde Coletiva da UFPR, pela contribuição na realização deste trabalho, pela amizade, e por fazer parte da banca interna.

A Prof^a. Dr^a Magda Eline Guerrart Portugal pelos conselhos, discussões e amizade, e por fazer parte da banca interna.

A Prof^a. Dr^a Kadija Rahal Chrisostomo do Departamento de Tocoginecologia da UFPR, pela amizade, pelos bons momentos compartilhados, e por fazer parte banca interna.

A Prof^a. Dr^a Vera Lúcia Pereira Santos do Centro Universitário Internacional, por toda ajuda, paciência, amizade e bons momentos compartilhados, e por fazer parte banca externa.

Ao Prof. Dr. Allan Fernando Giovanini do Programa de Pós-graduação Stricto sensu em Princípios de cirurgia Faculdade Evangélica Mackenzie, pela contribuição e por fazer parte da banca externa.

A Prof^a. Dr^a Sonia Mara Raboni, médica do laboratório de virologia e chefe da Unidade de Infectologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela contribuição fundamental para a realização da pesquisa.

A Ana Cristina Matheus Medeiros Chefe da Unidade de Anatomia Patológica do Complexo Hospital de Clínicas - HC da Universidade Federal do Paraná e a Solange de Fátima Cararo, pela imensurável ajuda e amizade durante o desenvolvimento do doutorado, onde orientou e viabilizou a coleta dos dados nos arquivos de lâmina na patologia.

Aos Coordenadores Prof. Dr. Emilton Lima Junior e Prof^a. Dr^a Iara Jose de Messias Reason do Programa de Pós-graduação, pela contribuição na realização

deste trabalho, pela amizade e por fazer parte da toda construção acadêmico científica durante o doutoramento.

A Coordenação, ao Colegiado e aos Professores do Programa Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde por apoiar a realização deste trabalho e poder contribuir como Representante Discente ao findar dos 4 anos e todo aprendizado concedido.

Ao professor Dr. Odery Ramos Junior e Prof^a. Dr^a. Marise Bueno Zonta pela oportunidade de trabalhar na disciplina Seminários Integrados e aos demais professores do grupo pelos conselhos sábios.

Ao Serviço de Endocrinologia e Metabologia - Complexo Hospital de Clínicas - UFPR/Ebserh, ao ambulatório de tireoide, pela contribuição para a realização deste trabalho.

A Família SEMPR, pelo compartilhar das experiências clínicas e científicas, pelos ensinamentos, pelas palavras de sabedoria, pela amizade e unidade.

Aos meus Pastores, Pastora Nelci, Pastor Agostinho Basso e ao Pastor Jorge Basso, pelas orações, palavras de sabedoria que trouxeram renovo e esperança de persistir sempre, pois as exigências de Deus são para os íntimos, aos pastores e irmãos da 4^o Igreja do Evangelho Quadrangular pela comunhão e orações de conforto.

Agradeço a todos os colegas mestrando e doutorandos do Programa de Pós-graduação e Medicina Interna da UFPR e principalmente aos amigos Valéria Kapp, Magda Eline Guerrart Portugal, Profa. Vera Lúcia dos Santos e a Profa. Solena Kusma pela amizade, compartilhar de experiências e ensinamentos acerca do programa, pelo cuidado, ao Bryan de Oliveira, Rogério da Luz, por toda ajuda, paciência, amizade e bons momentos compartilhados, onde formamos uma equipe extraordinária em conjunto com os Coordenadores, Secretário, Professores e Monitores, unidos em missão em prol aos mestrandos (as) e doutorandos (as) do Programa.

Aos estatísticos Sabrina Wolenski Bartoszewski e Prof. Dr. Marcos Maia Faculdade Santa Cruz e Estatístico do Instituto Federal do Paraná pela análise estatística dos dados do presente trabalho.

As agências financiadoras CAPES, pela bolsa de estudo e pelo fomento, ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC/UFPR pela aprovação do projeto de doutorado.

Eu irei adiante de ti, e endireitarei os caminhos tortuosos; quebrarei as portas de
bronze, e despedaçarei os ferrolhos de ferro.
Dar-te-ei os tesouros escondidos, e as riquezas encobertas, para que saibas que eu
sou o Senhor, o Deus de Israel, que te chama pelo teu nome.

Isaías 45:2,3 (Bíblia NVI)

Mas Deus escolheu as coisas loucas deste mundo para confundir as sábias; e Deus
escolheu as coisas fracas deste mundo para confundir as fortes;
E Deus escolheu as coisas vis deste mundo, e as desprezíveis, e as que não são,
para aniquilar as que são;
Para que nenhuma carne se glorie perante ele.
Mas vós sois dele, em Jesus Cristo, o qual para nós foi feito por Deus sabedoria, e
justiça, e santificação, e redenção;
Para que, como está escrito: Aquele que se gloria glorie-se no Senhor.

1 Coríntios 1:27-31 (Bíblia)

RESUMO

Estudos sobre o mapeamento descritivo dos casos atendidos no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) sejam escassos, os registros do Sistema de Informações Hospitalares (SIH) fornecem informações que possibilitam conhecer a situação das biópsias de tireoide. Ensaio *in silico* com microRNAs (pequenos RNAs não codificadores de proteínas) atuam na regulação pós-transcricional na região 3'UTR da expressão gênica influenciando na tradução dos mRNA alvo, podendo levar a inibição da tradução ou degradação do mRNAs, e trazem novos conhecimentos na tumorigênese tireoidiana. Os objetivos do presente trabalho foram delineados para caracterização funcional de microRNAs *in silico*, a identificação das punções de nódulos de tireoide com categoria citopatológicas do Sistema Bethesda. Foram coletados dados de 449 pacientes submetidos à punção aspirativa por agulha fina (PAAF), cadastrados pelo Sistema de Informação Hospitalar (SIH), no período de janeiro de 2017 a janeiro de 2022, e análise citopatológica das lâminas de PAAF de 81 casos. Utilizamos modelagem de sistemas biológicos *in silico* para identificar microRNAs nas regiões dos intrônicos transcritos do gene BRAF. A partir dos dados do recrutamento das 449 citopunções, a média de idade foi de 56 anos. Evidenciamos uma frequência de 88,17% de doença nodular no sexo feminino. A maioria dos casos foram da categoria Bethesda II, e representam a maioria dos casos submetidos a tireoidectomia, sendo (56,55%) tireoidectomia parcial seguida de 44,45% a cirurgia de tireoide total. Os 81 casos analisados são punções de lobo direito, corados em Giemsa, com coloide ausente e aspecto celular discreto. Dentre os transcritos intrônicos do gene BRAF não codificadores de proteínas, identificamos alvos putativos para assinatura de microRNAs mir-1255, mir-562, mir-544 e mir-574, sendo que um RNAm alvo do mir-562 é o gene EIF1AX descrito recentemente como um novo gene relacionado ao câncer de tireoide. Os achados clínicos de doença nodular neste grupo de estudo submetidos à punção aspirativa por agulha fina (PAAF) foram classificados como "benignos", assim como os resultados da anatomia patológica com diagnóstico compatível com lesão benigna, seguidos daqueles tireoidectomizados por suspeita de malignidade. A prevalência de nódulos repunccionados foram na categoria Atipia de Significado Indeterminado ou Lesão Folicular de Significado Indeterminado (AUS\SFN). Consideremos a importância de estudos descritivos, ultrassonográficos e citológicos das citopunções, que tendem a compreender as principais características clínicas que afetam a doença nodular da tireoide, bem como, o reconhecimento dos mecanismos pós-transcricionais regulados por esses pequenos RNA, contribuem no diagnóstico clínico, corroborando na decisão terapêutica não só em casos de nódulos tireoidianos indeterminados, como no entendimento da doença nodular de modo geral.

Palavras-chave: Bethesda; PAAF; RNA não codificadores (microRNA); regiões intrônicas - BRAF.

ABSTRACT

Studies on the descriptive mapping of cases treated within the scope of the Unified Health System (SUS) are scarce, the records of the Hospital Information System (SIH) provide information that makes it possible to know the status of thyroid biopsies. *In silico* assays with microRNAs (small non-protein coding RNAs) act in the post-transcriptional regulation in the 3'UTR region of gene expression, influencing the translation of target mRNAs, which may lead to inhibition of translation or degradation of mRNAs, and bring new knowledge in thyroid tumorigenesis. The objectives of the present work were outlined for the functional characterization of microRNAs *in silico*, the identification of punctures of thyroid nodules with the cytopathological category of the Bethesda System. Data were collected from 449 patients who underwent fine needle aspiration (FNA), registered by the Hospital Information System (SIH), from January 2017 to January 2022, and cytopathological analysis of FNA slides from 81 cases. We used *in silico* modeling of biological systems to identify microRNAs in the regions of the intronic transcripts of the BRAF gene. From the recruitment data of the 449 cytopunctures, the mean age was 56 years. We evidenced a frequency of 88.17% of nodular disease in females. Most cases were in the Bethesda II category, and represent the majority of cases undergoing thyroidectomy, with (56.55%) partial thyroidectomy followed by 44.45% total thyroid surgery. The 81 cases analyzed were punctures of the right lobe, stained with Giemsa, with no colloid and a discreet cellular appearance. Among the non-protein coding BRAF gene intronic transcripts, we identified putative targets for signature of microRNAs mir-1255, mir-562, mir-544 and mir-574, and one mRNA target of mir-562 is the recently described EIF1AX gene as a new gene related to thyroid cancer. The clinical findings of nodular disease in this study group submitted to fine needle aspiration (FNAB) were classified as "benign", as well as the results of the pathological anatomy with a diagnosis compatible with a benign lesion, followed by those who underwent thyroidectomy due to suspicion of malignancy. The prevalence of repunctured nodules were in the category Atypia of Undetermined Significance or Follicular Lesion of Undetermined Significance (AUS\SFN). Let us consider the importance of descriptive, ultrasonographic and cytological studies of cytopunctures, which tend to understand the main clinical characteristics that affect nodular thyroid disease, as well as the recognition of post-transcriptional mechanisms regulated by these small RNA, contribute to the clinical diagnosis, corroborating the therapeutic decision not only in cases of indeterminate thyroid nodules, but also in understanding the nodular disease in general.

Key-words: Bethesda; PAAF; non-coding RNA (microRNA); intronic regions - BRAF.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - AS VIAS DE SINALIZAÇÃO EM CÂNCER DE TIREOIDE.....	39
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DAS REGIÕES CONSERVADAS DAS PROTEÍNAS RAFS (CR1, CR2 E CR3).	40
FIGURA 3 - VIA DE SINALIZAÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR MITOGÊNIO.....	41
FIGURA 4 - CLASSES DE RNAS E SUAS RESPECTIVAS FUNÇÕES.....	47
FIGURA 5 - VARIÁVEIS ANALISADAS DAS 449 CITOPUNÇÕES.....	53
FIGURA 6 - FLUXOGRAMA ANÁLISE COMPUTACIONAL <i>IN SÍLICO</i>	56
FIGURA 7 - INTERFACE DO BLAST FERRAMENTA DO NCBI DE ALINHAMENTO DE SEQUENCIAS LOCAL.	59
FIGURA 8 – INTERFACE DO MIRBASE FERRAMENTA BANCO DE DADOS DE MICRORNAS.	60
FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DAS CITOPUNÇÕES BETHESDA I.....	65
FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DAS CITOPUNÇÕES BETHESDA II.....	69
FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DAS CITOPUNÇÕES BETHESDA III.....	75
FIGURA 12 - FLUXOGRAMA DAS CITOPUNÇÕES BETHESDA IV.	78
FIGURA 13 - FLUXOGRAMA DAS CITOPUNÇÕES BETHESDA V.	82
FIGURA 14 - FLUXOGRAMA DAS CITOPUNÇÕES BETHESDA VI.	85
FIGURA 15 - ESFREGAÇOS CITOLÓGICOS DAS LÂMINAS DE CITOPUNÇÃO DE TIREOIDE.	100
FIGURA 16 - MICROSCOPIA DA CITOPUNÇÃO DE TIREOIDE DA CATEGORIA BETHESDA I.....	101
FIGURA 17 - MICROSCOPIA DA CITOPUNÇÃO DE TIREOIDE DA CATEGORIA BETHESDA II.....	104
FIGURA 18 - MICROSCOPIA DA CITOPUNÇÃO DE TIREOIDE DA CATEGORIA BETHESDA III.....	105
FIGURA 19 - MICROSCOPIA DA CITOPUNÇÃO DE TIREOIDE DA CATEGORIA BETHESDA IV.	107
FIGURA 20 – MICROSCOPIA DA CITOPUNÇÃO DE TIREOIDE DA CATEGORIA BETHESDA V.	110
FIGURA 21 – MICROSCOPIA DA CITOPUNÇÃO DE TIREOIDE DA CATEGORIA BETHESDA VI.	113

FIGURA 22 – RESULTADO DA PREDIÇÃO IN SÍLICO PELA FERRAMENTA INFERNAL.1.1.2.	118
FIGURA 23 - RESULTADO DA PREDIÇÃO IN SÍLICO PELA FERRAMENTA INFERNAL.1.1.2.	119
FIGURA 24 - TESTE DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLOS DE NEMENYI.	124
FIGURA 25 - PAINEL DA INTERAÇÃO MRNA ALVO DO HSA-MIR-652.....	125

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - HISTOGRAMA IDADE.	62
GRÁFICO 2 - BOX PLOT DAS IDADES POR SEXO.	63
GRÁFICO 3 - BOX PLOT DAS IDADES POR BETHESDA.	89
GRÁFICO 4 - QUANTITATIVO DE PACIENTES POR TIPO DE TUMOR.	90
GRÁFICO 5 - LOCALIZAÇÃO DO NÓDULO VERSUS CATEGORIA BETHESDA.	92
GRÁFICO 6 - COLORAÇÃO DOS NÓDULOS TIREOIDIANOS VERSUS CATEGORIA BETHESDA.	98
GRÁFICO 7 - FUNDO DOS ESFREGAÇOS CITOLÓGICOS.	99
GRÁFICO 8 - DENSIDADE DAS SEQUÊNCIAS INTRÔNICAS BRAF, GENE BRAF E GRCH 38.P 14.	120

LISTA DE QUADROS DE QUADROS

QUADRO 1 - AVALIAÇÃO CLÍNICA DO NÓDULO DE TIREOIDE.	26
QUADRO 2 - CARACTERÍSTICAS ULTRASSONOGRÁFICAS, RISCO DE MALIGNIDADE SEGUNDO A ATA E ORIENTAÇÃO PARA PUNÇÃO ASPIRATIVA POR AGULHA FINA (PAFF) DE NÓDULOS TIREOIDIANOS.	27
QUADRO 3 - ESQUEMA DE CLASSIFICAÇÃO DA OMS DE NEOPLASIAS DA TIREOIDE, 5ª EDIÇÃO.	28
QUADRO 4 - RISCO DE MALIGNIDADE E CONDUTA CLÍNICA RECOMENDADA.	30
QUADRO 5 - CATEGORIAS DE DIAGNÓSTICO SEGUNDO O SISTEMA BETHESDA 2017 PARA RELATÓRIOS CITOPATOLÓGICOS DE TIREOIDE.	31

QUADRO 6 - CLASSIFICAÇÃO DO AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER/TUMOR NODES METASTASIS PARA CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIREOIDE / 8ª EDIÇÃO.	35
QUADRO 7 - IMUNO-HISTOQUÍMICA EM DIFERENTES CARCINOMAS DE TIREOIDE.	37
QUADRO 8 - CLASSES DE RNAAS E SUAS RESPECTIVAS FUNÇÕES.	46
QUADRO 9 - EXEMPLOS DE ALGUNS MICRORNAS E SUAS RESPECTIVAS ASSOCIAÇÕES.	49
QUADRO 10 - ANÁTOMO PATOLÓGICO COM IMUNO-HISTOQUÍMICA.	66
QUADRO 11 - ANÁTOMO PATOLÓGICO COM REVISÃO DE LÂMINA.	67
QUADRO 12 - REVISÃO DE ANÁTOMO PATOLÓGICO COM IMUNO- HISTOQUÍMICA.	72
QUADRO 13 - ANÁTOMO PATOLÓGICO COM IMUNO-HISTOQUÍMICA.	73
QUADRO 14 - ANÁTOMO PATOLÓGICO COM IMUNO-HISTOQUÍMICA BETHESDA III.	77
QUADRO 15 - REVISÃO DE ANÁTOMO PATOLÓGICO COM IMUNO- HISTOQUÍMICA.	77
QUADRO 16 - ANÁTOMO PATOLÓGICO COM IMUNO-HISTOQUÍMICA.	81
QUADRO 17 - ANÁTOMO PATOLÓGICO COM IMUNO-HISTOQUÍMICA BETHESDA V.	84
QUADRO 18 - ANÁTOMO PATOLÓGICO COM IMUNO-HISTOQUÍMICA BETHESDA VI.	87
QUADRO 19 - REVISÃO DE ANÁTOMO PATOLÓGICO BETHESDA VI.	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - TRANSCRITOS DO GENE BRAF.	57
TABELA 2 - SEXO DOS PACIENTES.	62
TABELA 3 - ANÁTOMO PATOLÓGICO SEM IMUNO-HISTOQUÍMICA.	66
TABELA 4 - ANÁTOMO PATOLÓGICO BETHESDA I.	68
TABELA 5 - ANÁTOMO PATOLÓGICO SEM IMUNO-HISTOQUÍMICA.	70
TABELA 6 - ANÁTOMO PATOLÓGICO MALIGNO BETHESDA II.	71
TABELA 7 - ANÁTOMO PATOLÓGICO BENIGNO BETHESDA III.	76

TABELA 8 - ANÁTOMO PATOLÓGICO MALIGNO BETHESDA III.	76
TABELA 9 - CITOPUNÇÕES DA CLASSIFICAÇÃO BETHESDA IV.	79
TABELA 10 - ANÁTOMO PATOLÓGICO MALIGNO E BENIGNO BETHESDA IV. ...	80
TABELA 11 - CITOPUNÇÕES BETHESDA IV.	83
TABELA 12 - CITOPUNÇÕES BETHESDA VI.	86
TABELA 13 - - FREQUÊNCIA DO BETHESDA POR SEXO.	88
TABELA 14 - FREQUÊNCIA DE PACIENTES COM REPUNÇÃO POR BETHESDA.	89
TABELA 15 - CASOS DOS BETHESDA QUE FORAM SUBMETIDOS A CIRURGIA TOTAL E PARCIAL.	91
TABELA 16 - ACHADOS ULTRASSONOGRÁFICOS VERSUS CATEGORIA BETHESDA.	92
TABELA 17 - COMPOSIÇÃO DOS NÓDULOS TIREOIDIANOS VERSUS CATEGORIA BETHESDA.	93
TABELA 18 - ECOGENICIDADE DOS NÓDULOS TIREOIDIANOS VERSUS CATEGORIA BETHESDA.	94
TABELA 19 - MARGEM, CISTIFICAÇÃO E CALCIFICAÇÃO DOS NÓDULOS TIREOIDIANOS VERSUS CATEGORIA BETHESDA.	95
TABELA 20 - ELEMENTO TIREOIDIANOS COLOIDE DOS NÓDULOS TIREOIDIANOS VERSUS CATEGORIA BETHESDA	96
TABELA 21 - COLORAÇÃO DOS NÓDULOS TIREOIDIANOS VERSUS CATEGORIA BETHESDA.	97
TABELA 22 - COLORAÇÃO DOS NÓDULOS TIREOIDIANOS VERSUS CATEGORIA BETHESDA.	98
TABELA 23 – CÉLULAS FOLICULARES NOS ESFREGAÇOS CITOLÓGICOS. ...	100
TABELA 24 - ARRANJO DAS CÉLULAS FOLICULARES VERSUS CATEGORIA BETHESDA.	102
TABELA 25 - CÉLULAS OXIFILÍCAS VERSUS CATEGORIA BETHESDA.	104
TABELA 26 - ARRANJO DAS CÉLULAS OXIFILÍCAS VERSUS CATEGORIA BETHESDA.	106
TABELA 27 - ASPECTO DAS CÉLULAS C PARAFOLICULARES VERSUS CATEGORIA BETHESDA.	108
TABELA 28 - ASPECTO DOS MACRÓFAGOS VERSUS CATEGORIA BETHESDA.	111

TABELA 29 - ASPECTO DOS LINFÓCITOS VERSUS CATEGORIA BETHESDA.	112
TABELA 30 - QUANTIDADE DE PLASMÓCITOS VERSUS CATEGORIA BETHESDA	114
TABELA 31 - QUANTIDADE DE NEUTRÓFILO VERSUS CATEGORIA BETHESDA.	114
TABELA 32 - NCRNAS PREVISTAS NAS SEQUÊNCIAS INTRÔNICAS DO GENE BRAF.	116
TABELA 33 - ANÁLISE DESCRITIVA DAS SEQUÊNCIAS INTRÔNICAS BRAF, GENE BRAF E GRCH 38.P 14.	117
TABELA 34 - TESTE ANOVA.	120
TABELA 35 - ANÁLISE DESCRITIVA DAS SEQUÊNCIAS DOS NCRNAS PREDITOS.	122
TABELA 36 - TESTE DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA SIMPLES (ONE-WAY ANOVA).	122

LISTA DE SIGLAS

BRAF	- B-raf (isoforma B da proteína Raf)
BRAF ^{V600E}	- BRAF (V600E) - substituição do aminoácido valina por ácido glutâmico no códon 600 da proteína BRAF
C-Raf	- C-raf (isoforma C da proteína Raf)
CAT	- Carcinoma Anaplásico da Tireoide
CEP	- Comitê de ética e pesquisa
CDT	- Carcinoma Diferenciado da Tireoide
CFT	- Carcinoma Folicular da Tireoide
CMT	- Carcinoma Medular da Tireoide
CPT	- Carcinoma Papilífero da Tireoide
CPTVF	- Carcinoma Papilífero da Tireoide Variante Folicular
CR1	- CR1 (domínio rico em cisteína da proteína RAF)
CR2	- CR2 (domínio rico em serina e treonina da proteína RAF)
CR3	- CR3 (domínio quinase da proteína RAF)
C-RAF	- c-Raf (isoforma C da proteína RAF)
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
ERK	- ERK-quinase (Proteína quinase regulada por sinal extracelular)
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
MAPK	- MAP quinase (Proteína quinase ativada por mitógeno)
MEK	- MEK (quinase ativadora da MAP quinase)
PAAF	- Punção aspirativa com agulha fina
Pb	- Pares de bases
RAF	- Proteína RAF
RAS	- Proteína RAS
RET	- Proto-oncogene RET gene do receptor para fator de crescimento neurotrófico derivado de célula
RET/PTC	- Rearranjos do gene RET com genes heterólogos
T3	- Triiodotironina hormônio tireoideano
T4	- Tiroxina hormônio tireoideano - tetraiodotironina
TNM	- Tumor, Nódulos (metástases linfonodais), Metástases à distância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.2	OBJETIVOS	22
1.3	JUSTIFICATIVA	23
2	REVISÃO TEÓRICO-EMPÍRICA	25
2.1	DOENÇA NODULAR DE TIREOIDE	25
2.1.1	PUNÇÃO ASPIRATIVA POR AGULHA FINA (PAAF)	29
2.1.1.1	SISTEMA BETHESDA DE RELATOS CITOPATOLÓGICOS DA TIREOIDE	30
2.1.1.2	INSATISFATÓRIO (CATEGORIA BETHESDA I)	31
2.1.1.3	BENIDADE (CATEGORIA BETHESDA II)	32
2.1.1.4	ATIPIA DE SIGNIFICADO INDETERMINADO OU LESÃO FOLICULAR DE SIGNIFICADO INDETERMINADO (CATEGORIA BETHESDA III)	32
2.1.1.5	SUSPEITO DE NEOPLASIA FOLICULAR OU NEOPLASIA FOLICULAR (CATEGORIA BETHESDA IV)	33
2.1.1.6	SUSPEITO DE MALIGNIDADE (CATEGORIA BETHESDA V)	33
2.1.1.7	MALIGNIDADE (CATEGORIA BETHESDA VI)	34
2.2	CLASSIFICAÇÃO DE TUMORES (TNM)	34
2.2.1	IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	36
2.3	CARCINOMA PAPILÍFERO	38
2.3	CARCINOMA FOLICULAR	42
2.3	CARCINOMA ANAPLÁSICO	43
2.3	CARCINOMA MEDULAR.....	44
2.4	miRNA OU miR	45
2.4.1	microRNA E CANCER	48
2.5	PREDIÇÃO microRNAs E SEUS mRNA ALVOS	49
3	METODOLOGIA	51
3.1.1	TIPO DA PESQUISA.....	51
3.1.2	ASPECTOS ÉTICOS.....	51
3.1.3	POPULAÇÃO DO ESTUDO	52
3.1.4	PROCEDIMENTOS DE COLETA DE DADOS.....	52
3.1.5	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS ANALISADAS.....	53
3.1.6	ANÁLISE ULTRASSONOGRÁFICAS	54

3.1.7	ANÁLISE CITOLÓGICA	54
3.2	CONJUNTO DE DADOS UTILIZADOS PARA CARACTERIZAÇÃO DE microRNAs NAS REGIÕES INTERGENICAS DO GENE BRAF.....	55
3.2.1	ANOTAÇÃO DAS SEQUENCIAS DE microRNAs.....	55
3.2.2	FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA	57
3.2.3	BLAST	58
3.2.4	miRBase	59
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
4	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	62
4.1	POPULAÇÃO E ESTUDO	62
4.1.2	CLASSIFICAÇÃO BETHESDA I NÃO DIAGNÓSTICO.....	64
4.1.3	CLASSIFICAÇÃO BETHESDA II BENIGNO.....	68
4.1.4	BETHESDA III ATIPIA DE SIGNIFICADO INDETERMINADO.....	74
4.1.5	BETHESDA IV NEOPLASIA FOLICULAR.....	78
4.1.6	BETHESDA V SUSPEITO DE MALIGNIDADE.....	82
4.1.7	BETHESDA VI MALIGNIDADE.....	85
4.2	ANÁLISE DESCRITIVA DAS CITOPUNÇÕES.....	88
4.3	ACHADOS CITOLÓGICOS E ULTRASSONOGRÁFICO DAS CITOPUNÇÕES	91
4.4	CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE microRNA NOS TRANSCRITOS DO GENE BRAF.....	115
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	127
5.1	LIMITAÇÃO DO ESTUDO.....	130
5.2	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	131
	REFERÊNCIAS.....	131
	APÊNDICE 1 – ARTIGO 1	150
	APÊNDICE 2 – ARTIGO 2	173
	APÊNDICE 3 – ARTIGO 3	188
	APÊNDICE 4 – MRNAs ALVOS DO MIR-562	199
	ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	202
	ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO E LIVRE ESCLARECIMENTO	205

1. INTRODUÇÃO

A glândula endócrina a tireoide é responsável pela produção T3 (triiodotironina) e o T4 (tiroxina), apresenta o formato de borboleta e está situada na base do pescoço, à frente da laringe, o seu papel é fundamental para o funcionamento do metabolismo humano (DUMONT e VASSART, 1979; COX *et al.*, 2012). Em algumas situações como no período menstrual, os níveis dos hormônios ovarianos e a gestação, fatores ambientais, radiação ou genéticos podem desregular o seu funcionamento, resultando em alterações no aspecto da célula tireoidiana podendo ser benigna ou maligna (MCTIERNAN, WEISS e DALING, 1984; REINERS *et al.*, 2004; PELLEGRITI *et al.*, 2013).

As principais alterações malignas que acometem o sistema endócrino, são originárias da célula folicular ou da célula parafolicular. O câncer de tireoide pode ser classificado como diferenciado em papilífero e folicular, já os carcinomas indiferenciados o anaplásico, e tem o medular (DeLELLIS, HEITZ e ENG, 2004). O carcinoma de tireoide origina-se alterações celulares devido a presença de genes mutados que controlam a proliferação celular tireoidiana (HEGEDÜS, 2004). O câncer de tireoide é o 5º câncer mais prevalente em mulheres americanas dos Estados Unidos, e a sua incidência ocorre entre 1% e 4% em relação as demais neoplasias malignas (HAROON, RASHEED e XU, 2019; SIEGEL *et al.*, 2021). A incidência do câncer de tireoide nos últimos 10 anos aumentou embora a mortalidade tende diminuído, principalmente em mulheres, haja vista que em homens não, como sabemos aproximadamente 10% da população adulta apresenta nódulos tireoidianos, porém, apenas 90-95% são benignos (YOUNIS, 2017; BOLIN *et al.*, 2021).

O carcinoma de tireoide e o melanoma da pele representam 11% e 3% dos cânceres em adolescentes e cerca de 2% e 1% em crianças (SIEGEL *et al.*, 2021). O carcinoma papilífero de tireoide representa 83,2% dos casos, o carcinoma folicular apesar de ser mais agressivo do que o papilífero, representa 11,5% e o carcinoma medular 2,1% dos casos (ENEWOLD, ZHU e RON, 2009). Além disso, o câncer de tireoide mais agressivo e extremamente raro são os carcinomas pouco diferenciados ou indiferenciados, o carcinoma anaplásico, representa 1% a 2% dos casos (BOLIN *et al.*, 2021). O carcinoma de células de Hurthle da tireoide (CHC) é responsável por 3% de todos os cânceres de tireoide, ante considerado como uma

variante oxifílica do Carcinoma Folicular de Tireoide (CFT), análises genéticas e moleculares sugerem que o CHC é uma entidade distinta (ZHOU *et al.*, 2020).

As células foliculares originam o câncer diferenciado de tireoide (CDT) e as células parafoliculares ou células C o carcinoma medular de tireoide (CMT) (COLIN *et al.*, 2013; NOONE *et al.*, 2017). Os CDT incluem as neoplasias papilar e folicular: carcinoma papilífero da tireoide (PTC), o carcinoma folicular da tireoide (FTC), e o carcinoma de células de Hurthle (LEE *et al.*, 2021).

O CDT (papilífero e folicular) se origina no epitélio folicular, que apresentam células epiteliais cubóides dispostos em camada única e secretam os hormônios tireoidianos para o interior do colóide, no interior dos folículos (LEE *et al.*, 2022). Quando ocorre a perda da diferenciação celular, isso resulta em maior agressividade, o que dificulta a terapia convencional e o prognóstico (LEE *et al.*, 2022).

Pesquisas sobre a mutação BRAF V600E em espécimes de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de nódulos de tireoide tem ampliado o entendimento das lesões indeterminadas, principalmente nos diagnósticos de câncer de tireoide. Pesquisas sobre mutação do gene *BRAF* em CPT e dos microRNAs (pequenos RNAs não codificadores de proteínas) que atuam na regulação pós-transcricional na região 3'UTR da expressão gênica influenciando a tradução dos mRNA alvo, que podem levar a inibição da tradução ou degradação do mRNAs, trazem novos conhecimentos na tumorigênese tireoidiana.

A principal função dos microRNAs está no pareamento imperfeito com o mRNAs alvo podendo regular múltiplos alvos, gerando a chamada rede regulatória (MODI *et al.*, 2011). Estudos demonstraram que muitos genes envolvidos no sistema endócrino são alvos de microRNAs e alterações dos níveis de expressão dos microRNAs têm sido coadjuvantes de processos tumorais (LIN *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2013). O reconhecimento dos mecanismos regulados por estes pequenos RNAs poderiam auxiliar no diagnóstico clínico (LEWIS *et al.*, 2005; MITASH *et al.*, 2017).

Estudos com abordagem de novas tecnologias de diagnóstico vem ganhando espaço na utilidade clínica, porém, implicam na detecção e no tratamento de tumores pouco diferenciados, podendo gerar cirurgias desnecessárias de tireoide. Embora estudos sobre o mapeamento descritivo dos casos atendidos no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) sejam escassos, os registros do Sistema

de Informação Hospitalar (SIH), fornecem informações que possibilitam conhecer a situação das biópsias de tireoide, bem como as características clínicas, ultrassonográficas e citológicas dos nódulos puncionados.

1.2 OBJETIVOS

- Objetivo Geral

Caracterização funcional de microRNAs *in silico* e identificação das punções de nódulos de tireoide com categoria citopatológicas do Sistema Bethesda.

- Objetivos Específicos

- Identificar microRNAs nas regiões intrônicas dos não transcritos do gene BRAF;
- Quantificar o número de citopunções de tireoide realizadas no Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Complexo Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná SEMPR/CHC-UFPR/Ebserh;
- Analisar os resultados das citopunções de tireoide quanto ao Sistema classificatório de Bethesda e quantificar os resultados pertencentes a cada categoria (I, II, III, IV, V e IV);
- Analisar o perfil das características indicações clínicas das citopunções;
- Análise dos achados ultrassonográficos e citopatológicos das citopunções;
- Integrar os achados ultrassonográficos e citológicos dos pacientes com lesões indeterminadas de tireoide;
- Quantificar as repunções e o diagnóstico Bethesda;
- Descrever os casos de revisão de lâmina de citopunção;
- Quantificar as tireoidectomias realizadas no grupo de pacientes estudados e associar os diagnósticos anatomopatológicos dos nódulos tireoidianos com os diagnósticos citológicos dos mesmos nódulos na classificação Bethesda.

1.3 JUSTIFICATIVA

O presente estudo descritivo, retrospectivo e transversal objetivou obter o perfil das características clínicas das citopunções dos nódulos de tireoide e a caracterização funcional de microRNAs *in silico* nas regiões intrônicas do gene BRAF. Estudos sugerem que os microRNAs encontrados em carcinomas tireoidianos em sua maioria não são expressos em neoplasias benignas (CANTARA *et al.*, 2010).

Partimos da hipótese de existir algum microRNA específico que seja expresso nas regiões intrônicas que esteja envolvido nos processos de diferenciação, proliferação e sobrevivência celular nestes casos indeterminados. Compreender a regulação pós-transcricional do microRNA no controle da expressão dos genes envolvidos nas vias de sinalização do receptor tirosina quinase, nos mostra a importância da interação entre microRNA\RNAm e os múltiplos alvos que um único microRNAs pode ter. A predição *in silico* de microRNAs nas regiões intrônicas do gene BRAF é um estudo importante porque direciona a teste como uma alternativa a expressão de mRNA\proteína para avaliação de prognóstico, devido o papel na progressão do câncer e pode ser útil para a previsão de resultados metastáticos para o manejo do paciente (HAJES *et al.*, 2014).

Os microRNAs na maioria das vezes estão relacionados a clusters regulados por fatores de transcrição (TFs), que tem alvos várias proteínas envolvidas em vias de sinalização, que expressos em conjunto revelam cooperação funcional (CHO, 2009; HAJES *et al.*, 2014). As alterações genéticas específicas apresentam característica molecular adicional, seja pela mutação do DNA, a expressão genica, a expressão de microRNAs, refletindo assim em alterações clínicas importantes (CHO, 2009; FERRACIN e NEGRINI, 2015).

A expressão de microRNA geralmente reflete na origem embrionária e no desenvolvimento do tipo de tumor, pois uma assinatura engloba informações que integram os dados clínicos, patológicos e a interação alvo mRNA\microRNA (HAJES *et al.*, 2014). Desde o primeiro relato de microRNA envolvido em câncer na literatura científica foi em 2002, observaram que a região deletada 13q14.3 induz o aumento da expressão do linfoma 2 de células B alvo antiapoptótico miR-15\16

(BLC2) em leucemia linfocítica crônica (LCL) (CALIN *et al.*, 2002; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Estudos sobre a relação microRNA e câncer expandiu-se notavelmente, considerando a estabilidade para prognóstico em várias doenças, sinalizando para mecanismos envolvidos não só no câncer de tireoide, mas em outros tipos de canceres, a expressão de microRNAs alterados em tecidos normal desempenham um papel funcional importante de biomarcadores, para a estratificação e previsão de prognóstico e conduta clínica, proporcionando seguimento clínico personalizado.

Os dados foram recrutados das 449 amostras de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de nódulos de tireoide com categoria citopatológicas do Sistema Bethesda provenientes do ambulatório do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas do Paraná – SEMPR, com o objetivo de descrever o perfil das características clínicas dos casos de citopunções no Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná – SEMPR\CHC-UFPR.

2. REVISÃO TEÓRICO-EMPÍRICA

A doença nodular de tireoide, bem como punção aspirativa por agulha fina, os aspectos citológicos que se enquadram no Sistema Bethesda de Relatos Citopatológicos da Tireoide, as características e importância do microRNA e seus mRNA alvos, assuntos os quais a literatura científica nos últimos anos tem descrito. A seguir apresentam-se algumas concepções sobre o assunto.

2.1 DOENÇA NODULAR DA TIREOIDE

A doença nodular de tireoide é uma situação clínica comum, apresentando prevalência alta dependendo do método de diagnóstico: 2 a 7% por palpação a 19% a 68% por ultrassonografia (TAMHANE e GHARIB, 2016; HAUGEN *et al.*, 2016; FISHER e PERRIER, 2018).

Os aspectos epidemiológicos envolvidos na avaliação clínica do nódulo de tireoide (NT), contemplam o histórico do paciente, palpação da glândula tireoide e dos linfonodos cervicais adjacentes, dosagem sérica do hormônio tireoestimulante (TSH) e a utilização rotineira do ultrassom (US). No QUADRO 1 vemos o algoritmo para avaliação clínica do nódulo de tireoide, em relação ao risco de malignidade (SCHULUMBERGER e PACINI, 2003; GUEDES e GARBACCIO, 2015; COHEN *et al.*, 2017).

QUADRO 1 - Avaliação clínica do nódulo de tireoide.

Categoria diagnóstica	Risco de malignidade	Risco de malignidade	Conduta usual
	se NIFTP ≠CT (%)	se NIFTP =CT (%)	
Não diagnóstica ou material insatisfatório	5-10	5-10	Repetir PAAF guiada por US
Benigno	0-3	0-3	Seguimento clínico e ultrassonográfico
Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado	6-18	~ 10-30	Repetir PAAF, testes moleculares ou lobectomia
Neoplasia folicular ou suspeito para neoplasia folicular	10-40	25-40	Testes moleculares ou lobectomia

FONTE: Modificado de Cohen *et al.*, 2017.

Os nódulos de tireoide têm uma prevalência de até 68% nas ultrassonografias em adultos (TESSLER *et al.*, 2017). O Colégio Americano de Radiologia (ACR) propôs a classificação TIRADS (Thyroid Imaging, Reporting and Data System) estabelecendo um sistema de estratificação de risco em busca do melhor entendimento e delineamento dos critérios avaliados a serem utilizado pelos endocrinologistas (PIRES, MUSTAFÁ e MAGALHÃES, 2022). Esse sistema de estratificação de risco auxilia na identificação de malignidade clinicamente significativa, proporcionando a redução do número de citopunções realizadas em nódulos benignos (TESSLER *et al.*, 2017). A classificação TIRADS é agrupado em cinco categorias: TR1: Benigno, TR2: não suspeito, TR3 levemente suspeito, TR4 moderadamente suspeito e TR5 altamente suspeito de malignidade, conforme os achados ultrassonográficos é condicionado pontos, onde o número total de pontos demarca o nível de TIRADS do nódulo tireoidiano num intervalo de TR1 (benigno) a TR5 (alta suspeita de malignidade) (NGUYEN *et al.*, 2018; TESSLER *et al.*, 2017).

Um laudo ultrassonográfico em suma descreve as características gerais do parênquima tireoidiano, o volume da glândula, a localização do nódulo, o tamanho do nódulo e a avaliação dos linfonodos cervicais (NGUYEN *et al.*, 2018; TESSLER *et al.*, 2017). Os achados ultrassonográficos associados com maior risco

de malignidade do nódulo são: nódulo sólido, hipoeogenicidade acentuada, margens irregulares ou microlobuladas, microcalcificações e diâmetro anteroposterior maior que o transverso. Já os nódulos puramente císticos e nódulos de aspecto “espongiforme” raramente são malignos (COHEN *et al.*, 2017). As características ultrassonográficas, risco de malignidade e orientação para punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de nódulos tireoidianos são mostradas na (QUADRO 2).

QUADRO 2 - Características ultrassonográficas, risco de malignidade segundo a taxa e orientação para Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) de nódulos tireoidianos.

Categoria de risco	Características ultrassonográficas	Risco de malignidade (%)	Considerar PAAF
Alta	Margens irregulares, microcalcificações, diâmetro ântero-posterior maior que transverso, extensão extratireoidiana, extrusão para fora de borda calcificada	> 70-90	Tamanho \geq 1 cm
Intermediária	Nódulo sólido hipoeecóico (sem características de alto risco)	10-20	Tamanho \geq 1 cm
Baixa	Nódulo sólido isoecóico ou hiperecóico, nódulo parcialmente cístico com área sólida excêntrica (sem características de alto risco)	5-10	Tamanho \geq 1,5 cm
Muito baixa	Nódulo esponqiforme (sem características de alto risco)	< 3	Tamanho \geq 2 cm ou observação clínica
Benigna	Cisto simples	< 1	PAAF desnecessária

FONTE: Modificado de Cohen *et al.*, 2017.

Segundo Baloch e cols (2022), a classificação das neoplasias de tireoide conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS) de Tumores Endócrinos e Neuroendócrinos relacionados à glândula tireoide em sua 5ª edição proporcionou o entendimento acerca dos tumores da tireoide correlacionando os aspectos citológicos, histológicos, moleculares e de punho biológico. Em suma, como a maioria das neoplasias tireoidianas são originadas de células foliculares, nessa nova classificação os tumores benignos são divididos em benignos, baixo risco e malignas, deixou-se de usar apenas o termo adenoma folicular. Mas pela primeira vez, nas variantes do adenoma foram incluídas as lesões e arquitetura papilar ditas

hiperfuncionais e oncocíticas. Além disso, nas lesões hiperplásicas\neoplásicas multifocais, alterações comumente observadas no caso clínico de bócio multinodular, a terminologia utilizada foi de doença nodular folicular da tireoide (DNF) (QUADRO 3) (BALOCH *et al.*, 2022).

QUADRO 3 - Esquema de classificação da OMS de Neoplasias da Tireoide, 5ª edição.

Anormalidades do desenvolvimento

1. Cisto do ducto tireoglosso
2. Outras anormalidades congênitas da tireoide

Neoplasias derivadas de células foliculares

1. Tumores benignos:
 - a. Doença nodular folicular da tireoide
 - b. Adenoma folicular
 - c. Adenoma folicular com arquitetura papilar
 - d. Adenoma oncocítico da tireoide
2. Neoplasias de baixo risco
 - a. Neoplasia folicular não invasiva da tireoide com características nucleares papilíferas
 - b. Tumores da tireoide de potencial maligno incerto
 - c. Tumor trabecular hialinizante
3. Neoplasias malignas
 - a. Carcinoma folicular da tireoide
 - b. Carcinoma papilífero variante folicular encapsulado invasivo
 - c. Carcinoma papilífero de tireoide
 - d. Carcinoma oncocítico da tireoide
 - e. Carcinomas derivados de foliculos de alto grau ou Carcinoma diferenciado de tireoide de alto grau de malignidade
 - ii. Carcinoma de tireoide pouco diferenciado
 - f. Carcinoma de tireoide derivado de células foliculares anaplásicas

Carcinoma derivado de células C da tireoide

1. Carcinoma medular da tireoide

Carcinomas mistos derivados de células medulares e foliculares

Carcinomas tipo glândula salivar da tireoide

1. Carcinoma mucoepidermóide da tireoide
2. Carcinoma secretor do tipo glândula salivar

Tumores da tireoide de histogênese incerta

1. Carcinoma mucoepidermóide esclerosante com eosinofilia
2. Carcinoma morular cribriforme da tireoide

Tumores tímicos dentro da tireoide

1. Família Timoma
2. Tumor epitelial fusiforme com elementos semelhantes ao timo
3. Família de carcinoma tímico

Neoplasias embrionárias da tireoide

1. Tireoblastoma
-

FONTE: Modificado de Baloch *et al.*, 2022.

2.1.1 PUNÇÃO ASPIRATIVA POR AGULHA FINA (PAAF)

Martin e Ellis (1930) descreveram a punção aspirativa por agulha fina (PAAF), método eficaz não invasivo apropriado na distinção entre nódulos tireoidianos benignos e malignos (MARTINS e ELLIS, 1930). A eficácia deste exame citológico se refletiu na redução da taxa de cirurgias da tireoide, desnecessária em pacientes diagnosticados com nódulos benignos e o encaminhamento à tireoidectomia e adequada aos pacientes com câncer de tireoide (CIBAS e ALI, 2009). A utilização da PAAF começou em 1952, resultando na redução de 25 a 50% no número de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico (MURATLI *et al.*, 2014).

O resultado citopatológico frequentemente divergente da PAAF de nódulos de tireoide levou às discussões a respeito dos dados apresentados pelos citopatologistas de diferentes instituições. Ficou clara a necessidade de padronizar este sistema para uma propícia comunicação dos laudos entre os clínicos e patologistas (CRIPPA *et al.*, 2010; BONGIOVANNI *et al.*, 2011; ALI e CIBAS, 2017; LIU *et al.*, 2016).

Após vários estudos em busca de uma terminologia adequada, em 2007 o Instituto Nacional do Cancer (NCI, National Cancer Institute) em Bethesda, realizou a conferência “NCI *Thyroid Fine Needle Aspiration State of the Science Conference*” moderada pelo Dr. Edmund Cibas e Susan Mandel. Este evento reuniu patologistas e especialistas da área para discutir e desenvolver uma terminologia uniforme para os resultados da PAAF da tireoide, e enquadrar as categorias para dados citopatológicos específicos para a tireoide (NIKIFOROV, 2008; CIBAS e ALI, 2009; CIRPPA *et al.*, 2010) (QUADRO 4).

QUADRO 4 - Risco de malignidade e conduta clínica recomendada.

Categoria diagnóstica	Risco de malignidade		Conduta usual
	se NIFTP ≠CT (%)	se NIFTP =CT (%)	
Não diagnóstica ou material insatisfatório	5-10	5-10	Repetir PAAF guiada por US
Benigno	0-3	0-3	Seguimento clínico e ultrassonográfico
Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado	6-18	~ 10-30	Repetir PAAF, testes moleculares ou lobectomia
Neoplasia folicular ou suspeito para neoplasia folicular	10-40	25-40	Testes moleculares ou lobectomia

FONTE: Modificado de Cibas e ALI (2017).

LEGENDA: NIFTP = neoplasia de tireoide folicular não invasiva com aspectos nucleares papilíferos; CT = câncer de tireoide; PAAF = punção aspirativa por agulha fina
US = ultrassonografia.

2.1.1.1 SISTEMA BETHESDA DE RELATOS CITOPATOLÓGICOS DA TIREOIDE

A publicação do atlas do Sistema Bethesda de tireoide (Sistema Bethesda de Relatos Citopatológicos da Tireoide (TBSRTC, *The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology*), representou um marco no diagnóstico das PAAFs de tireoide. Ele contém definições citológicas e critérios morfológicos e de diagnóstico, levando à uma uniformidade na definição das alterações tireoidianas na utilização da aspiração por agulha fina, aprimorando o entendimento entre os citopatologistas e especialistas (BALOCH e LIVOLSI, 2008; BALOCH *et al.*, 2008 CIBAS e ALI, 2009; ALI e CIBAS, 2017; LIU *et al.*, 2016).

O TBSRTC inclui seis categorias de diagnóstico baseado em evidências de relatos de casos clínicos de doença tireoidiana e cada categoria possui um risco de malignidade e gerenciamento clínico (BONGIOVANNI *et al.*, 2012; PUSZTASZERI *et al.*, 2016). São seis categorias bem definidas e morfológicamente distintas: Bethesda I: não diagnóstico ou não insatisfatório, Bethesda II: benigno, Bethesda III: atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado

indeterminado, Bethesda IV: neoplasia folicular ou suspeito de neoplasia folicular, Bethesda V: suspeito de malignidade e Bethesda VI: maligno, observados no QUADRO 5 (CRIPPA et al., 2010; ALI, 2010; ALI e CIBAS, 2016; CIBAS e ALI, 2017).

QUADRO 5 - Categorias de diagnóstico segundo o Sistema Bethesda 2017 para Relatórios Citopatológicos de Tireoide.

I. NÃO DIAGNÓSTICO OU NÃO SATISFATÓRIO

Extrato praticamente acelular

Outros (esfregaço sanguinolento, artefatos de coagulação etc.)

II. BENIGNO

Consistente com um nódulo folicular benigno (inclui nódulo adenomatóide, nódulo coloidal etc.)

Consistente com tireoidite linfocítica (Hashimoto) em um contexto clínico apropriado

Consistente com tireoidite granulomatosa (subaguda)

Outros

III. ATIPIA DE SIGNIFICADO INDETERMINADO OU LESÃO FOLICULAR DE SIGNIFICADO INDETERMINADO

IV. NEOPLASIA FOLICULAR OU SUSPEITO

PARA NEOPLASIA FOLICULAR

V. SUSPEITO PARA MALIGNIDADE

Suspeita para carcinoma papilar

Suspeita para carcinoma medular

Suspeita para carcinoma metastático

Suspeito para linfoma

Outros

VI. MALIGNIDADE

Carcinoma papilar de tireoide

Carcinoma pouco diferenciado

Carcinoma medular da tireoide

Carcinoma indiferenciado (anaplásico)

Carcinoma de células escamosas

Carcinoma com características mistas (especificar)

Carcinoma metastático

Linfoma não-Hodgkin

Outros

FONTE: Modificado de Cibas E Ali, 2017.

2.1.1.2 INSATISFATÓRIO (CATEGORIA BETHESDA I)

A categoria Bethesda I se refere às amostras de PAAF insatisfatórias ou não-diagnósticas (CIBAS e ALI, 2009). Estes espécimes têm como característica um número insatisfatório de células foliculares e as preparações de esfregaços inadequadas devido à obscurecimento por sangue, esfregaço espesso, secagem ao ar, artefatos, entre outros contribuintes que interferem no diagnóstico (CRIPPA et al., 2010). Para uma amostra de PAAF ser considerada satisfatória segundo o sistema TBSRTC é necessário que a espécime apresente pelo menos 6 grupos de

células foliculares e cada grupo seja composto de pelo menos 10 células (CIBAS e ALI, 2009; ALI, 2010).

2.1.1.3 BENIGNO (CATEGORIA BETHESDA II)

Inclui aspirados com proporções adequadas de células foliculares com variáveis quantidades de colóide e com arquitetura macrofolicular (ALI, 2010). As amostras consideradas benignas possuem características citomorfológicas de bócio colóide e bócio adenomatoso, tireoidite de Hashimoto, ou tireoidite viral (CIBAS e ALI, 2009; ALI, 2010).

2.1.1.4 ATIPIA DE SIGNIFICADO INDETERMINADO OU LESÃO FOLICULAR DE SIGNIFICADO INDETERMINADO (CATEGORIA BETHESDA III)

Os aspirados de FNA na atipia de significado indeterminado (AUS) ou lesão folicular de significado indeterminado (FLUS) é composta de casos heterogêneos que possuem características difíceis de serem categorizadas como benigno, maligno ou suspeito (CIBAS e ALI, 2009). Segundo o Sistema Bethesda (TBSRT) o risco de malignidade foi estimado de 20 a 25% e são caracterizados em oito cenários específicos:

1. Predominância de microfolículos em um ambiente celular espesso com colóide escasso;
2. Evidência de células de Hürthle, atipias de células foliculares com esfregaço inapropriado devido a contaminação por artefatos (secagem ao ar ou coagulação);
3. Aspirado celular com células virtuais de Hürthle sugestivas de tireoidite linfocítica crônica ou bócio multinodular;
4. Características focais de carcinoma papilar de aspecto predominante nuclear;

5. Aspirado benigno sugestivo de tireoidite linfocítica crônica;
6. Células de revestimento cístico podendo apresentar atipia, sulcos, núcleos alongados e/ou inclusões intracelulares no aspirado benigno;
7. Células foliculares focais atípicas (aumento nuclear, nucléolos predominantes etc.) em casos de pacientes com histórico de iodo radioativo, reparo devido a evolução de lesão cística;
8. Amostras de PAAF que apresentam infiltrado linfóide atípico não visualizado na fenotipagem por citometria de fluxo. Nestes casos é sugerido a repetição da PAAF (ALI, 2010).

2.1.1.5 SUSPEITO DE NEOPLASIA FOLICULAR OU NEOPLASIA FOLICULAR (CATEGORIA BETHESDA IV)

Os aspirados de PAAF possuem características citomorfológicas moderadas com abundantes células, coloide escasso ou ausente, predominância de células microfoliculares ou trabéculas com arquitetura de células foliculares (BALOCH *et al.*, 2008; BALOCH *et al.*, 2022). Embora seja visto como uma lesão significativamente suspeita, não se consegue diferenciar um carcinoma folicular de um adenoma folicular e normalmente os pacientes são encaminhados a uma tireoidectomia total ou lobectomia (ALI, 2010).

2.1.1.6 SUSPEITO DE MALIGNIDADE (CATEGORIA BETHESDA V)

Nesta categoria as amostras provenientes de PAAF são evidenciadas alterações sugestivas de carcinoma papilar, carcinoma medular ou linfoma (CIBAS e ALI, 2009; ALI, 2010; BALOCH *et al.*, 2022). Há prevalência de características de malignidade, porém os dados quantitativos e/ou qualitativos dos espécimes são insuficientes para o diagnóstico de neoplasia maligna. Os carcinomas papilíferos representam cerca de 60-70% dos casos de suspeito de malignidade. Amostras sugestivas de neoplasia folicular devem ser classificadas na Categoria Bethesda IV (ALI, 2010).

2.1.1.7 MALIGNIDADE (CATEGORIA BETHESDA VI)

Casos conclusivos de alterações citomorfológicas para malignidade com estimativa de 97 a 99% para diagnóstico de câncer. É recomendada intervenção cirúrgica para remoção do nódulo maligno, exceto em tumores metastáticos, linfomas não Hodgkin e carcinomas indiferenciados (CIBAS e ALI, 2009; ALI, 2010). A terminologia dos relatórios de qualidade e a reprodutibilidade do TBSRTC no âmbito global impactou significativamente o manejo dos nódulos tireoidianos com aceitação pela Associação Americana de Tireoide (ATA) de diretrizes para pacientes adultos com nódulos tireoidianos e câncer diferenciado de tireoide (HAUGEN *et al.*, 2017, PUSZTASZERI *et al.*, 2016).

A Variante Follicular do Carcinoma Papilífero de Tireoide não Invasivo e Encapsulado (VFCPT) apresenta uma prevalência de 20% dos cânceres de tireoide. Esta classe, VFCPT encapsulada e sem invasão vascular, é considerada atualmente como uma lesão benigna da (NIKIFOROV *et al.*, 2016).

Nikiforov e colaboradores (2016) realizaram uma revisão de nomenclatura dos CPTVF e renomearam estes tumores como neoplasia follicular de tireoide não invasiva com aspectos nucleares de características papilíferas (NIFPT, *Noninvasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-like Nuclear Features*). O NIFPT apresenta encapsulamento ou demarcação clara do tumor do tecido tireoidiano adjacente sem nenhuma invasão, padrão de crescimento follicular, expressão pelo menos moderada de aspectos nucleares do carcinoma papilífero e com baixo potencial de malignidade (FU *et al.*, 2017; XU *et al.* 2017; WONG *et al.*, 2017).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DE TUMORES MALIGNOS (TNM)

A classificação TNM foi inserida em 2017. A *American Joint Committee on Cancer (AJCC) / Union for International Cancer Control (UICC) Tumor Nodes Metastasis (TNM)* é uma classificação mundialmente utilizada para os tumores malignos e tem ampla abrangência das variáveis implicadas no prognóstico do CDT e carcinoma anaplásico, guardando uma correlação estreita com a evolução da

doença (ROSÁRIO *et al.*, 2013; BRIERLEY *et al.*, 2017). O estágio patológico, também denominado estágio cirúrgico, é determinado pela análise da amostra do tecido removido durante a cirurgia. Se a cirurgia não for possível, o tumor recebe o estadiamento clínico, que está baseado nos resultados do exame físico, biópsia e exames de imagem (BRIERLEY *et al.*, 2017; TUTTLE, HAUGEN e PERRIER, 2017) (QUADRO 6).

QUADRO 6 - Classificação do American Joint Committee on Cancer/Tumor Nodes Metastasis para Carcinoma Diferenciado de Tireoide / 8ª edição.

(T) Tumor primário	(N) Metástases linfonodais	(M) Metástases distantes
Tx- não pode ser avaliado	Nx- não pode ser avaliado	Mx- não pode ser avaliado
T0- sem evidência de tumor primário	N0a- um ou mais linfonodos com citologia ou histologia benigna	M0- metástase à distância ausente
T1a- tumor ≤ 1 cm, sem extensão extratireoidiana	N0b- sem evidência clínica ou radiológica de metástases linfonodais	M1- metástase à distância presente
T1b- tumor > 1 cm, mas ≤ 2 cm sem extensão extratireoidiana	N1a- metástases em linfonodos do nível VI ou VII (pré-traqueal, paratraqueal, pré-laríngeo ou mediastinal superior), unilaterais ou bilaterais.	
T2- tumor > 2cm, mas ≤ 4 cm, sem extensão extratireoidiana	N1b- metástases unilaterais, bilaterais ou contralaterais em linfonodos (nível I, II, III, IV ou V) ou retrofaríngeos.	
T3a- tumor > 4 cm limitado à tireoide		
T3b- tumor de qualquer tamanho com intensa invasão de músculos		
T4a- tumor de qualquer tamanho com intensa invasão de tecido subcutâneo, laringe, traquéia, esôfago ou nervo recorrente laríngeo		
T4b- tumor de qualquer tamanho com intensa invasão da fáscia pré-vertebral ou envolvendo carótida ou vasos mediastinais		

FONTE: Modificado de Tuttle, Haugen e Perrier (2017).

2.2.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA

É um método de baixo custo que objetiva identificar antígenos específicos em tecidos, o que permite detectar proteínas específicas em nível celular no tecido em estudo (LAM e LEE., 2022).

No estudo de Zhang e cols (2020), sobre o significado clínico da imunohistoquímica para detectar a proteína mutante BRAF^{V600E} em tecidos tireoidianos, os autores observaram que a detecção da proteína mutante BRAF^{V600E} utilizada somente com imunohistoquímica (IHQ) não é um fator preditivo positivo para prognóstico em diferenciar os nódulos benignos de malignos. Todavia, há casos nos quais não há a necessidade de IH; embora em alguns seja importante. A aplicabilidade diagnóstica auxilia na identificação de alterações genéticas subjacentes e orienta o seguimento clínico ao tipo de tratamento em casos de carcinoma papilífero de tireoide.

A utilização da IHQ proporciona diferenciar os casos confirmados de CPT de outras neoplasias primárias da tireoide (LAM e LEE., 2022). Além disso, é uma técnica de imunocoloração indispensável para identificar a linhagem ou o tipo de célula oncopatológica (AGARWAL *et al.*, 2022). Alguns fatores de transcrição como TTF1 (NKX2.1), PAX8 e TTF2 (FOXE1) desempenham papel funcional na glândula tireoidiana (KUMIRA, 2011).

A tireoglobulina (Tg) é o imunomarcador mais utilizado para análise de tecido extra-tireoidiano maligno. Trata-se de uma proteína dimérica (confirmar este termo dimérico) produzida pela tireoide, cujo papel é possibilitar a produção no colóide dos hormônios tri-iodotironina, (T3), e tetraiodotironina, as células tumorais metastáticas dos CDT (CPT e CFT) podem produzir essa proteína (AGARWAL, *et al.*, 2022). Já a calcitonina é um hormônio sintetizado pelas células parafoliculares da tireoide e é utilizado no diagnóstico e prognóstico do carcinoma medular de tireoide (QUADRO 7) (DETTMER *et al.*, 2020).

QUADRO 7 - Imuno-histoquímica em diferentes carcinomas de tireoide.

Coloração imuno-histoquímica	CTM	PTC	FTC	PDTC	ATC
Calcitonina	++	-	-	-	-
Cromogranina A	++	-	-	sem dados	-
Sinaptofisina	++	-/+	-/+	sem dados	-
Tireoglobulina	-	+++	+++	-/+	-/+
Galectina-3	-/+	++	-/+	-/+	-/+
HBME-1	-/+	++	-/+	-/+	-/+
PanCK	++	++	++	+	-/+
TTF1	++	++	++	-/+	-
CK7	++	++	++	-/+	-/+
CK19	-/+	++	-/+	-/+	-
PAX8	-	++	-/+	-/+	-/+

FONTE: Modificado de Dettmer *et al.*, 2020.

LEGENDA: Carcinoma medular de tireoide (MTC); Carcinoma papilar de tireoide (PTC); Carcinoma folicular de tireoide (FTC); Carcinoma de tireoide pouco diferenciado (PDTC); Carcinoma anaplásico de tireoide ATC.

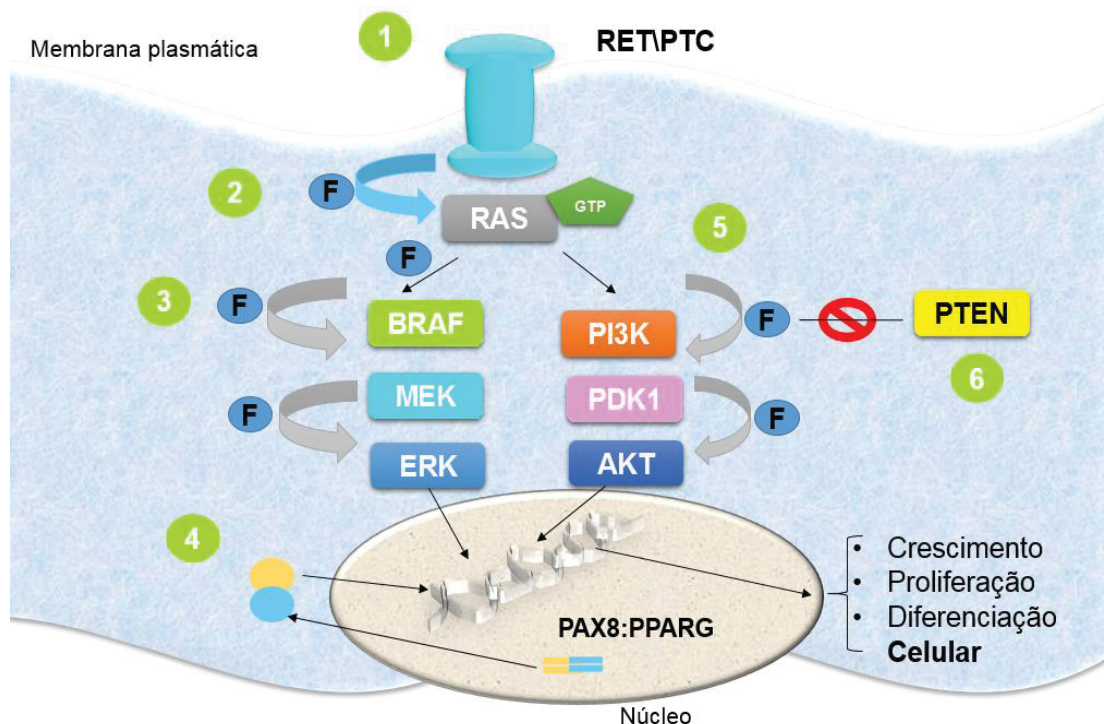
Os marcadores de malignidade em carcinomas de tireoide são comumente solicitados na prática clínica, como no caso da tiroglobulina na IHQ positiva de aspecto irregular e focal, em carcinoma de tireoide pouco diferenciado, podendo ser positiva e de difusão e expressão forte em carcinoma bem diferenciado. Embora os marcadores Galectina-3 ou HME-1 sejam recomendados, eles podem apresentar sinais de malignidade errônea segundos os critérios de Turin (ASIOLI *et al.*, 2010; LIN, 2015; PULCRANO *et al.*, 2007; DETTMER *et al.*, 2020). O CD31, um marcador para vascularização, é um marcador de neoplasias vasculares (Hemangiossarcoma), enquanto o Ki67 é um antígeno de proliferação celular de fase G0 (divisão celular) (DETTMER *et al.*, 2020).

2.3 CARCINOMA PAPILÍFERO

No carcinoma papilífero de tireoide (CPT), a via de sinalização MAP-quinase é a principal e responde por estímulos de diferentes fatores de crescimento ou alteração constitutiva do gene RET, a qual ativa a cascata RAF\RAS\RET (HUSSAIN *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2022). A ativação de efetores ao longo da via de sinalização MAPK, está relacionada a transformação maligna da tireoide. As mutações pontuais ativadoras em BRAF representam 45% das alterações genéticas mais frequentes (NIKIFOROV, 2008). O rearranjo do gene RET\PTC (*REarranged during Transfection\papillary thyroid carcinoma*), ocorre em cerca de 20% dos CPTs. Já a ativação do gene RAS é menos frequente em CPT em relação aos CFT, que apresentam maior prevalência das mutações RAS e na via de sinalização PI-3K\AKT (FIGURA 1) (HUSSAIN *et al.*, 2015; ZABALLOS e SANTISTEBAN, 2017; GARCIA *et al.*, 2022).

O proto-oncogene RET está envolvido na regulação do crescimento, na diferenciação e na migração de células de origem da crista neural. O seu ligante, *glial cell-line-derived neurotrophic factor* (GDNF) pertence a superfamília TGFβ (ZABALLOS e SANTISTEBAN, 2017; GARCIA *et al.*, 2022). A proteína oncogênica RET\PTC apresenta domínio N-terminal doada por um dos segmentos gênicos, que confere ao oncogene a propriedade de oligomerização, com a porção C-terminal do receptor tirosina-quinase RET, que perde os domínios extracelulares e transmembrana, porém, retém a função tirosina-quinase do receptor, mantendo a ativação constitutiva da cascata de sinalização MAP-quinase intracelular. O rearranjo RET\PTC1 e RET\PTC3 são os mais observados em CPT, porém outras recombinações genéticas já foram descritas (NIKIFOROV, 2008; LIN, YU e YANG, 2010; ZABALLOS e SANTISTEBAN, 2017; GARCIA *et al.*, 2022).

FIGURA 1 - As vias de sinalização em câncer de tireoide.



FONTE: Modificado de Garcia *et al.*, 2022.

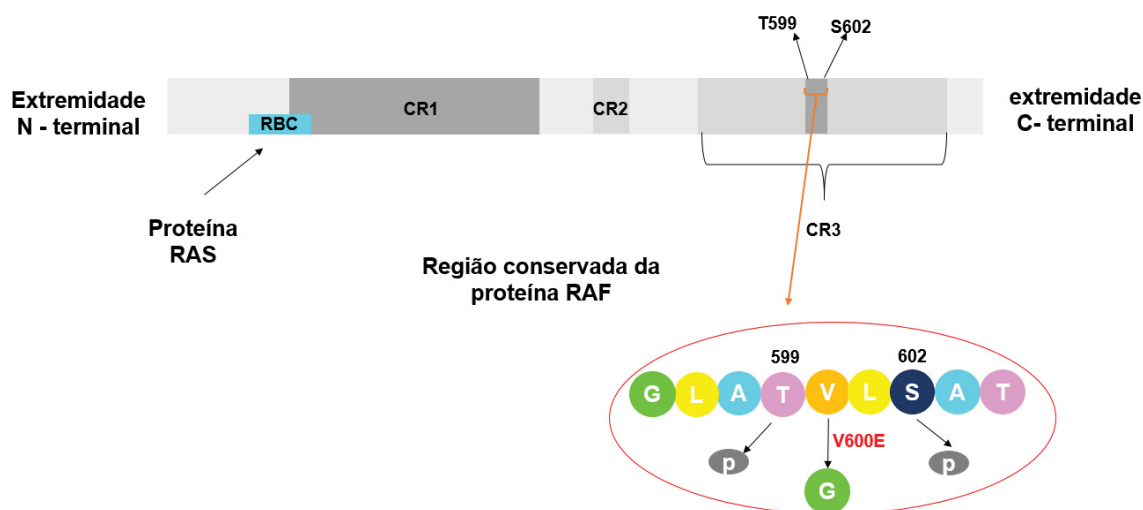
LEGENDA: 1) Carcinoma papilífero podendo ocorrer a translocação ou inversão. 2) mutações pontuais em carcinoma folicular e anaplásico. 3) mutações pontuais em carcinoma papilífero 4) translocações em carcinoma folicular. 5) mutações pontuais e ampliações em carcinoma folicular e anaplásico. 6) mutações pontuais em carcinoma folicular e anaplásico. Essas alterações resultam no crescimento, na proliferação e diferenciação celular.

Após a ligação do ligante ao receptor RET ocorre a dimerização do receptor, a qual ativa a atividade quinase do receptor, ocorrendo a autofosforilação de resíduos de tirosinas dando início a sinalização intracelular, pela interação de efetores específicos nos locais de tirosinas fosforiladas (DUH e GROSSMAN, 1995; NIKIFOROV, 2008; COTE *et al.*, 2015; ZABALLOS e SANTISTEBAN, 2017; GARCIA *et al.*, 2022).

A mutação que ocorre no gene BRAF é somática, o que leva ativação constitutiva da reação quinase pela substituição da valina para ácido glutâmico no aminoácido 599 (V599E) (NIKIFOROV, 2008; LIN, YU e YANG, 2010; ZABALLOS e SANTISTEBAN, 2017; GARCIA *et al.*, 2022). Essa mutação ocorre exclusivamente em CPT e tem prevalência seletiva para a forma clássica e a variante de células altas. As formas agressivas do CPT pouco diferenciados e carcinoma anaplásicos com focos de lesão papilífera tem BRAF^{V599E} sugere participação de BRAF na progressão de agressividade tumoral (NIKIFOROV *et al.*, 2016).

Os mamíferos apresentam as três isoformas da proteína RAF (ARAF, BRAF e CRAF), que são expressos em diferentes tecidos. A isoforma CRAF está expressa em todas as células, já a isoforma BRAF está expresso em células hematopoiéticas, sistema nervoso, testículos e com predominância nas células foliculares tireoidianas (NIKIFOROV 2008; COTE *et al.*, 2015; ZABALLOS e SANTISTEBAN, 2017; GARCIA *et al.*, 2022). As proteínas RAF possuem três regiões conservadas: CR1 e CR2 com N-terminal cuja função é regulatória, a região de *ribosomal binding site* (RBS) da extremidade CR1 é onde ocorre a ligação da proteína RAS, e a extremidade CR3 possui C-terminal de domínio quinase (FIGURA 2) (NIKIFOROV 2008; HUSSAIN *et al.*, 2015).

FIGURA 2 - Representação das regiões conservadas das proteínas RAFS (CR1, CR2 E CR3).



FONTE: Modificado de Hussain *et al.*, 2015.

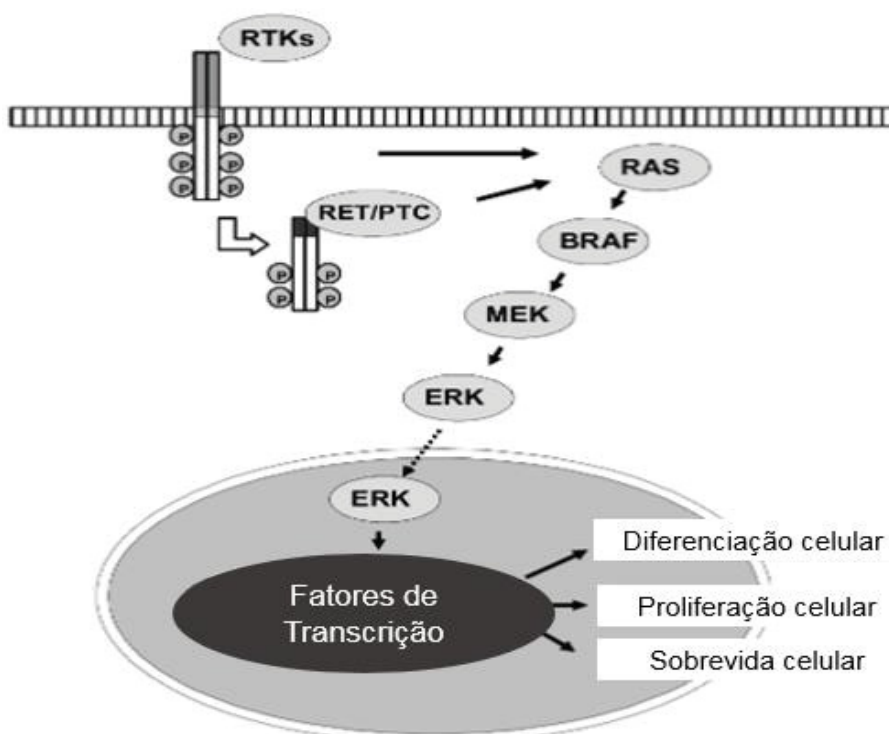
LEGENDA: Na mutação BRAF ocorre a substituição do aminoácido valina (V) na posição 600 em cor laranja, pelo aminoácido o ácido glutâmico (G) em cor esverdeada, configurando a transversão T1999A no nucleotídeo do éxon 15.

A patogênese molecular dos carcinomas da tireoide tem sido fundamental para o conhecimento da via de sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio, cuja função é de estimular a divisão celular (mitose), em condições fisiológicas, quando há a ligação dos fatores de crescimento aos receptores tirosina quinase (RTKs), como o RET e NTRK, resultando na dimerização do receptor e ativação da autofosforilação dos resíduos de tirosina no domínio intracelular, acarretando na ativação das proteínas RAS pelo GTP, que ativam as proteínas

RAF, que por sua vez, ativam a MAP kinase que fosforila algumas proteínas-alvos específicas (NIKIFOROV, 2008; LIN, YU e YANG, 2010).

O recrutamento das proteínas RAF (BRAF em células foliculares da tireoide) para a membrana plasmática ativam a ERK quinase (MEK) que fosforila e ativa o sinal extracelular regulado pela proteína quinase (ERK) e transloca-se para o núcleo onde regula a transcrição dos genes envolvidos na diferenciação, proliferação e sobrevivência celular. Podem ocorrer alterações genéticas como mutações pontuais ou rearranjos entre os genes *RET*, *RAS* e *BRAF* no câncer de tireoide (NIKIFOROV, 2008; CANTARA *et al.*, 2010) (FIGURA 3).

FIGURA 3 - Via de sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio.



FONTE: Modificado de Nikiforov (2008).

A mutação somática $BRAF^{T1799A}$ leva a ativação constitutiva da região quinase pela substituição de valina pelo ácido glutâmico no aminoácido 599 (V599E) e está presente em 45% em carcinomas papilífero da tireoide (PTC) (MACIEL, KIMURA e CERUTTI, 2005).

2.4 CARCINOMA FOLICULAR

Em carcinomas foliculares ocorre mutações pontuais que ativam a via de sinalização PI-3K/AKT, resultando na ativação do gene RAS e PIK3CA, provocando a inativação do gene supressor de tumor o PTEN, o qual desempenha um papel de regulador negativa nessa via (ZABALLOS *et al.*, 2017). Cerca de 10% dos casos de CFT observar-se ativação da PI3K. O aumento das mutações de RAS e PIK3CA favorece a progressão de adenomas foliculares benignos para carcinomas foliculares, como também, para carcinomas anaplásicos, devido a translocação no receptor gama (γ) que uma vez ativado via proxissoma PAX8 (PPAR γ) cuja prevalência de 30 a 35% em CFT (RAMAN *et al.*, 2014; LANDA *et al.*, 2016).

Mutações somáticas ou deleções em PTEN, são menos frequentes nas em tumores bem diferenciados (DAHIA, 1997, HALACHMI *et al.* 1998), porém, com a evolução molecular pode-se observar que a translocação na 10q23, o que resulta na fusão do gene homeo-box pareado PAX8, cuja importância no desenvolvimento da tireoide, com o gene PPAR γ 1 que é um receptor ativado por proliferadores de peroxissoma. Kroll e cols (2000) descreveram a translocação cromossômica do DNA no domínio de ligação de um fator de transcrição da tireoide, denominado de PAX8 nos domínios A e F do gene PPAR β formando o gene quimérico designando a fusão PAX8:PPAR γ 1 (*peroxissomo proliferator-activated receptor gamma 1*) produz um receptor genético nuclear de hormônios onde ativa o crescimento celular, proliferação e diferenciação (XU *et al.*, 2016). Essa translocação atinge cerca de 20 a 60% dos casos de câncer de tireoide. Está presente nos casos típicos ou agressivos do CFT podendo estar acompanhado de invasão vascular, entretanto, nos casos omissos de adenoma folicular apontando para um carcinoma folicular *in situ* (MACIEL, KIMURA E CERUTTI, 2005).

O gene supressor de tumor PTEN é uma fosfatase dupla e específica a qual está relacionada a várias desordens tireoidianas, como o bócio multinodular, adenoma da tireoide e carcinoma. A ativação da Adenil ciclase leva o aumento o AMP cíclico intracelular, ao elevada expressão funcional e proliferação (PORCELLINI, FENZI e AVVEDIMENTO, 1997). A mutação na linhagem germinativa do PTEN causadora da síndrome McCune-Albright, desencadeia a uma desordem de no crescimento de tumores hamartomas, é uma doença autossômica dominante (SON e NOSÉ, 2012). Nessa síndrome ocorre mutações

germinativas em mosaico GNAS e complexo de Carney em decorrência de mutações inativadoras da linhagem germinativa em PRKAR1A, sendo esta ativadora também da via cAMP-proteína quinase A (PKA) (KAMILARIS *et al.*, 2019).

Os mecanismos epigenéticos como as alterações na via MAPK que resultam na redução na expressão da proteína e a hipermetilação do promotor PTEN, proporcionando a perda da expressão de PTEN em tumores de tireoide (ALVAREZ-NUNEZ *et al.*, 2006).

Por outro lado, a busca pelo conhecimento dos eventos desencadeados pelo gene PTEN em tireoide, gera muita incerteza, pois ainda não está completamente lucidado os mecanismos. No carcinoma folicular de tireoide as mutações ativadoras no gene RAS incluindo as isoformas H-RAS, K-RAS, N-RAS estão envolvidas no processo da progressão tumoral em várias células teciduais, porque a RAS uma vez ativada sinaliza a via intracelular do ERK-MAPK, essas mutações são observadas nos códons 12, 13 e 16 em vários tumores humanos (MACIEL, KIMURA E CERUTTI, 2005).

2.5 CARCINOMA ANAPLÁSICOS

São carcinomas indiferenciados do epitélio folicular tireoidiano, de alta agressividade que perdeu em sua maioria ou totalidade o tecido de origem (CARVALHO E GRAF, 2005), porque são difíceis de serem diferenciados. As desordens moleculares são oriundas das mutações no gene RAS ou PIK3CA, porém, podem surgir de neoplasias já existentes que possuem fatores genéticos, como a inativação da *p53* ou pela ativação da β -catenina (SAINI *et al.*, 2018).

Na maioria dos casos de carcinoma anaplásico de tireoide (CAT) está presente mutações no gene supressor tumoral o *p53* cerca de 50% a 80% (HOU *et al.*, 2007; NIKIFOROVA *et al.*, 2013). Em relação a mutação RAS é observado cerca de 20% a 40% dos casos de CAT (CARLING *et al.*, 2014).

O carcinoma anaplásico de tireoide é podem invadir outros tecidos como gordura, esôfago, traqueia e laringe, mas na fase de metástase atinge os pulmões, ossos e cérebro, representa 70% dos casos (SAINI *et al.*, 2018; BIBLE *et al.*, 2021).

2.6 CARCINOMA MEDULAR

Nos carcinomas tireoidianos medulares é tumor neuroendócrino, decorrentes das células C que produzem calcitonina (MAIA *et al.*, 2014). Considerado um tumor neuroendócrino raro cerca de 2 a 4% dos casos de câncer de tireoide, onde observa-se mutações germinativas RET arranjadas o proto-oncogene *Transfection (RET)* representa 50% dos casos (OKAFOR *et al.*, 2021). Além disso, ocorrem em neoplasias endócrinas múltiplas do tipo II (MEN-2), que estão associadas as mutações nas células germinativas do proto-oncogene RET, e não nas translocações RET\PTC que são rearranjos cromossômicas (BIM *et al.*, 2019). Na maioria das vezes são vistos em canceres tireoidianos medulares esporádicos não familiares cerca de 70% dos casos (BARLETTA, NOSÉ, SADOW, 2021).

As mutações de RET estão envolvidos com as síndromes de neoplasia endócrina múltipla (MEN) tipo 2 MEN2A e MEN2B e carcinoma medular de tireoide familiar (CMFT), sendo que 70 mutações RET estão envolvidos, porém devido a indeterminada relação entre genótipo e fenótipo resultante do amplo leque multivariado das correlações clínicas inseridas nas diferentes famílias que apresentam essa mutação, além de dificultar tomada terapêutica integrada as síndromes (MEN) (WELLS *et al.*, 2013; CEOLIN *et al.*, 2019). Além disso, pode ocorrer novos rearranjos envolvendo o gene RET em carcinoma papilífero de tireoide CPT (STAUBITZ *et al.*, 2019).

Baloch e cols (2022) descrevem um sistema de classificação para CMT o uso na contagem mitótica, necrose tumoral e índice de marcação Ki67. Entretanto, o proto-oncogene C-MYC está associado a vários tumores porque este por ser um fator de transcrição desempenha um papel de ativador de genes regulatórios envolvidos na proliferação e diferenciação celular, em relação a tireoide fatores de crescimentos somando com o TSH podem ativar o C-MYC (BALOCH *et al.*, 2022). A expressão do C-MYC pode ser observada em neoplasias benignas ou malignas, como também em casos mais agressivos, a proliferação celular em tumores de tireoide pode estar associada com a expressão do C-MYC, com antígenos envolvidos proliferação celular o Ki-67 e antígeno nuclear de célula em proliferação o PCNA, sintetizado durante a fase S do ciclo celular (MATSUO *et al.*, 2004).

2.7 miRNA ou miR

O avanço científico e tecnológico proporcionou a descoberta das funções daqueles tidos como principais RNAs: RNA mensageiro (mRNA), molécula de transferência da informação durante a síntese de proteínas; RNA ribossômico (rRNA) componente da estrutura da síntese de proteínas e RNA transportador (tRNA) com capacidade de transportar os aminoácidos e interagir com as proteínas (COX *et al.*, 2012). Diversos estudos estruturais e funcionais do RNA têm sido realizados e possibilitaram a descrição de novas classes de RNA, com funções variadas e nos domínios *Archea*, *Bacteria* e *Eukaria* (BROSIUS e RAABE, 2016).

Enquanto a genômica considera e analisa os genomas como sequências codificadoras de mRNAs, rRNAs e tRNAs, a RNômica investiga, além desses, os genes codificadores de RNAs que não são traduzidos, mas que são RNAs funcionais e estão envolvidos em diferentes processos celulares (HÜTTENHOFER; SCHATTNER; POLACEK, 2005; ULVÉ *et al.*, 2007).

Os RNAs são transcritos a partir de um molde de DNA e podem ser classificados de acordo com sua função (QUADRO 8). Além desse grupo principal, existe um segundo grupo composto por uma grande variedade de RNAs com funções especiais e que não contém informação para síntese protéica: *riboswitches*, RNAi, snoRNA, miRNA/sRNA entre outros (ZAHA *et al.*, 2014). Os *riboswitches* são RNAs que passam por uma mudança em sua estrutura em resposta a ligação de moléculas regulatórias e agem em *cis* no controle da expressão de uma ampla gama de genes bacterianos (WATERS e STORZ, 2009). Os RNAi, ou RNAs de interferência, participam de um mecanismo natural de regulação pós-transcricional da expressão gênica que pode silenciar genes individuais criando um fenótipo *knockout* (WINKLER, 2005). Os snoRNA são exclusivos de eucariotos e modificam quimicamente outros ncRNAs como por exemplo rRNA, tRNA. Os miRNAs, que são equivalentes aos sRNAs de procariotos, estão envolvidos em diversos processos regulatórios pós-transcricionais (HAN *et al.*, 2013; AZHIKINA *et al.*, 2015).

QUADRO 8 - Classes de RNAs e suas respectivas funções.

Tipo	Tipo	Tipo	Tipo	Função
Codificador	mRNA (mensageiro)	Presente	Presente	Síntese de proteínas
Não Codificador	rRNA (robossômico)	Presente 70S(50S+30S)	Presente 80S(60S+40S)	Síntese de Proteínas
	tRNA (transportador)	Presente	Presente	Transportador de aminoácido ao local de síntese proteínas
	snoRNA (RNA nucleolar)	Ausente	Presente	Maturação de ribossomos e RNAs transportadores
	snRNA (RNA nuclear)	Ausente	Presente	Síntese do mRNA eucariótico
	sRNA (RNA pequeno)	Presente	Presente	Modula a transcrição e a estabilidade de mRNAs
	CRISPR (RNA CRISPR)	Presente	Presente	Sistema de defesa bacteriana
	miRNA (micro RNA)	Ausente	Presente	Silenciamento gênico pela inibição da tradução e cliva mRNAs
	siRNA (RNA interferência)	Ausente	Presente	Silenciamento gênico
	piRNA (RNA liga-se PIWI)	Ausente	Presente	Silenciamento gênico em células germinativas
	lncRNA (RNA longo)	Ausente	Presente	Regulação biológica e processos de desenvolvimento de doenças

FONTE: Modificado de Zaha *et al.*, 2014.

A nomenclatura dos RNAs não codificadores é bastante diversa e foi variando ao longo tempo e de acordo com o avanço do conhecimento a respeito dessas moléculas (HÜTTENHOFER; SCHATTNER; POLACEK, 2005; HÜTTENHOFER e VOGEL, 2006). Em eucarioto os RNAs não codificadores com função regulatória são constituídos de moléculas pequenas de RNA de fita simples que atuam na regulação pós-transcricional da expressão gênica, regulam importantes vias de sinalização e no controle de diversos processos fisiopatológicos (BARTEL, 2004; WAHID *et al.*, 2010).

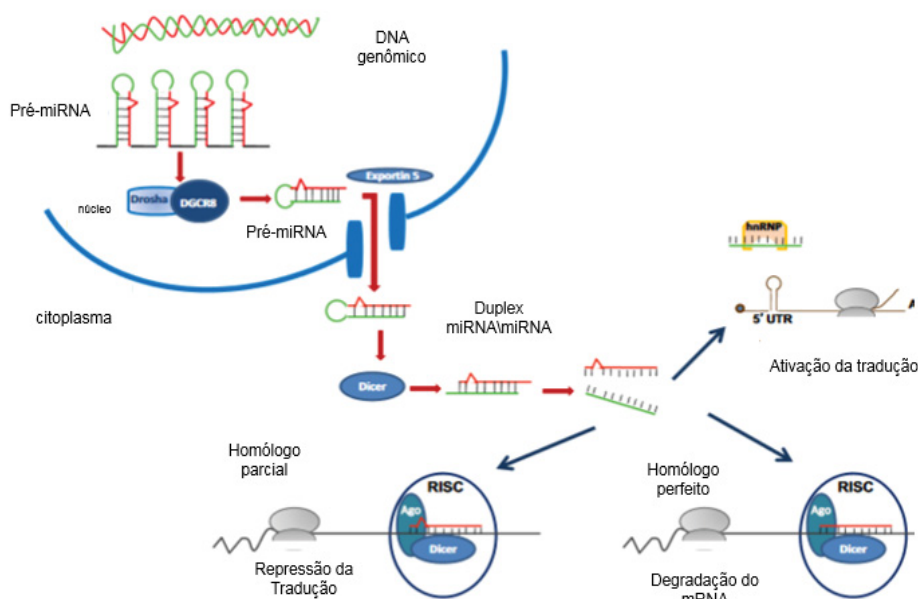
Wightman e Ruvkun (1993) descobriram o primeiro miRNA *lin-4* (do inglês *lineage-deficient-4*) em estágio larval do nematódeo *Caenorhabditis elegans*, uma nova classe de pequenos RNAs reguladores da expressão gênica em nível pós-transcricional nas regiões intergênicas e intrônicas (WIGHTMAN e RUVKUN, 1993). Estudos identificaram cerca de 462 microRNAs até o momento (RICARTE-FILHO e KIMURA, 2006).

Recentemente estudos sugerem que um importante causa de tumores malignos esteja relacionada a superexpressão de transcritos não codificadores,

evidentes na subclasse de RNAs não codificadores (ncRNAs) chamados de microRNAs (*miRNAs* ou *miR*) (HUANG *et al.*, 2013).

O processo de biogênese dos microRNAs inicia-se com a transcrição do gene pela ação da polimerase II, dando origem ao transcrito longo pré-miRNA de estrutura *hairpin* contendo cap 5' e uma cauda poli (A) (TAGLIAFERRI *et al.*, 2010). Este transcrito é clivado pela enzima RNase III, *Drosha* que possui o cofator DGCR8 (do inglês *DiGeorge syndrome critical region gene 8*), formando o pré-miRNA de aproximadamente 70 nucleotídeos que sofre ação da enzima Dicer, fita para formar um microRNA de fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos (RICARTE-FILHO e KIMURA, 2006). O processamento de microRNA resulta na degradação de uma das fitas do duplex e a outra fita permanece no complexo RISC (FIGURA 4) (TAGLIAFERRI *et al.*, 2010).

FIGURA 4 - Classes de RNAs e suas respectivas funções.



FONTE: Modificado de Tagliaferri *et al.*, 2010.

O microRNA de fita simples regulador é pós-transcricional na região 3'UTR, o pareamento de bases com seus mRNAs alvos é imperfeito, resultando na inibição da tradução ou degradação do mRNA alvo, podem regular inúmeros alvos devido

ao tamanho de nucleotídeos dos microRNAs (BARTEL, 2004; WAHID et al., 2010; FARAZI et al., 2013; MITASH et al., 2017).

2.7.1 microRNA E CÂNCER

A expressão do microRNA está alterada em alguns tumores, e mutações inativadoras tumor-específicas foram identificadas em alguns microRNAs, podendo atuar como genes supressores de tumores (ZHANG *et al.*, 2006; FARAZI *et al.*, 2013). No genoma humano evidências de microRNAs em regiões propícias a carcinogênese apresenta uma incidência de 50% (RICARTE-FILHO e KIMURA, 2006).

Calin e colaboradores (2002) descobriram frequentes deleções e a inibição dos miR15 e miR16 na região 13q14 em casos de leucemia linfocítica crônica, que inibiam a expressão de um oncogene, logo identificado como anti-apoptótico BCL-2) (CALIN *et al.*, 2002). Em câncer de pulmão, considerado uns dos mais agressivos, analisaram que a diminuição do miRNA let-7 modula a ação dos oncogenes *RAS* e *MYC* (ZHANG *et al.*, 2006).

Ação oncogênica está com expressão aumentada em tumores que modulam negativamente os genes supressores tumorais, como é o caso do miR-221 em glioblastoma, e do miR-372 e do miR-373 em neoplasia de células testiculares e do miR-221, miR-222 e miR-146 nos tumores de tireoide. Exemplos de miRNAs estão listados na (QUADRO 9) (RICARTE-FILHO e KIMURA, 2006).

QUADRO 9 - Exemplos de alguns microRNAs e suas respectivas associações.

miRNA	Associação
miR-375	Secreção de insulina.
miR-14	Metabolismo de adipócitos.
miR-143	Diferenciação de adipócitos.
miR-15/miR-16	Freqüentemente deletados ou inibidos em leucemia linfocítica crônica e adenomas hipofisários.
miR-143, miR145	Diminuídos em câncer colorretal e linhagem celular de câncer linfóide, mama, próstata e colo uterino.
Let-7	Inibição da diferenciação e proliferação celular; diminuído em câncer de pulmão.
miR-155	Aumentado em linfomas e câncer de mama.
miR-221, miR-222, miR-146	Aumentados em câncer de tireóide.
miR-21	Fator anti-apoptótico; aumentado em glioblastoma e câncer de mama.
miR-17-92	Aumentado em linfomas e carcinoma de pulmão.

FONTE: Modificado de Ricarte-Filho e Kimura, 2006.

2.8 PREDIÇÃO microRNAs E SEUS mRNAs ALVOS

Abordagens computacionais são bastante úteis para a predição de microRNAs. Muitas delas baseiam-se na busca da complementaridade de sequência a sítios alvos com ênfase no pareamento perfeito de bases e na conservação de sequências. Programas como TargetScan (LEWIS, BURGE e BARTEL, 2005), PicTar (CHEN *et al.*, 2005) e TargetRank (NIELSEN *et al.*, 2007). RNAhybrid (KRÜGER e REHMSMEIER, 2006) e STarMir (RENNIE *et al.*, 2014) permitem a predição de estrutura secundária pelo cálculo da energia de hibridização entre microRNA e mRNA alvo. O TarBase (SETHUPATHY, CORDA e HATZIGEORGIOU, 2006) possui informações experimentalmente validados de sequências microRNAs. Nos bancos de dados miRBase (KOZOMARA e GRIFFITHS-JONES, 2006), miRGen (GEORGAKILAS *et al.*, 2015), Argonaute (SCHRAIVOGEL e MEISTER, 2014), miRNAmap (WASHIETL e HOFACKER, 2006) constam anotações e organização genômica com base na literatura.

A modelagem de sistemas biológicos *in silico* permite a aplicação de vários métodos experimentais de regulação/control de processos biológicos, determinação da organização de redes de interação *in vivo*, com o desenvolvimento de estratégias matemáticas para diferentes condições fisiológicas do organismo

(BRENNECKE *et al.*, 2005). As interações que envolvem microRNAs e seus mRNA alvo, que correspondem às proteínas responsáveis por respostas celulares específicas, constituem um circuito regulatório (MODI *et al.*, 2011). A avaliação global da expressão do mRNA abordagens incluem a detecção direta por meio de *microarrays*, *northern blotting*, (WASSARMAN *et al.*, 2001; LIVNY e WALDOR, 2007; ALTUVIA, 2007; MODI *et al.*, 2011), *Clip-seq* (CLARK *et al.*, 2014) e estudos de sequenciamento o CLIP-seq (Reticulação e imunoprecipitação por ligação ao RNA) (WANG, 2016).

Recentemente estudos relacionados a ação pós-transcricional dos microRNAs na regulação da expressão de genes em importantes vias de sinalização, mostraram que a desregulação do estímulo da diferenciação celular pode levar ao desenvolvimento de uma neoplasia celular. Eles são frequentemente desregulados em diferentes malignidades, e no Carcinoma papilífero de tireoide ambos são regulados positivamente e associados a tecidos tumorais diferenciados (AGRAWAL *et al.*, 2014).

3. METODOLOGIA

Esta seção apresenta a metodologia utilizada no desenvolvimento da Tese de acordo com as etapas seguir:

3.1.1 TIPO DA PESQUISA

Trata-se de um estudo descritivo, retrospectivo e transversal. Foram coletados dados de 449 das citopunções realizadas no Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná – SEMPR.

3.1.2 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética (CEP) em Seres Humanos do Complexo Hospital de Clínicas (HCH) – Universidade Federal do Paraná (UFPR), apresenta registro: **CAEE**: 84075318.2.0000.0096, cujo parecer: 3.527.405 e a data de aprovação: 23/08/2019. O parecer consubstanciado do CEP consta em AENXO I.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento (TCLE), foi aplicado aos pacientes do ambulatório de procedimentos de punção de tireoide no Serviço de Endocrinologia e Metabologia da Universidade Federal do Paraná – SEMPR\UFPR, onde explicávamos sobre a pesquisa, e se houvesse interessante em participar, seria necessário ceder uma das lâminas das punções de tireoide, realizadas anteriormente, mediante a assinatura. Pois, as lâminas de punção de tireoide solicitadas aos pacientes eram aquelas de exame anterior que já estavam armazenadas no arquivo de lâminas do Departamento de Patologia do Hospital, sendo assim, por constar amostra tecidual da tireoide do participante da pesquisa, fez necessário a aplicação do TCLE (ANEXO 2)

3.1.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Os dados demográficos foram obtidos a partir dos prontuários cadastrados no Sistema de Informação Hospitalar (SIH), sendo que as variáveis clínico-demográficas dessa seleção foram: o número do registro, data do exame, sexo, idade, diagnóstico da citopunção, bem como número de repunções realizadas, qual Bethesda da repunção, se o paciente realizou tireoidectomia parcial ou total, o resultado da tireoidectomia e a evolução clínica.

Os dados obtidos foram compilados no *Software* Microsoft® Excel® para Notebook Asus (Versão), para a obtenção da planilha utilizada para as análises estatísticas.

3.1.4 PROCEDIMENTOS DE COLETA E DE DADOS

Desde 1990, a equipe da Unidade de Informação do HC-UFPR vem trabalhando na informatização do hospital, desenvolvendo o *Sistema de Informações Hospitalares (SIH)*. O SIH é um sistema com arquitetura centralizada, baseada em um Servidor AIX, ligado a uma rede de 1.595 microcomputadores. Vários módulos (subsistemas) integram o SIH, todos desenvolvidos especificamente para a área médico-hospitalar pela Unidade de Informação.

Utilizando-se a classificação indicada por Prodanov e Freitas (2013) o presente estudo se classifica como: (a) aplicado, quanto à sua natureza, visto que busca gerar conhecimentos por meio de aplicação prática diagnósticos de pacientes com nódulos de tireoide; (b) descritivo, quanto aos seus objetivos, pois se almeja descrever características encontradas nos prontuários dos pacientes submetidos a punção aspirativa por agulha fina (PAAF); (c) sob o ponto de vista dos procedimentos técnicos, como pesquisa de campo, pois tivemos por finalidade conseguir dados através do Sistema de Informação Hospitalar (SIH). A base de dados analisada foi estruturada a partir das informações das citopunções disponíveis no SIH, realizadas no Serviço de Endocrinologia e Metabologia do

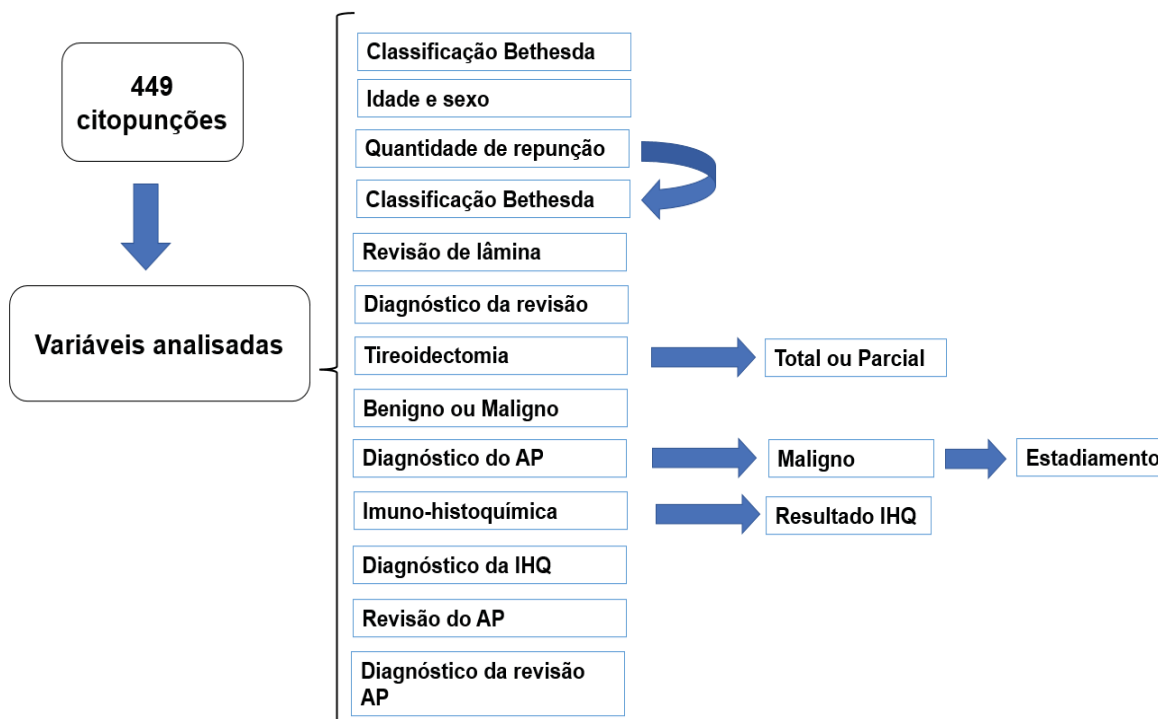
Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná – SEMPR\CHCUFPR. O estudo utilizou a base de dados atualizada no SIH em janeiro de 2022.

Além disso, no presente estudo realizou-se a modelagem de sistemas biológicos in silico para identificar microRNAs nas regiões intrônicas dos transcritos o gene BRAF (Item 3.7 da seção 3).

3.1.5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS ANALISADAS

Foram analisadas as características clínicas das seguintes variáveis: a classificação Bethesda, idade e sexo; a quantidade de repunções, qual a classificação Bethesda dos casos repuncionados; se houve revisão de lamina da citopunção e qual o diagnóstico resultante da revisão; observou-se os casos e tireoidectomia e se a remoção cirúrgica foi total ou parcial, se o diagnóstico do anátomo patológico (AP) era maligno ou benigno; o estadiamento do tumor, os anátomos patológicos que apresentam imuno-histoquímica com diagnóstico e a revisão do AP com diagnóstico (FIGURA 5).

FIGURA 5 - Variáveis analisadas das 449 citopunções.



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: AP = Anátomo Patológico; IHQ = Imuno-histoquímica.

3.1.6 ANÁLISE ULTRASSONOGRÁFICAS

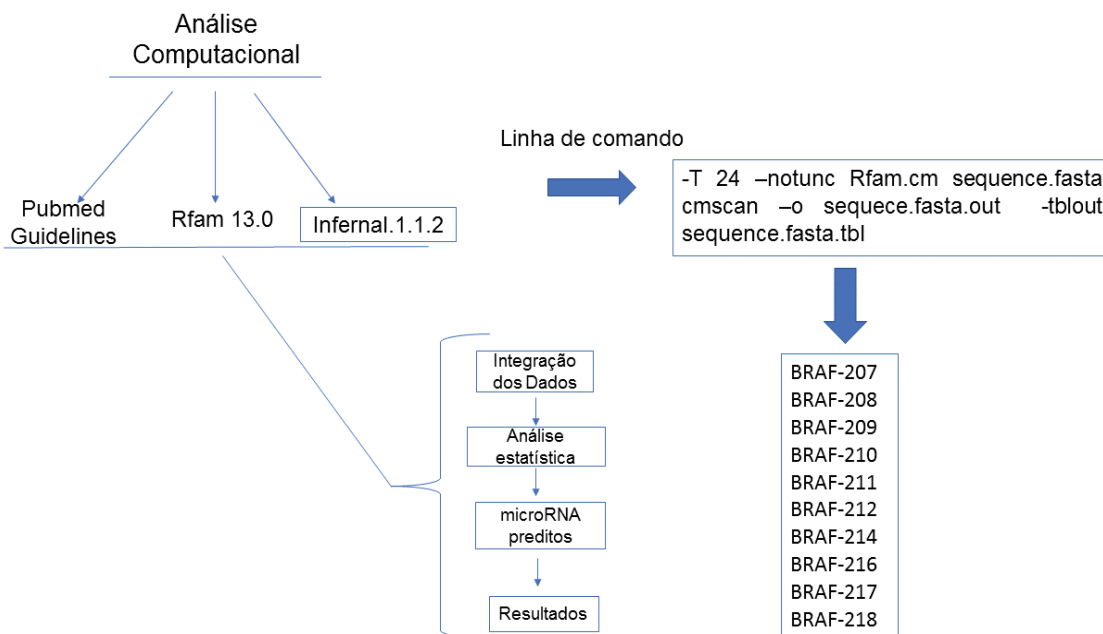
Os resultados das ultrassonografias (US) foram obtidos através do Sistema de Informação Hospitalar (SIH), pelo sistema do ambulatório de Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná – SEMPR para corroboração do estudo. O procedimento de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é guiada por ultrassom e antes da realização da PAAF há dados de ultrassonográficos da doença nodular no prontuário do paciente, pois para um nódulo ser puncionado se faz necessário um exame de US anterior e juntamente com a avaliação clínica e histórico do paciente.

3.1.7 ANÁLISE CITOLÓGICA

A análise citológica obedeceu aos critérios sugeridos pela *Cancer Intitute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference Guideline* (CIBAS e SYED, 2009). O Departamento de Patologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná – CHCUFPR, possui o protocolo PAAF de tireoide, idealizado pelos Médicos do Hospital de Clínicas: Dra. Teresa Cristina Santos Cavalcanti, Dr. Arthur Conelian Gentili, Dr. Fabrício Machado Marques e Dr. Maurício Lirani Antonello. O protocolo PAAF em ANEXO 3 é utilizado como referência na rotina da análise citológica de tireoide pois segue os critérios do *Cancer Intitute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference Guideline*.

3.2 CONJUNTO DE DADOS UTILIZADOS PARA CARACTERIZAÇÃO IN SÍLICO DE microRNAs NAS REGIÕES INTRÔNICAS DO GENE BRAF

Diante da importância que os non-coding RNA vem desempenhando na regulação pós-transcricional nas células alvo, fez o uso da ferramenta infernal-1.1.2, a seguinte linha de comando foi utilizada: *cmscan -o sequencegene.out -tblout sequencegene.tbl -T 24 -notrunc Rfam.cm sequencegene*, o fluxograma análise computacional para prever non-coding RNA os seguintes transcritos que não codificam proteína listados, também chamados de regiões intrônicas (FIGURA 6). O resultado da predição evidencia a existência de ncRNAs nos transcritos BRAF-207, BRAF-208, BRAF-209, BRAF-210, BRAF-211, BRAF-212, BRAF-214, BRAF-216, BRAF-217 e BRAF-218, considerados íntrons que não codificam proteínas, porém, com o uso da ferramenta infernal-1.1.2, pode-se observar a nomenclatura dos ncRNAs, bem como a predição de ncRNAs no transcrito o uso da ferramenta infernal-1.1.2.

FIGURA 6 - Fluxograma análise computacional *in silico*.

FONTE: Os autores (2023).

Realizamos a avaliação dos dados no presente estudo para os transcritos do gene BRAF, descritos na figura 19, onde pudemos analisar a distribuição dos dados na investigação da predição *in silico* de microRNAs nas regiões consideradas não codificadores de proteínas, também chamadas de regiões intrônicas.

A ferramenta computacional Infernal 1.1.2 foi empregada para este estudo (Item) e a detecção de múltiplas covariâncias e análise de sequência teve como entrada o banco de dados da família de RNA (Rfam, link disponível <http://rfam.xfam.org/>; acessado em 06 de agosto de 2019), enquanto a previsão dos nove transcritos de ncRNAs compunham o as regiões intrônicas do gene BRAF, e da sequência BRAF e GRCh 38.p 14 conforme demonstrado no (Material Suplementar 1).

TABELA 1 - Transcritos do gene BRAF.

Nome	ID Transcrito	Quantidade de pares de bases	Acesso
BRAF-212	<u>ENST00000644120.1</u>	3889	06\08\2019
BRAF-211	<u>ENST00000643790.1</u>	575	06\08\2019
BRAF-208	<u>ENST00000642808.1</u>	439	06\08\2019
BRAF-214	<u>ENST00000644905.1</u>	5217	06\08\2019
BRAF-209	<u>ENST00000642875.1</u>	2871	06\08\2019
BRAF-207	<u>ENST00000642272.1</u>	2320	06\08\2019
BRAF-218	<u>ENST00000646427.1</u>	2265	06\08\2019
BRAF-216	<u>ENST00000645443.1</u>	2190	06\08\2019
BRAF-217	<u>ENST00000646334.1</u>	1779	06\08\2019
BRAF-210	<u>ENST00000643356.1</u>	853	06\08\2019
BRAF	<u>ENSG00000157764</u>	3447	06\08\2019
GRCh 38.p 14	<u>NC_000007.14</u>	3449	06\08\2019

FONTE: autores (2023).

3.2.1 ANOTAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE microRNAs

Para anotação das sequências de microRNAs iremos utilizar o banco de dados online Rfam¹ versões 12.0 e 12.1. Este banco contém uma coleção de famílias de ncRNA representada por sequências de alinhamentos manualmente curadas, estruturas secundárias consenso, anotações colhidas de fontes de taxonomia e ontologia (NAWROCKI e EDDY, 2013). A base é uma fonte ampla e diversificada de ncRNAs, inclui 2.474 famílias de ncRNAs, com informações sobre diversos tipos de ncRNAs em todo os três domínios da vida e vírus. Infernal 1.1.1 foi usado para realização de alinhamentos múltiplos de sequências pelo modelo de covariância e, além da anotação de ncRNAs, o Rfam 12.1 classifica os ncRNAs e

¹ <http://rfam.xfam.org>

² <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

fornece referências bibliográficas para cada família, *links* para o PDB (*do inglês Protein Data Bank*), miRBase, ENA e Gene Ontology (GO).

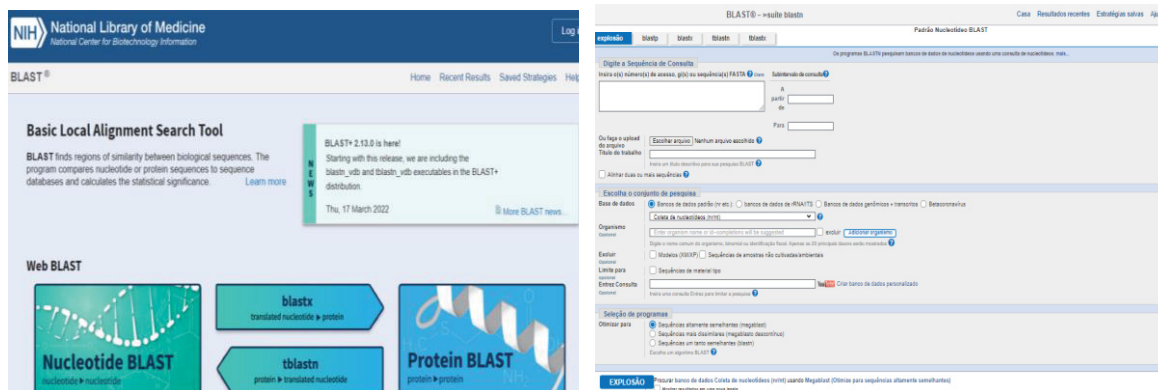
3.2.2 FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

As seguintes ferramentas de bioinformática que foram utilizadas:

3.2.3 BLAST²

O algoritmo utilizado pelo programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), compara sequências de nucleotídeos ou proteínas com sequências de base de dados e calcula a significância estatística dos alinhamentos (FIGURA 7). Este algoritmo permite diferentes comparações de sequências: Blastp compara sequências de aminoácidos (*query*) contra um banco de dados de sequências de proteínas (*subject*); Blastn compara sequências de nucleotídeos contra banco de dados de sequências de nucleotídeos; Blastx compara sequências de nucleotídeos traduzidas para todas as fases de leitura possíveis contra um banco de dados de sequências de proteínas; tBlastn compara sequências de aminoácido contra um banco de dados de sequências de nucleotídeos traduzidas e tBlastx compara as seis fases de leitura de uma sequência de nucleotídeos contra um banco de dados de nucleotídeos traduzido para possíveis fases de leitura (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

FIGURA 7 - Interface do BLAST ferramenta do NCBI de alinhamento de sequencias local.



FONTE: Tela do BLAST. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 10 dez. 2022.

A vantagem de utilizar a ferramenta Blast é a facilidade de manuseio e compreensão para inserção dos dados, o tempo de processamento dos dados é curto agilizando a interface dos resultados, além da disponibilidade online e de fácil acesso aos profissionais e pesquisadores que precisam utilizar. Já a desvantagem seria pelo fato de não utilizar o alinhamento global do que diz respeito a distância evolutiva entre as sequências.

3.2.4 miRBase³

Ferramenta computacional *online* que fornece interfaces para sequências de microRNAs, abrange dados de anotação gênica e preditos alvos, nomenclatura e publicações de novas sequências microRNAs (GRIFFITHS-JONES, 2006) (FIGURA 8).

A última versão do miRBase possui 24.521 loci de microRNAs que abrange 206 espécies, com capacidade de processamento em produzir 30.424 microRNAs maduros, os dados são atualizados em resposta a descoberta e ao desenvolvimento de métodos de sequenciamento de microRNAs, mantendo o padrão de mapeamento (KOZOMARA E GRIFFITHS-JONES, 2014).

³<http://www.mirbase.org/>

FIGURA 8 - Interface do miRBase ferramenta banco de dados de microRNAs.

The screenshot shows the miRBase website interface with the following sections:

- Por identificador de miRNA ou palavra-chave:** A search bar with buttons for 'Enviar', 'Redefinir', and 'Exemplo'.
- Para clusters:** A section for selecting an organism and inter-miRNA distance, with a 'Distância inter-miRNA: 10000' field and an 'Obter clusters' button.
- Por expressão tecidual:** A section for selecting an organism and tissue, with a 'Selecione o tecido:' dropdown and an 'Obter experimentos' button.
- Por sequência:** A section for sequence-based searches. It includes a text area for pasting a sequence, a 'Selecione o arquivo de sequência que deseja usar' dropdown, and a 'Pesquisar miRNAs' button. It also features a 'Sequências de pesquisa:' dropdown (set to 'miRNAs maduras'), a 'Método de pesquisa:' dropdown (set to 'BLASTN'), a 'Corte do valor E:' input field (set to '10'), a 'Nº máximo de acertos:' input field (set to '100'), and a 'Mostrar resultados apenas de organismos específicos:' section with checkboxes for 'humano', 'mouse', 'verme', 'mosca', and 'Arabidopsis'. A 'No species filter' dropdown is also present.

FONTE: Tela do miRBase. Disponível em: <https://www.mirbase.org/>. Acesso em: 10 dez. 2022.

O miRBase possui pré-miRNAs validados experimentalmente que muitos outros bancos não apresentam como o RNAFold, porém anotações de baixa confiança por inclusas necessitam ainda de validação experimental dessas sequencias.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise descritiva das variáveis estudadas, foram calculadas as médias, desvios padrão, mínimo e máximo, Boxplot e proporções, a fim de fornecer uma visão geral dos dados (BRUNI et al., 2013; OGLE, WHEELER e DINNO, 2019; MATLOFF, 2019). Utilizou-se o boxplot para avaliar a homogeneidade da variância nas variáveis (FRASER, 1992) e para verificar a independência entre os grupos das variáveis nominais foi utilizado o teste G/Qui-Quadrado (SOKAL e ROHLF, 1995). Além disso, para descobrir se havia diferenças entre as médias das variáveis numéricas, foram utilizados o teste T e o teste Cramer V2 para verificar a força de associação das variáveis qualitativas, software R 3.5.2 e Microsoft Excel (FIELD, 2009). Nos casos em que foi necessário, utilizou-se um nível de confiança de 95%.

Para análise dos dados da caracterização funcional de microRNA nos transcritos do gene BRAF, os dados foram descritos por procedimentos estatísticos que possibilitem resumir, formar, explicar e transmitir a informação numérica. As

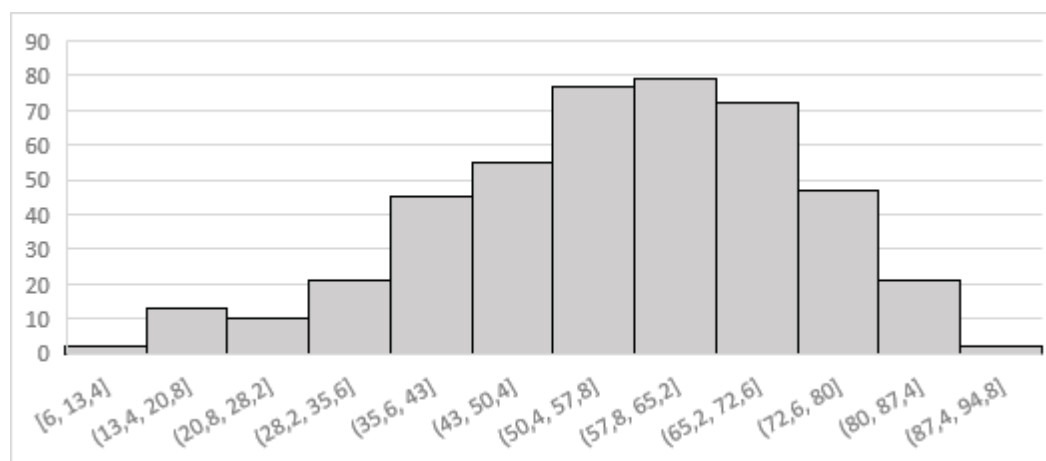
informações obtidas, foram lançadas em planilhas no programa *Microsoft Excel*[®] 2019, em seguida, gerados os dados, aplicando técnicas de análises estatísticas descritivas, obtido os resultados definitivos em frequência de simples e absoluta (%), demonstrados em média, desvio padrão, valores mínimos, quartis e valores máximos. Após a análise descritiva foi utilizado o software *RStudio* versão 4.2.0. para o ajuste dos modelos.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram coletados dados de 449 pacientes submetidos a punção aspirativa por agulha fina (PAAF), registrados pelo Sistema de Informação Hospitalar (SIH), no período de janeiro de 2017 a janeiro de 2022. As estatísticas descritivas, bem como o histograma, mostram uma assimetria em relação a faixa etária, haja vista o quantitativo maior de pacientes com idades bem inferiores à média (GRÁFICO 1).

GRÁFICO 1 - Histograma idade.



FONTE: Os autores (2022).

Seguindo a descrição do conjunto de dados analisados, a TABELA 3 apresenta o gênero dos pacientes:

TABELA 2 - Sexo dos pacientes.

Rótulos de Linha	Frequência Absoluta	Porcentagem
F	396	88,17%
M	53	11,83%
Total Geral	449	100,00%

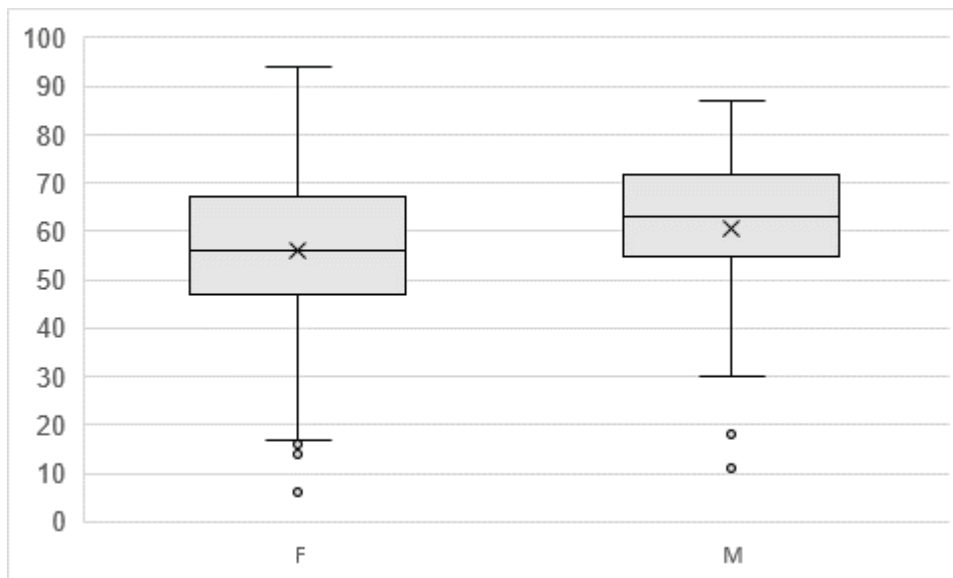
FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA:

F = Feminino; M = Masculino.

Considerando a idade média de 56 anos e que a maioria dos pacientes é do gênero feminino, o GRÁFICO 2 apresenta a distribuição etária por sexo:

GRÁFICO 2 - Box plot das idades por sexo.



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA:

F = Feminino; M = Masculino.

Constata-se que a média etária dos dois grupos é similar, entretanto, há uma maior dispersão entre as idades no grupo formado pelas mulheres. Este dado era esperado visto que o câncer de tireoide é o mais frequente na região da cabeça e pescoço em mulheres do que em homens, segundo os dados do Instituto Nacional de Câncer o câncer de tireoide afeta três vezes mais pessoas do sexo feminino do que do sexo masculino, tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos (INCA - 2022; 2022 – American Cancer Society) Fatores de risco como histórico do paciente submetido a irradiação, e ou histórico familiar de câncer tireoidiano e regiões com dietas pobres em iodo (2022 – INCA).

Segundo dados de estatística do câncer de tireoide nos Estados Unidos estima-se 43.800 novos casos, a incidência de 14.2 dentre os anos 2014 – 2018 (2022 – American Cancer Society). Já no Brasil estima-se 4.820 casos sendo 760 homens e 4.060 mulheres (2022- INCA).

Os carcinomas diferenciados como o CPT representam 80% dos casos, ao passo que CFT responde por 20% dos casos, sendo o carcinoma de células de Hürthle menos frequente. Ao contrário, os carcinomas pouco diferenciados e indiferenciados representam 10% dos casos. Segundo o Instituto Nacional de Câncer a estimativa de câncer de tireoide em torno de 13.780, 1.830 sendo homens e 11.950 mulheres (2020 – INCA).

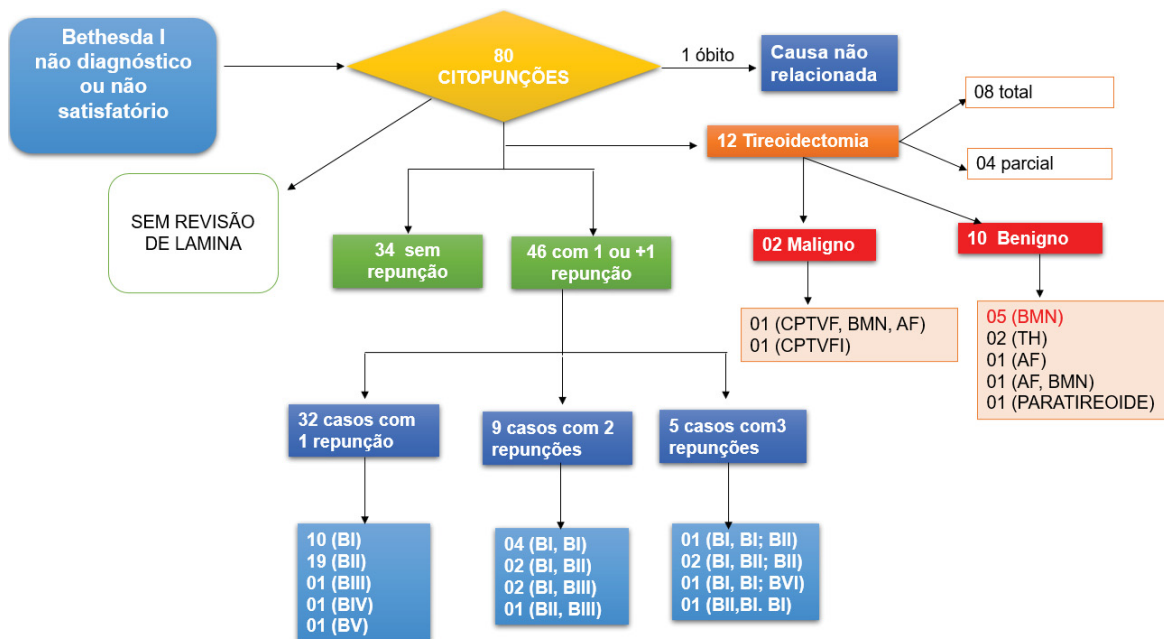
4.1.2 CLASSIFICAÇÃO BETHESDA I NÃO DIAGNÓSTICO OU NÃO SATISFATÓRIO

Citopunções conforme o Laudo de Citopatologia da Classificação Bethesda I não diagnóstico ou não satisfatório. Das 449 punções aspirativas por agulha fina (PAAF), 80 enquadravam-se na classificação Bethesda I, sendo que 34 pacientes não tinham repunção e 46 com mais de uma citopunção, desses 46 casos repuncionados, 32 casos com uma repunção obtiveram 5 (cinco) desfechos classificados em: 10 casos Bethesdas I, 19 Bethesda II, 1 (hum) Bethesda III, 1 (hum) Bethesda IV e 1 (hum) caso Bethesda V. Já 9 (nove) casos com duas repunções com desfechos classificados em: 4 (quatro) casos duplamente Bethesda I; 2 (dois) casos com Bethesda I e Bethesda II; 2 (dois) casos com Bethesda I e Bethesda III e 1 (hum) caso de Bethesda II e Bethesda III.

Foi observado dentre os casos que apresentaram mais de uma citopunção: 5 (cinco) casos de pacientes que haviam sido submetidos a 3 (três) repunções cujos desfechos foram: 1 (hum) com Bethesdas (BI, BI e BII); 2 (dois) casos classificados (BI, BII, BII); 1 (hum) com Bethesdas (BI, BI e BVI), e por fim 2 (dois) com repunções (BII, BI e BI) (FIGURA 9).

É importante ressaltar no fluxograma da figura 8 que não foram observados casos de revisão de lâmina da PAAF, e o 1 (hum) óbito descrito não tem causa relacionada.

FIGURA 9 - Fluxograma das citopunções Bethesda I.



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; B VI = Malignidade; CPTVF = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular; BMN = Bócio Multinodular; AF = Adenoma Folicular; TH = Tireoidite Hashimoto; Paratireoide.

Houve indicação cirúrgica para 12 pacientes: sendo que 8 (oito) casos foram submetidos a tireoidectomia total e 4 (quatro) a tireoidectomia parcial. É interessante notarmos que somente 2 (dois) pacientes tiveram o anátomo patológico maligno para Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular. Nos pacientes com anátomo patológico benigno foi observado a frequência de 5 (cinco) pacientes com bócio multinodular, em comparação ao 1 (hum) caso de tireoidite de Hashimoto, 1 (hum) de Adenoma Folicular com Bócio Multinodular e uma paratireoide (FIGURA 9).

Os anátomos patológicos sem o exame de imuno-histoquímica, em suma não sendo necessário a solicitação conforme a indicação clínica e o diagnóstico do anátomo, dentre os 12 tireoidectomizados apenas 9 (nove) não possuem este exame. É importante considerar que o exame de imuno-histoquímica é uma avaliação confirmatória de um determinado diagnóstico, assim na tabela 3. O caso clínico de um paciente de 48 anos de idade, sexo feminino, tem duas repunções anteriores cujo diagnóstico foi Bethesda III e Bethesda I, passou pela tireoidectomia

total da tireoide, onde o resultado do anátomo patológico veio condizente ao Carcinoma Papilífero de tireoide Variante Folicular medindo 2,7cm no maior eixo, localizado no lobo esquerdo e istmo com estadiamento pT2 pN1a. Nesse caso, não foi requerido a imuno-histoquímica pois realizaram a tireoidectomia total somado ao esvaziamento cervical nível VI, congelação no intra-operatório com metástase linfonodal de Carcinoma Papilífero de tireoide (TABELA 3).

TABELA 3 - Anátomo patológico sem imuno-histoquímica.

Bethesda	Sexo	Idade	Repunção Quantidade	Bethesda Repunção	Parcial Total	Maligno Benigno	Diagnóstico AP	Estadiamento
BI	F	60	1	IV	Total	Benigno	BMN	
BI	F	40	1	I	Total	Benigno	AF	
BI	F	53	1	II	Parcial	Benigno	AF, BMN	
BI	F	84	0		Parcial	Benigno	Paratireoide	
BI	F	67	3	I, I, II	Total	Benigno	BMN	
BI	F	44	0		Parcial	Benigno	TH	
BI	F	54	0		Parcial	Benigno	BMN	
BI	F	54	1	I	Total	Benigno	TH	
BI	F	48	2	III, I	Total	Maligno	CPTVFI	pT2 pN1a

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; B VI = Malignidade; CPVF = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular; BMN = Bócio Multinodular; AF = Adenoma Folicular; TH = Tireoidite Hashimoto; Paratireoide; AP = Anátomo Patol

QUADRO 10 - Anátomo patológico com imuno-histoquímica.

Bethesda	Sexo	Idade	Repunção Quantidade	Bethesda	Parcial Total	Maligno Benigno	Diagnóstico	Estadiamento	Imuno-histoquímica	Diagnóstico	Citoqueratina 19	Cromogranina	TTF-1	HBME-1	*Ki-67	CK19	CD56	CD57	Galectina-3	Revisão de AP	Diagnóstico (RAP)
BI	F	28	2	I, I	Total	Maligno	CPTVFI BMN AF	pT1a pNx	2	CPT AF	+ -	-			+		-	+	+	1	micro CPVFI
BI	F	70	1	V	Total	Benigno	BMN		1	NFO			+	-	+	+			+	0	

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA:

BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BV = Suspeito para malignidade; CPT = Carcinoma Papilífero de Tireoide; CPVFI = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular Incidental; BMN = Bócio Multinodular; AF = Adenoma Folicular; Paratireoide; NFO = Neoplasia Folicular Oncótica; AP = Anátomo Patológico; RAP = Revisão Anátomo Patológico; TTF-1 = fator de transcrição da tireoide-1; HBME-1 = Anticorpo Monoclonal de Camundongo; Ki-67 = anticorpo monoclonal, *Ki-67 = < 1%; CK-19 = Citoqueratina 19; CD-56 = Células Natural Killer CD56; Células Natural Killer CD57.

Os dois casos que realizaram o exame de imuno-histoquímica provenientes de tireoidectomia total, e com repunção anterior (QUADRO 10). O anátomo patológico maligno condizente com Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular Incidental e bem diferenciado, no lobo esquerdo com estadiamento pT1a pNx, cuja imuno-histoquímica para os marcadores citoqueratina 19, galectina-3 e CD57 foram positivos, e negativo para cromogranina, CD56 e Ki-67 com < 1%, por sua vez, confirmando o diagnóstico de Carcinoma Papilífero de Tireoide. Além disso, segunda imuno-histoquímica realizada no anátomo patológico de Bócio multinodular e Adenoma Folicular, do lado direito da tireoide, notou-se positividade do marcador CD56, ao contrário da galectina-3 e da citoqueratina 19 que foi negativo (QUADRO 10).

Como pode-se observar o anátomo patológico benigno para Bócio multinodular de tireoide teve o resultado da imuno-histoquímica para Neoplasia, os marcadores CK19 positivo, mas de pequena área focal, HBME-1, negativo, GALECTINA3 positivo e de pequena área focal, TTF-1 positivo, Ki-67 positivo aproximadamente 1%. Nesse caso não houve a necessidade da revisão da lâmina do anátomo patológico, ao contrário do CPVFI que a revisão do AP confirmou o microCPVFI (QUADRO 11).

QUADRO 11 - Anátomo patológico com revisão de lâmina.

Bethesda	Sexo	Idade	Repunção Quantidade	Parcial Total	Maligno Benigno	Diagnóstico	Revisão de RAP	Diagnóstico
BI	F	55	0	Total	Benigno	BMN	1	BMN

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BMN = Bócio multinodular; AP = Anátomo Patológico; RAP = Revisão Anátomo Patológico.

Entretanto, no grupamento dos Bethedas I observou-se, também revisão de lâmina do anátomo patológico benigno para Bócio multinodular de tireoide, assim confirmando o diagnóstico inicial para BMN.

TABELA 4 - Anátomo patológico Bethesda I.

Bethesda	Sexo	Idade	Repunção	Quantidade	Bethesda	Parcial	Total	Maligno	Benigno	Diagnóstico	Estadiamento	Imuno-histoquímica	Diagnóstico	citoqueratina 19	cromogranina	TTF-1	HBME-1	Ki-67	CK19	CD56	CD57	Galectina-3	Revisão RAP	Diagnóstico
BI	F	60	1	IV	Total			Benigno		BMN		0											0	
BI	F	40	1	I	Total			Benigno		AF		0											0	
BI	F	53	1	II	Parcial			Benigno		AF, micro, BMN		0											0	
BI	F	84	0		Parcial			Benigno		Paratireoide		0											0	
BI	F	67	3	I, I, II	Total			Benigno		BMN		0											0	
BI	F	28	2	I, I	Total			Maligno		CPVF, BMN, AF	pT1a pNx	2	CPT AF	+	-		+	+	+	+	+	1	Micro CPVFI	
BI	F	44	0		Parcial			Benigno		TH		0											0	
BI	F	54	0		Parcial			Benigno		BMN		0											0	
BI	F	54	1	I	Total			Benigno		TH		0											0	
BI	F	55	0		Total			Benigno		BMN		0										1	BMN	
BI	F	48	2	III, I	Total			Maligno		CPTVF	pT2 pN1a	0											0	
BI	F	70	1	V	Total			Benigno		BMN		1	NFO			+	-	+	+		+	0		

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; CPVF = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular; microCPVF = micro Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular; CPT = Carcinoma Papilífero de Tireoide; BMN = Bócio Multinodular; AF = Adenoma Folicular; TH = Tireoidite Hashimoto; Paratireoide; AP = Anátomo Patológico; RAP = Revisão Anátomo Patológico; TTF-1 = fator de transcrição da tireóide-1; HBME-1 = Anticorpo Monoclonal de Camundongo; Ki-67 = anticorpo monoclonal, *Ki-67 = < 1%; CK-19 = Citoqueratina 19; CD-56 = Células Natural Killer CD56; Células Natural Killer CD57.

Na tabela 4 temos as citopunções com desdobramento a remoção cirúrgica da tireoide, em sua totalidade ou parcialidade, notou-se que nessa classificação insatisfatória a poucos anátomos patológicos condizentes a malignidade.

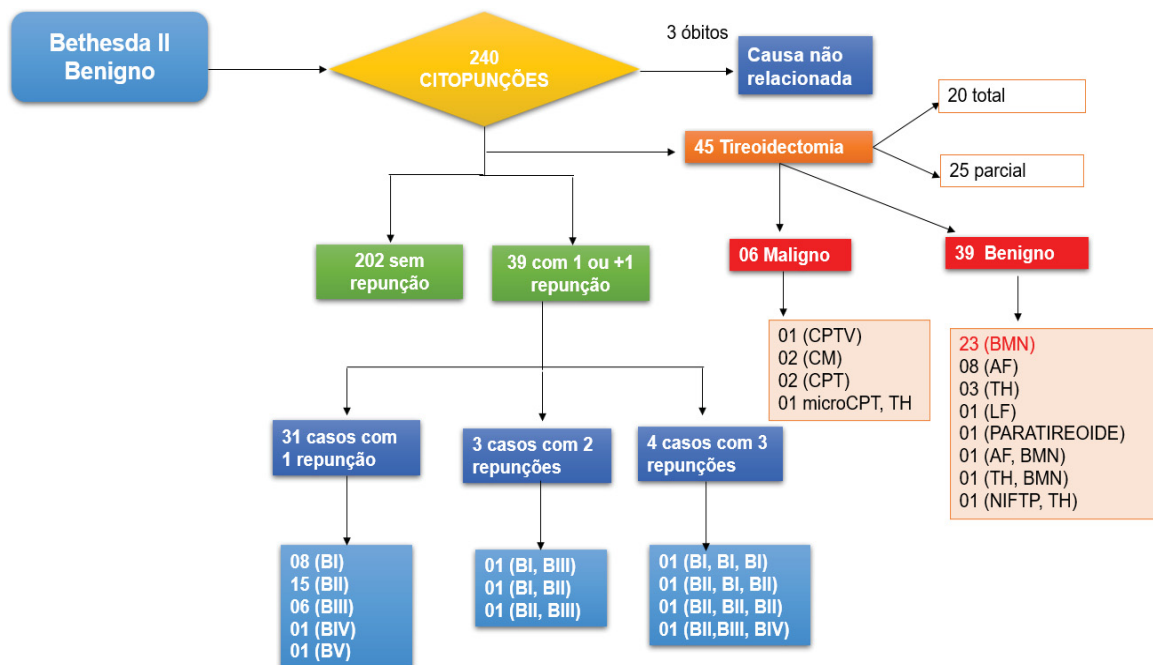
4.1.3 CLASSIFICAÇÃO BETHESDA II BENIGNO

As citopunções conforme o Laudo de Citopatologia da Classificação Bethesda II Benigno, das 449 punções aspirativas por agulha fina (PAAF), 240 foram classificadas Bethesda II, onde 202 sem repunção e 29 com uma ou mais repunções. Haja vista, que somente 45 casos realizaram a tireoidectomia, sendo 20 total e 25 parciais. No entanto, apenas 39 benignos e 6 (seis) malignos dos casos classificados Bethesda II (FIGURA 10).

Os nódulos de tireoide repuncionados apenas uma vez foram 31, sendo que 3 (três) casos continham mais de duas repunção e 4 (quatro) com mais de 3 (três)

punção aspirativa por agulha fina (PAAF). Importante salientar que os três óbitos mencionados no fluxograma (FIGURA 10), é de causa não relacionada.

FIGURA 10 - Fluxograma das citopunções Bethesda II.



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade; CPTV = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante; microCPT = micro Carcinoma Papilífero de Tireoide; CM = Carcinoma Medular; CPT = Carcinoma Papilífero de Tireoide; BMN = Bócio Multinodular; AF = Adenoma Folicular; TH = Tireoidite Hashimoto; Paratireoide; NIFTP = neoplasia de tireoide folicular não invasiva com aspectos nucleares de semelhança papilífera.

TABELA 5 - Anátomo patológico sem imuno-histoquímica.

Bethesda	Sexo	Idade	Repunção (Quantidade)	Bethesda	Revisão de Lamina	Diagnóstico	Parcial Total	Maligno Benigno	Diagnóstico (AP)
II	F	52	0		0		Parcial	Benigno	BMN
II	F	14	3	II, III, IV	0		Total	Benigno	TH
II	F	56	0		0		Parcial	Benigno	BMN; TH
II	F	33	1	IV	0		Total	Benigno	AF
II	F	55	0		0		Total	Benigno	BMN
II	F	64	0		0		Parcial	Benigno	BMN
II	F	52	0		0		Total	Benigno	BMN
II	F	59	0		0		Total	Benigno	BMN
II	F	61	0		0		Parcial	Benigno	AF
II	F	61	0		0		Parcial	Benigno	BMN
II	F	73	0		0		Parcial	Benigno	BMN
II	F	71	1	II	0		Total	Benigno	BMN
II	F	56	0		0		Parcial	Benigno	BMN
II	F	49	1	II	0		Parcial	Benigno	BMN
II	F	52	0		0		Parcial	Benigno	BMN
II	F	58	0		0		Parcial	Benigno	AF; BMN
II	F	41	0		0		Total	Benigno	BMN
II	F	36	0		0		Total	Benigno	BMN
II	F	24	0		0		Parcial	Benigno	AF
II	F	22	0		0		Parcial	Benigno	NIFTP; TH
II	F	54	1	V	0		Total	Benigno	AF
II	F	48	0		0		Parcial	Benigno	BMN
II	F	48	0		0		Parcial	Benigno	AF
II	F	64	0		0		Total	Benigno	BMN
II	F	66	0		0		Parcial	Benigno	Paratireoide
II	F	47	1	II	0		Parcial	Benigno	BMN
II	F	48	0		0		Parcial	Benigno	BMN
II	F	62	0		0		Parcial	Benigno	LF
II	F	19	0		0		Parcial	Benigno	BMN
II	F	33	0		0		Total	Benigno	BMN
II	F	33	0		0		Parcial	Benigno	AF
II	F	61	0		0		Total	Benigno	TH
II	F	62	0		0		Total	Benigno	AF
II	F	53	0		0		Parcial	Benigno	AF
II	F	61	0		0		Total	Benigno	BMN
II	M	46	0		0		Total	Benigno	TH
II	M	59	2	III, II	1	II	Parcial	Benigno	BMN
II	M	39	0		0		Parcial	Benigno	BMN
II	M	69	0		0		Parcial	Benigno	BMN

1 Revisão de lamina citopunção

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BMN = Bócio Multinodular; AF = Adenoma Folicular; TH = Tireoidite Hashimoto; Paratireoide; NIFTP = neoplasia de tireoide folicular não invasiva com aspectos nucleares de semelhança papilífera; AP = Anátomo Patológico.

Dentro desse grupamento há um caso de revisão de lâmina da citopunção condizente com Bethesda II, onde o anátomo patológico resultante a bócio multinodular de tireoide. Dos 45 tecidos tireoianos tireoidectomizados, 39 não precisaram do exame de imuno-histoquímica (TABELA 5).

Entretanto, a cabe salientar da importância do diagnóstico do anátomo patológico, quando uma paciente tem uma citopunção benigno e uma repunção, como pudemos ver no presente estudo, três casos de nódulos com diagnóstico da repunção classificado para Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN) e Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN), o anátomo teve como resultado: Tireoidite de Hashimoto e Adenoma Folicular respectivamente.

No estudo de Grant e cols (1989), estimaram que 98% das biópsias benignas serão verdadeiramente benignas e 2% falso negativo conforme a experiência dos citopatologistas e ultrassom não suspeito (GRANT *et al.*, 1989).

Como destaca-se os casos sem repunção mas conforme a indicação clínica e todo o contexto do histórico do paciente, a cirurgia foi a melhor opção no momento e na maioria dos casos vieram benignos seja para Bócio multinodular, Paratireoide, Adenoma Folicular, Tireoidite de Hashimoto (TABELA 5).

Porém, nem todos os casos cujos nódulos de tireoide repuncionados tiveram o anátomo patológico concorde para benigno, mas sim concordante para Carcinoma Medular, Carcinoma Papilífero de Tireoide e micro Carcinoma Papilífero de Tireoide (TABELA 6). Dentre os nódulos classificados Bethesda II um anátomo patológico proveniente da tireoidectomia parcial concorde para bócio multinodular cujo resultado da imuno-histoquímica acorde para Carcinoma Medular, confirmado pela revisão do anátomo respectivamente (QUADRO 12).

TABELA 6 - Anátomo patológico maligno Bethesda II.

Bethesda	Sexo	Idade	Bethesda (Repunção)	Parcial Total	Maligno Benigno	Diagnóstico (AP)	Estadiamento
II	F	33	II, I, II	Parcial	Maligno	CM	pT1b pNx
II	F	49		Total	Maligno	CPT	
II	F	57		Total	Maligno	CPT	
II	F	72		Total	Maligno	CPTV	pT1a pNx pMx
II	M	66		Total	Maligno	microCPT, TH	
II	M	36		Total	Maligno	CM	

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS/SFN); CM = Carcinoma Medular; CPTV = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante; microCPT = micro Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante; CPT = Carcinoma Papilífero de Tireoide; TH = Tireoidite Hashimoto; AP = Anátomo Patológico.

QUADRO 12 - Revisão de anátomo patológico com imuno-histoquímica.

Bethesda	Sexo	Idade	Repunção (quantidade)	Bethesda (Repunção)	Revisão de lamina	Diagnóstico	Total	Parcial	Maligno	Benigno	Diagnóstico	Imuno-histoquímica	Diagnóstico	Estadiamento	Revisão de RAP	Diagnóstico
II	M	59	2	III, II	1	II	Parcial		Benigno		BMN	1	CM	pT1a pNx	1	CM

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS/SFN); CM = Carcinoma Medular; BMN = Bócio multinodular; AP = Anátomo Patológico; RAP = Revisão Anátomo Patológico;

QUADRO 13 - Anátomo patológico com imuno-histoquímica.

Bethesda	Sexo	Idade	Repunção Quantidade	Bethesda Repunção	Revisão de lamina	Diagnóstico	Parcial Total	Maligno Benigno	Diagnóstico	Estadiamento	Imuno-histoquímica	Diagnóstico	Estadiamento	Citoqueratina 7	Citoqueratina 19	Citoqueratina 20	Calcitonina	Cromogranina	S100	Treoglobulstmona	Synaptofisina	TTF-1	CEA	KI-67
II	M	59	2	III, II	1	II	Parcial	Benigno	BMN		1	CM	pT1a pNx											
II	F	56	0		0		Parcial	Benigno	BMN		1													
II	M	59	2	III, II	1	II	Parcial	Benigno	BMN		1	CM	pT1a pNx											
II	F	72	0		0		Total	Maligno	CPTV	pT1a pNx pMx	1	AFO		+	-	+	+	+	-					
II	M	36	0		0		Total	Maligno	CM		1	CM		+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); CM = Carcinoma Medular; CPTV = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante; microCPT = micro Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante; BMN = Bócio multinodular; AFO = Adenoma Folicular Oxifílico; AP = Anátomo Patológico; RAP = Revisão Anátomo Patológico; TTF-1 = fator de transcrição da tireóide-1; S100 = S100 calcium binding protein; CEA = Antígeno Carcinoembriônico; Ki-67 = anticorpo monoclonal, *Ki-67 = < 1%.

Além disso, os anátomos patológicos com imuno-histoquímica foram 5 (cinco), sendo 2 (dois) com dados da Imuno-histoquímica e os outros 2 (dois) sem dados da Imuno-histoquímica, estes foram realizados em serviço externo (QUADRO 13). É interessante notarmos que os nódulos de tireoide repunçionados a concorde para Benigno e Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN) com indicativa para remoção cirúrgica, tiverem o resultado do anátomo patológico para Bócio multinodular de tireoide, todavia, seus resultados da imuno-histoquímica condizentes para Carcinoma Medular, em contraste com o último caso descrito no Quadro 13, que não teve histórico de repunção do nódulo tireoidiano mas o resultado da tireoidectomia total foi para Carcinoma Medular.

A importância do seguimento clínico e do conjunto dos exames que contemplam a ultrassonografia e citologia, fornecem informações relevantes conforme os Guidelines para a melhorar conduta médica a ser tomada. Desde 2009 as diretrizes da American Thyroid Association (ATA) têm dado direcionamento a respeito do manejo dos nódulos de tireoide, tanto em relação ao seguimento clínico,

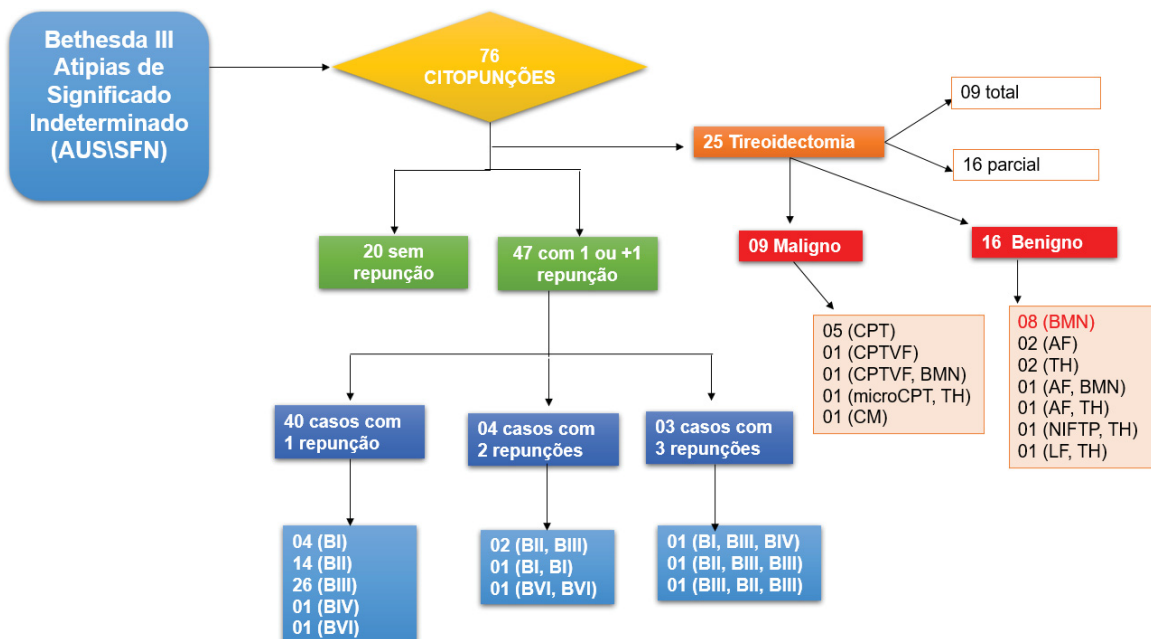
ultrassonográfico, a punção aspirativa por agulha fina (PAAF), e sobre o uso de teste moleculares. São recomendações de conduta clínica frente ao câncer de tireoide como o rastreamento, estadiamento, procedimento cirúrgico, avaliação de risco, ablação e dentre outras questões clínicas que estão descritas no recente na ATA Guidelines de 2015 (HUGEN *et al.*, 2015).

4.1.4 BETHESDA III ATIPIA DE SIGNIFICADO INDETERMINADO OU LESÃO FOLICULAR DE SIGNIFICADO INDETERMINADO (AUS\SFN)

As citopunções conforme o Laudo de Citopatologia da Classificação Bethesda de Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN), das 449 punções aspirativas por agulha fina (PAAF), foram 76 classificadas Bethesda III, onde 20 sem repunção e 47 com uma ou mais repunções. Dentre os casos que foram submetidos a tireoidectomia, sendo 9 total e 16 parcial. No entanto, apenas 16 benignos e 9 (nove) malignos dos casos classificados Bethesda III (FIGURA 11).

Os nódulos de tireoide repuncionados apenas uma vez foram 40, aqueles que continham duas repunções eram 4 (quatro) casos e com três citopunções 3 (três) casos.

FIGURA 11 - Fluxograma das citopunções Bethesda III.



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade; CPT = Carcinoma Papilífero de Tireoide; CPTVF = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular; ; microCPT = micro Carcinoma Papilífero de Tireoide; BMN = Bócio Multinodular; AF = Adenoma Folicular; TH = Tireoidite Hashimoto; NIFTP = neoplasia de tireoide folicular não invasiva com aspectos nucleares de semelhança papilífera.

O resultado do anátomo patológico Bethesda III atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN), 16 condizentes a benigno, embora acha casos que apresentaram três repunções indeterminada o anátomo cordato ao quando de bócio multinodular (TABELA 7).

TABELA 7 - Anátomo patológico benigno Bethesda III.

Bethesda	Sexo	Idade	Repunção quantidade	Bethesda	Parcial Total	Maligno Benigno	Diagnóstico AP	Estadiamento
BIII	F	51	1	III	Parcial	Benigno	NIFTP, TH	pT3
BIII	F	32	0		Total	Benigno	TH	
BIII	F	25	0		Parcial	Benigno	TH	
BIII	F	25	0		Parcial	Benigno	LF, TH	
BIII	F	59	0		Total	Benigno	BMN	
BIII	F	50	1	III	Total	Benigno	BMN	
BIII	F	49	1	III	Parcial	Benigno	BMN	
BIII	F	52	0		Parcial	Benigno	BMN	
BIII	F	66	3	III, II, III	Parcial	Benigno	BMN	
BIII	F	67	1	III	Parcial	Benigno	BMN	
BIII	F	61	2	III, II	Parcial	Benigno	BMN	
BIII	F	64	3	III, III, III	Parcial	Benigno	BMN	
BIII	F	73	0		Total	Benigno	AF, BMN	
BIII	F	65	0		Parcial	Benigno	AF	
BIII	F	58	1	III	Parcial	Benigno	AF	
BIII	M	51	0		Total	Benigno	AF, TH	

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS/SFN); NIFTP = neoplasia de tireoide folicular não invasiva com aspectos nucleares de semelhança papilífera; TH = Tireoidite Hashimoto; BMN = Bócio multinodular; AF = Adenoma Folicular; AP = Anátomo Patológico; Pt3 = Estadiamento patológico.

Foi observado que dentre os casos com anátomo patológicos consentâneo benigno, os nódulos repuncionados com diagnóstico Bethesda III tiveram o resultado anátomo patológico em sua maioria para bócio multinodular, na sequência adenoma folicular e tireoidite de Hashimoto (TABELA 7).

Carcinoma Medular (TABELA 8) observado, trata-se de um caso do ano de 2014, e partir de então tem dado seguimento clínico, o diagnóstico da imuno-histoquímica metástases linfonodais de carcinoma medular de tireoide.

TABELA 8 - Anátomo patológico maligno Bethesda III.

Bethesda	Sexo	Idade	Repunção quantidade	Bethesda	Parcial Total	Maligno Maligno	Diagnóstico AP	Estadiamento
BIII	F	20	1	III	Parcial	Maligno	micro Carcinoma papilífero, TH	pT1a pNx pMx
BIII	F	76	0		Parcial	Maligno	CPTVF, BMN	pT3 pNx pMx
BIII	F	48	1	II	Total	Maligno	CPTF	pT1B pTNM pNx pMx
BIII	F	32	0		Parcial	Maligno	CPT	pT1 pNx pMx
BIII	F	58	1	III	Total	Maligno	CPT	pT1 pNx pMx
BIII	F	66	0		Total	Maligno	CPT	
BIII	M	65	2	VI, VI	Total	Maligno	CPT	pT3a pNo
BIII	M	68	0		Parcial	Maligno	CPT	
BIII	M	55	0		Parcial	Maligno	CM	T3 N0 M0

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS/SFN); BVI = Malignidade; CPT = Carcinoma Papilífero de Tireoide; CPTVF = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular; microCPT = micro Carcinoma Papilífero de Tireoide; BMN = Bócio Multinodular; TH = Tireoidite Hashimoto.

Dentre o grupamento Bethesda III dos 5 (cinco) dos anátomos patológicos com imuno-histoquímica foram observados em 4 (quatro) casos, sendo 3 (três) compatíveis para Carcinoma Papilífero de Tireoide (CPT), 1 (hum) caso de Carcinoma Folicular de Tireoide (CFT) e 1 (hum) caso Carcinoma Medular (QUADRO 4). É interessante notarmos, dentre este grupamento, 1 (hum) caso com imuno-histoquímica para CPT tinha um histórico do anátomo patológico compatível a Tireoidite de Hashimoto (TH) (QUADRO 4).

QUADRO 14 - Anátomo patológico com imuno-histoquímica Bethesda III.

Bethesda	Sexo	Idade	Repunção quantidade	Bethesda repunção	Parcial Total	Maligno Maligno	Diagnóstico AP	Estadiamento	Diagnóstico Imuno-histoquímica	Citoqueratina 7	Citoqueratina 19	Calcitonina	Cromogranina	S100	Synaptofisina	TTF-1	CEA	PAN-citoqueratina	C-ERB-2	HBME-1	Ki-67	CK19	CD56	Galectina-3
BIII	F	32	0		Total	Benigno	TH	pT3	CPT	+	+									**			+	+
BIII	F	48	1	II	Total	Maligno	CPTVF		CPT											+	+	+		
BIII	F	58	1	III	Total	Maligno	CPT	pT1 pNx pMx	CPT, AF	+	+							+	-					
BIII	M	68	0		Parcial	Maligno	CPT		CFT											-		+	+	+
BIII	M	55	0		Parcial	Maligno	CM	T3 N0 M0	CM			+	+	+	+	+	+							

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); CM = Carcinoma Medular; CPTVF = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular; CFT = Carcinoma Folicular de Tireoide; AF = Adenoma Folicular; AP = Anátomo Patológico; TTF-1 = fator de transcrição da tireóide-1; S100 = S100 calcium binding protein; CEA = Antígeno Carcinoembriônico; Ki-67 = anticorpo monoclonal; C-ERB-2 = HER2/neu (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*); HBME-1 = *Hector Battifora Mesothelial Cell*; CK19 = Citoqueratina-19; CD 56 = Células Natural Killer CD56; ** HBME-1 = indispensável.

O caso de revisão de lâmina do anátomo patológico com imuno-histoquímica onde pudemos notar que HBME (-), CK19, Galectina 3 e C D56 (+) (QUADRO 15).

QUADRO 15 - Revisão de anátomo patológico com imuno-histoquímica.

Bethesda	Sexo	Idade	Parcial Total	Maligno Benigno	Diagnóstico AP	Diagnóstico IH	HBME-1	CK19	CD56	Galectina-3	Revisão de AP	Diagnóstico (RAP)
BIII	M	68	Parcial	Maligno	CPT	CFT	-	+	+	+	1	CFT

FONTE: Os autores (2022).

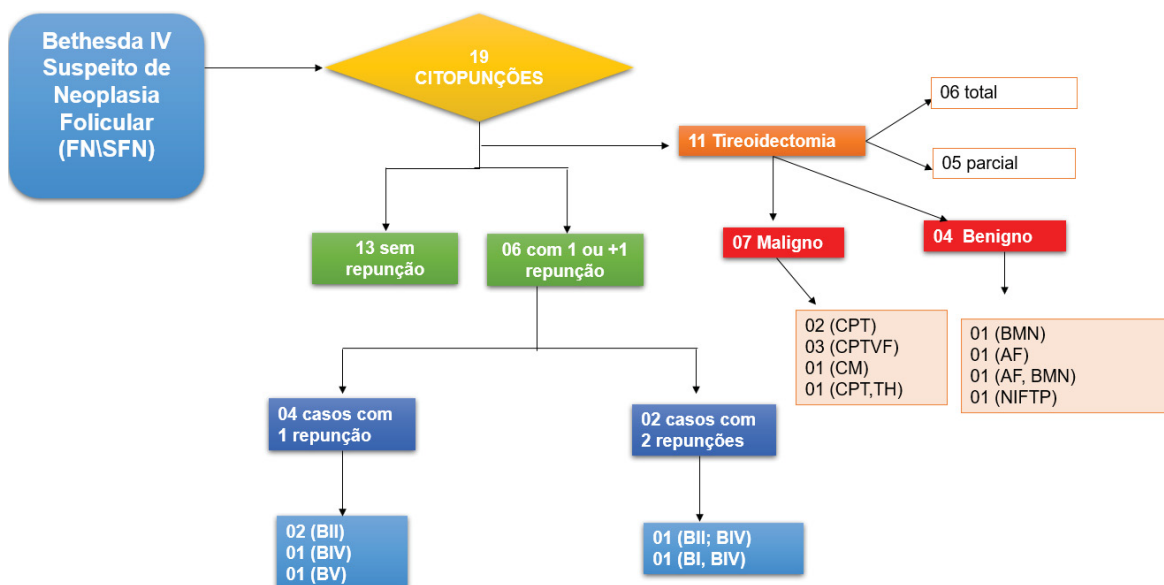
LEGENDA: BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); CPT = Carcinoma Papilífero de Tireoide; AP = Anátomo Patológico; HBME-1 = *Hector Battifora Mesothelial Cell*; CK19 = Citoqueratina-19; CD 56 = Células Natural Killer CD56.

4.1.5 BETHESDA IV NEOPLASIA FOLICULAR OU SUSPEITO PARA UMA NEOPLASIA FOLICULAR (FN\SFN)

As citopunções conforme o Laudo de Citopatologia da Classificação Bethesda de Neoplasia Folicular ou Suspeito para uma Neoplasia Folicular (FN\SFN), das 449 punções aspirativas por agulha fina (PAAF), foram 19 classificadas Bethesda IV, onde 13 sem repunção e 6 (seis) com uma ou mais repunções. Dentre os casos que foram submetidos a tireoidectomia, sendo 6 (seis) total e 5 (cinco) parcial, apenas 4 (quatro) benignos e 7 (sete) malignos dos casos classificados Bethesda IV (FIGURA 12).

Os nódulos de tireoide repunccionados apenas uma vez foram 4 (quatro), aqueles que continham duas repunções foram 2 (dois) casos (FIGURA 12).

FIGURA 12 - Fluxograma das citopunções Bethesda IV.



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade; CPT = Carcinoma Papilífero de Tireoide; CPTVF = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular; microCPT = micro Carcinoma Papilífero de Tireoide; BMN = Bócio Multinodular; AF = Adenoma Folicular; TH = Tireoidite Hashimoto; NIFTP = neoplasia de tireoide folicular não invasiva com aspectos nucleares de semelhança papilífera.

TABELA 9 - Citopunções da classificação Bethesda IV.

Bethesda	Sexo	Idade	Repunção Quantidade	Bethesda	Tireoidectomia	Parcial Total	Maligno Benigno	Diagnóstico AP	Estadiamento	Imuno- histoquímica
IV	F	56	2	I, IV	0					0
IV	F	54	1	II	0					0
IV	F	82	1	I,II	1	Total	Benigno	AF, BMN		0
IV	F	75	1	II	0					0
IV	F	51	1	IV	1	Parcial	Maligno	CPT	pT1a pN0a	0
IV	F	54	1	V	1	Total	Maligno	CM	PT2 pN0	0
IV	F	42	0		0					0
IV	F	19	0		1	Total	Maligno	CPTVF	pT3a	1
IV	F	55	0		1	Parcial	Maligno	CPTVF	pT1a pNx pMx	0
IV	F	62	0		0					0
IV	M	79	0		1	Total	Maligno	CPT	pT2,pNX, pMx	1
IV	F	43	0		0					0
IV	F	69	0		1	Parcial	Benigno	AF		0
IV	F	36	0		1	Total	Maligno	CPTVF	pT3 pNx	0
IV	F	27	0		1	Parcial	Benigno	BMN		0
IV	F	69	0		1	Parcial	Maligno	CPT, TH	pT1a, pNx, pMx	1
IV	F	73	0		1	Total	Benigno	NIFTP		1
IV	F	78	0		0					0
IV	F	65	0		0					0

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; CPT = Carcinoma Papilífero de Tireoide; CPTVF = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular; CM = Carcinoma Medular; BMN = Bócio Multinodular; AF = Adenoma Folicular; TH = Tireoidite Hashimoto; NIFTP = neoplasia de tireoide folicular não invasiva com aspectos nucleares de semelhança papilífera.

As citopunções classificadas Bethesda IV de modo geral, foi observado alguns casos que não foram submetidos a tireoidectomia, independente se tem repunção ou não, contraste os que não tem repunção mas tiveram o desdobramento para tireoidectomia em sua maioria malignos (TABELA 9). Esses dados, revelam a frequência o aumento do risco de malignidade que a classe Bethesda IV apresenta. Não foi observado revisão de lâmina de citopunção dentre os casos Bethesda IV.

TABELA 10 - Anátomo patológico maligno e benigno Bethesda IV.

PAAF	Sexo	Idade	Repunção Quantidade	Bethesda	Parcial Total	Maligno Benigno	Diagnóstico AP	Estadiamento
BIV	F	19	0		Total	Maligno	CPTVF	pT3a
BIV	F	55	0		Parcial	Maligno	CPTVF	pT1a pNx pMx
BIV	M	79	0		Total	Maligno	CPT	pT2,pNX, pMx
BIV	F	36	0		Total	Maligno	CPTVF	pT3 pNx
BIV	F	69	0		Parcial	Maligno	CPT, TH	pT1a, pNx, pMx
BIV	F	51	1	IV	Parcial	Maligno	CPT	pT1a pN0a
BIV	F	54	1	V	Total	Maligno	CM	PT2 pN0
BIV	F	69	0		Parcial	Benigno	AF	
BIV	F	82	1	I,II	Total	Benigno	AF, BMN	
BIV	F	27	0		Parcial	Benigno	BMN	
BIV	F	73	0		Total	Benigno	NIFTP	

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; CPT = Carcinoma Papilífero de Tireoide; CPTVF = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular; CM = Carcinoma Medular; BMN = Bócio Multinodular; AF = Adenoma Folicular; TH = Tireoidite Hashimoto; NIFTP = neoplasia de tireoide folicular não invasiva com aspectos nucleares de semelhança papilífera.

Na tabela 10 nota-se que apenas 4 dos Bethesdas IV o diagnóstico do anátomo patológico foram benignos em contraste com os 7 malignos. Dentre os malignos destacam-se os casos de Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular, Carcinoma Papilífero de Tireoide, Carcinoma Medular, e neoplasia de tireoide folicular não invasiva com aspectos nucleares de semelhança papilífera. Além disso, nem todos havia repunção anterior, os três casos que descritos (TABELA 10), relewa que dentre os Bethesdas IV o risco do nódulo de ser maligno é relevante visto pelo anátomo e estadiamento do tumor.

QUADRO 16 - Anátomo patológico com imuno-histoquímica.

PAAF	Sexo	Idade	Repunção	Parcial	Total	Maligno	Benigno	Diagnóstico (AP)	Estadiamento	Diagnóstico Imuno-histoquímica	Citoqueratina 7	Cromogranina	Tireoglobulina	Synaptofisina	HBME-1	*Ki-67	CD56	CD57	Galectina-3	Revisão de RAP	Diagnóstico RAP
BIV	F	19	0	Total		Maligno		CPTVFI	pT3a	CPT	+				+	+		**	***	0	
BIV	M	79	0	Total		Maligno		CPT	pT2 pNx pMx	TTH		-	+	-						1	Tumor trabecular hialinizante
BIV	F	69	0	Parcial		Maligno		CPT, TH	pT1a pNx pMx	CPT							+		+	1	AF, TH
BIV	F	73	0	Total		Benigno		NIFTP		CPTVF CFVO										0	

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SN); CPT = Carcinoma Papilífero de Tireoide; CPTVF = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular; TH = Tireoidite Hashimoto; CPVFI = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular Incidental; NIFTP = neoplasia de tireoide folicular não invasiva com aspectos nucleares de semelhança papilífera; TTH = tumor trabecular hialinizante; CFVO = carcinoma folicular minimamente invasor variante oxifílica; AP = Anátomo Patológico; Ki-67 = anticorpo monoclonal; HBME-1 = *Hector Battifora Mesothelial Cell*; CD 56 = Células Natural Killer CD56; RAP = Revisão Anátomo Patológico, * Ki-67: 15%; CD 57 = Células Natural Killer CD57 (** indisponível); ***Galectina-3 = inconclusivo.

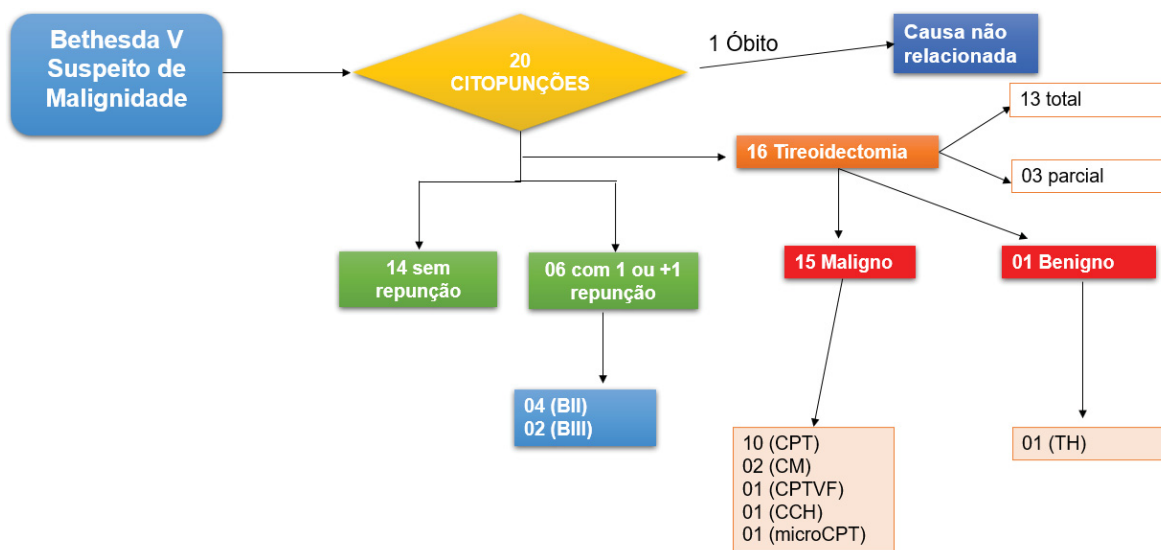
Os resultados de imuno-histoquímica, notou-se dentre os casos Bethesda IV, foi observado um caso com diagnóstico condizente para CPT, a revisão do anátomo patológico e a imuno-histoquímica com cromogranina A (-) sinaptofisina (-) e Tireoglobulina (+), para tumor trabecular hialinizante (QUADRO 16).

4.1.6 BETHESDA V SUSPEITO DE MALIGNIDADE

As citopunções conforme o Laudo de Citopatologia da Classificação Bethesda de Suspeito para Malignidade, das 449 punções aspirativas por agulha fina (PAAF), foram 20 classificadas Bethesda V, onde 14 sem repunção e 6 (seis) com uma ou mais repunções. Dentre os casos que foram submetidos a tireoidectomia, sendo 13 total e 3 (três) parcial, apenas 1 (hum) benignos e 15 malignos dos casos classificados Bethesda V (FIGURA 13).

Os nódulos de tireoide repuncionados apenas mais uma vez, 4 (quatro), eram Bethesda II e 2 (dois) Bethesda III. O óbito mencionado a causa não relacionada a citopunções de tireoide (FIGURA 13).

FIGURA 13 - Fluxograma das citopunções Bethesda V.



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); CPT = Carcinoma Papilífero de Tireoide; CPTVF = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular; microCPT = micro Carcinoma Papilífero de Tireoide; CCH = Carcinoma oncocítico de células de Hurthle; TH = Tireoidite Hashimoto.

Dentre as citopunções da classificação Bethesda V foi observado 2 casos com revisão de lâmina da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) com diagnóstico relevante, sendo o primeiro com Bethesda II anterior cujo resultado da revisão da PAAF um Adenoma Metastático e o anátomo concorde para Carcinoma

Papilífero de Tireoide Variante Folicular (CPTVF), já no segundo caso de revisão de lâmina o diagnóstico foi Carcinoma Papilífero de Tireoide (CPT), não houve relato de repunção anterior somente a punção Bethesda V. Além disso, apenas dois casos de nódulos repunçoados com citologia Bethesda III resultantes do anátomo para CPT. Não foi observado revisão de anátomo patológico dentre este grupamento (TABELA 11). Dos 16 nódulos tireoidectomizados apenas 4 (quatro) nódulos com citologia Bethesda II anterior, 1 (hum) com anátomo benigno para Tireoidite de Hashimoto (TH) e os demais para Carcinoma Papilífero de Tireoide (CPT) (TABELA 11).

TABELA 11 - Citopunções Bethesda IV.

Bethesda	Sexo	Idade	Repunção Quantidade	Bethesda	Revisão de lamina	Diagnóstico	Tireoidectomia	Parcial Total	Maligno Benigno	Diagnóstico AP	Estadiamento
BV	M	63	0		0		1	Total	Maligno	CCH	pT3a pNx
BV	F	40	0		0		1	Total	Maligno	CPT	pT2
BV	M	48	1	II	0		1	Total	Benigno	TH	
BV	F	47	0		0		1	Total	Maligno	CPT	
BV	F	34	1	III	0		1	Parcial	Maligno	CPT	pT2pNx
BV	F	35	0		0		1	Total	Maligno	CPT	pT1b(m)pN0
BV	M	56	0		0		1	Parcial	Maligno	CPT	
BV	F	49	0		0		1	Total	Maligno	CPTVF	pT(m)3a pNx pMx
BV	F	75	0		0		1	Parcial	Maligno	CM	pT4a pN1b pMx
BV	F	32	0		0		0				
BV	F	77	0		0		0				
BV	F	34	1	II	1	*AM	1	Total	Maligno	CPTVF	pT2 pN1 pMx
BV	F	26	0		0		0				
BV	F	57	1	III	0		1	Total	Maligno	CPT	
BV	F	60	1	II	0		1	Total	Maligno	CPT	pT1b
BV	F	64	0		0		1	Total	Maligno	CM	
BV	F	16	0		1	CPT, pT3a pN1b	1	Total	Maligno	CPT	pT2 pN1a
BV	F	57	0		0		1	Total	Maligno	CPT	pT3 pNx
BV	F	53	1	II	0		0				
BV	F	42	0		0		1	Total	Maligno	CPT	pmT2 pNx

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS/SFN); BV = Suspeito para malignidade; CCH = Carcinoma oncócito de células de Hurthle; CPT = Carcinoma Papilífero de Tireoide; TH = Tireoidite Hashimoto; CPTVF = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular; CM = Carcinoma Medular; *AM = Adenoma Metastático.

QUADRO 17 - Anátomo patológico com imuno-histoquímica Bethesda V.

Bethesda	Sexo	Idade	Repunção	Bethesda	Revisão	Citopunção	Diagnóstico	Parcial	Total	Maligno	Benigno	Diagnóstico AP	Estadiamento	Diagnóstico Imuno-histoquímica	Citoqueratina 7	Citoqueratina 19	Citoqueratina 20	Calcitonina	Cromogranina	Synaptofisina	TTF-1	CEA	PAN-citoqueratina	HBME-1	*Ki-67	CD56	Galectina-3
BV	F	40	0		0		Total		Maligno			CPT	pT2	CPT	+									+	+		+
BV	F	34	1	II	1	AM	Total		Maligno			Micro CPTVF	pT2 pN1 pMx	CPT													+
BV	F	64	0		0		Total		Maligno			CM	CM, AF	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+			

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BII = Benigno; BV = Suspeito para malignidade; AM = Adenoma Metastático; CPT = Carcinoma Papilífero de Tireoide; CPTVF = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular; MicroCPTVF = Microcarcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular TH = Tireoidite Hashimoto; AP = Anátomo Patológico; TTF-1 = fator de transcrição da tireoide-1; HBME-1 = *Hector Battifora Mesothelial Cell*; CEA = Antígeno Carcinoembriônico; Ki-67 = anticorpo monoclonal; *Ki-67 = menor eu 2%; CD 56 = Células Natural Killer CD56.

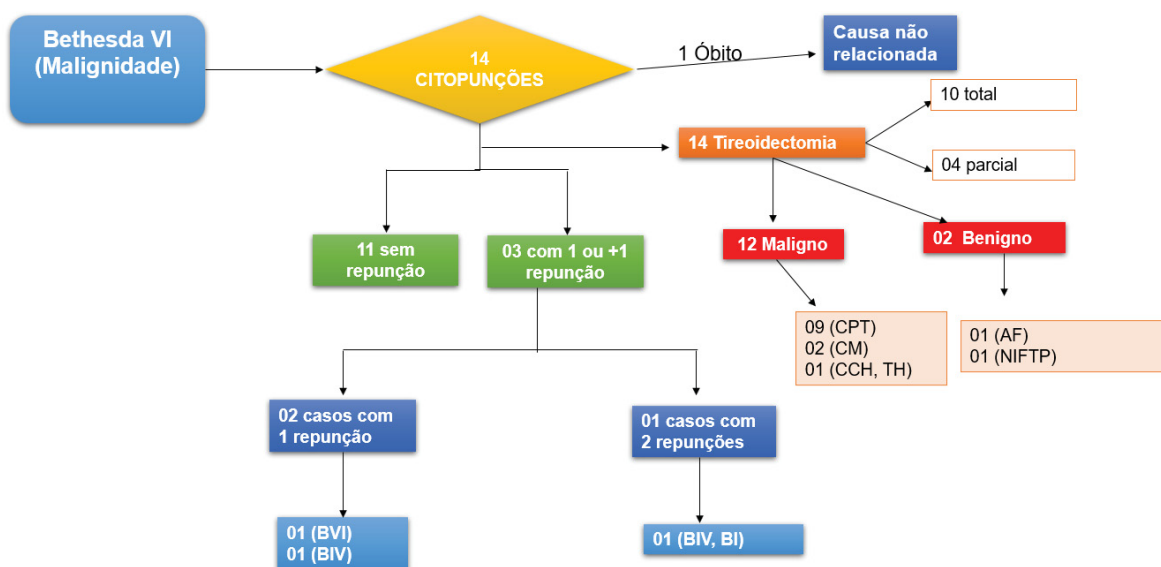
É interessante salientar que as biópsias de tireoide classificadas Bethesda V apenas quatro até o momento não foram tireoidectomizadas (TABELA 11). Em suma cabe notarmos que os três casos com imuno-histoquímica, sendo duas concorde para CPT com diagnóstico anterior compatível para Adenoma Metastático e MicroCPTVF, foi observado (+) focal para o marcador CD56. Já o CPT sem repunção anterior HBME-1 (+) multifocal, Galectina-3 (+) focal, citoqueratina 19 (+) focal e Ki-67 foi menor de 2% (QUADRO 17).

4.1.7 BETHESDA VI (MALIGNIDADE)

As citopunções conforme o Laudo de Citopatologia da Classificação Bethesda de Suspeito para Malignidade, das 449 punções aspirativas por agulha fina (PAAF), foram 14 classificadas Bethesda VI, onde 11 sem repunção e 3 (três) com uma ou mais repunções. Dentre os casos que foram submetidos a tireoidectomia, sendo 10 total e 4 (quatro) parcial, apenas 2 (dois) benignos e 12 malignos dos casos classificados Bethesda VI (FIGURA 14).

Os nódulos de tireoide repuncionados apenas mais uma vez, 2 (dois) Bethesda VI e Bethesda IV, e 1 (hum) caso com duas repunções de Bethesda IV e Bethesda I. O óbito mencionado a causa não relacionada a citopunções de tireoide (FIGURA 14).

Figura 14 - Fluxograma das citopunções Bethesda VI.



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade; CPT = Carcinoma Papilífero de Tireoide; CPTVF = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular; microCPT = micro Carcinoma Papilífero de Tireoide; BMN = Bócio Multinodular; AF = Adenoma Folicular; TH = Tireoidite Hashimoto; NIFTP = neoplasia de tireoide folicular não invasiva com aspectos nucleares de semelhança papilífera.

No presente estudo foi observado que dois casos compatíveis a NIFTP e AF não haviam citologia anterior de tireoide, em contraste dos 12 malignos 9 (nove) foram concorde com Carcinoma Papilífero de tireoide, sendo 1 (hum) Carcinoma Medular Metastático, cabe ressaltar houve caso de carcinoma folicular invasor variante oncocítica (células de Hurthle), cuja a lesão folicular associada à tireoidite linfocítica e microcarcinoma papilar tireoidiano com 1mm, distando 2mm da margem de ressecção (TABELA 12).

TABELA 12 - Citopunções Bethesda VI.

Bethesda	Sexo	Idade	Repunção Quantidade	Bethesda	Parcial Total	Maligno Benigno	Diagnóstico AP	Estadiamento
BVI	F	26	0		Parcial	Benigno	NIFTP	pT1b
BVI	F	83	0		Total	Benigno	AF	
BVI	F	37	2	VI, I	Total	Maligno	CM metastático	pT1b Pn1 pMx
BVI	F	78	1	VI	Parcial	Maligno	CPT	pT3b (M) pN1a
BVI	F	54	1	IV	Total	Maligno	CPT	pT3 pN1b
BVI	F	53	0		Total	Maligno	CPT	pT3a(m)
BVI	M	57	0		Total	Maligno	CPT	
BVI	M	65	0		Parcial	Maligno	CCH,TH, microCPT	pt1b
BVI	F	58	0		Total	Maligno	CPT	
BVI	F	37	0		Total	Maligno	CPT	
BVI	F	45	0		Total	Maligno	CPT	pT1a Pn1 pMx
BVI	F	53	0		Parcial	Maligno	CPT	pTNM pT1a pNx
BVI	F	51	0		Total	Maligno	CPT	pT4a pN16
CM	M	57	0		Total	Maligno	CM	

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BVI = Malignidade; CPT = Carcinoma Papilífero de Tireoide; CPTVF = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular; CM = Carcinoma Medular; AF = Adenoma Folicular; TH = Tireoidite Hashimoto; NIFTP = neoplasia de tireoide folicular não invasiva com aspectos nucleares de semelhança papilífera.

Dos anátomos patológicos que tiveram a imuno-histoquímica sem repunção anterior, em contraste com o Carcinoma Medular que Calcitonina (+), Cromogranina (+), Sinaptofisina (+), TTF-1 (-), Citoqueratina 19 (-), ao contrário do Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular (CPTVF) com anátomo compatível a Neoplasia de Tireoide Folicular não Invasiva com Aspectos Nucleares de semelhança Papilífera (NIFTP) apresentou positividade dos marcadores citoqueratina 19 e HBME-1. Interessante notarmos que a citoqueratina 19 um marcador de diferenciação e replicação celular positivo nos dois casos de CPTVF (QUADRO 18).

QUADRO 18 - Anátomo patológico com imuno-histoquímica Bethesda VI.

Bethesda	Sexo	Idade	Repunção	Quantidade	Bethesda	Parcial	Maligno	Diagnóstico (AP)	Estadiamento	Diagnóstico	Imuno-histoquímica	citoqueratina 7	citoqueratina 19	Calcitonina	cromogranina	S100	synaptofisina	TTF-1	HBME-1	**Ki-67	Galectina-3	
BVI	F	26	0		Parcial	Benigno	NIFTP	pT1b		CPTVF		+								+		
BVI	F	37	2	VI, I	Total	Maligno	*CM	pT1b pN1 pMx		CM		-	+	+			+	-				
BVI	F	53	0		Parcial	Maligno	CPT	pTNm pT1a pNx		CPTVF		+	+			+				***	+	+

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BVI = Malignidade; NIFTP = Neoplasia de Tireoide Folicular não Invasiva com Aspectos Nucleares de semelhança Papilífera; CM = Carcinoma Medular; CPT = Carcinoma Papilífero de Tireoide; CPTVF = Carcinoma Papilífero de Tireoide Variante Folicular; AF = Adenoma Folicular; AP = Anatomopatológico; TTF-1 = fator de transcrição da tireoide-1; S100 = S100 calcium binding protein; Ki-67 = anticorpo monoclonal; HBME-1 = *Hector Battifora Mesothelial Cell*; *CM = Carcinoma Medular com Metástase; **Ki-67 = 5%; HBME-1 = *** indisponível.

QUADRO 19 - REVISÃO DE ANÁTOMO PATOLÓGICO BETHESDA VI.

Bethesda	Sexo	Idade	Bethesda	Tireoidectomia	Parcial	Maligno	Diagnóstico	Revisão de AP	Diagnóstico
					Total	Benigno		AP	RAP
BVI	F	83	VI	1	Total	Benigno	AF	1	AF, BMN

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA:

BVI = Malignidade; AF = Adenoma Folicular; AP = Anátomo Patológico; RAP = Revisão de Anátomo Patológico.

Dentre os Bethesdas VI foi observado um caso de revisão de anátomo patológico compatível para Adenoma Folicular e Bócio multinodular de tireoide (QUADRO 19). Em suma, nem todos os nódulos biopsiados e classificados Bethesda VI vão evoluir para malignidade, não é a maioria, mas existem casos bem fogem da regra propriamente dita.

4.2 ANÁLISE DESCRITIVA DAS CITOPUNÇÕES

No que se refere ao Sistema Bethesda para Laudos Citopatológicos de Tireoide que classifica os nódulos de tireoide submetidos à PAAF os dados constataam a predominância do tipo Bethesda II (benigno), conforme distribuição apresentada na Tabela 13:

TABELA 13 - - Frequência do Bethesda por sexo.

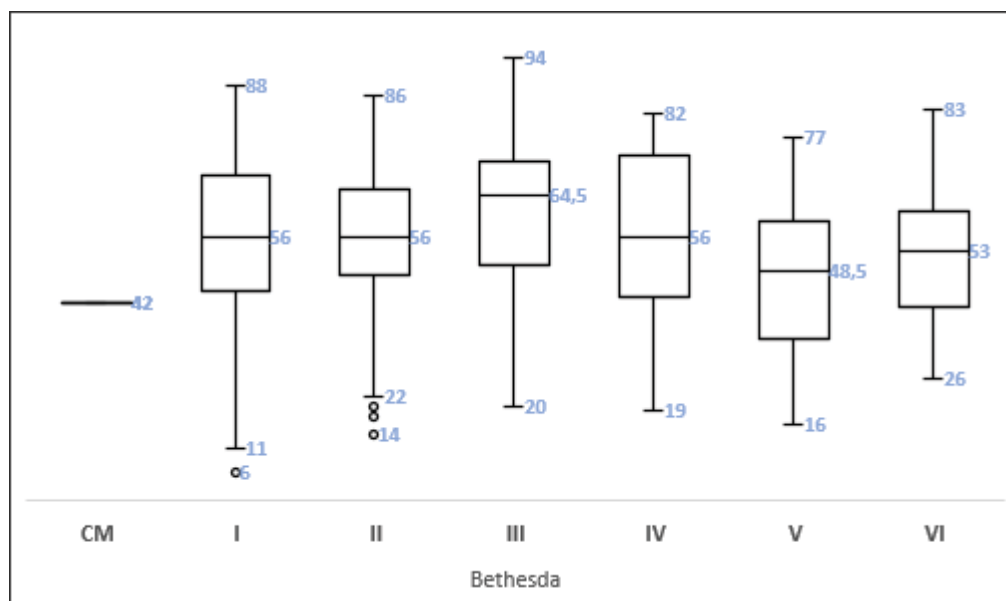
Variáveis	CM		I		II		III		IV		V		VI		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Sexo																
Feminino		0	69	86,25	216	90	65	85,53	18	94,74	17	85	11	84,62	396	88,20
Masculino	1	100	11	13,75	24	10	11	14,47	1	5,26	3	15	2	15,38	53	11,80
Total	1		80		240		76		19		20		13		449	

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório Benigno (BII); BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade.

O gráfico 3 apresenta os dados da classificação Bethesda por idades:

GRÁFICO 3 - Box plot das idades por Bethesda.



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA:

BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade, CM = Carcinoma Medular.

Utilizando-se o teste de Qui-quadrado, os resultados ($X^2 = 19,182$, graus de liberdade = 14, p-valor = 0,1581) indicam pela inexistência de diferença entre os dados de Bethesda para o sexo masculino e feminino.

TABELA 14 - Frequência de pacientes com repunção por Bethesda.

Repunção	CM		I		II		III		IV		V		VI		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	1	100	34	42,50	202	84,17	29	38,16	12	63,16	14	70	9	75	302	67,26
sim	0	0	46	57,50	38	15,83	47	61,84	7	36,84	6	30	3	25	147	32,74
Total	1		80		240		76		19		20		12		449	

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório Benigno (BII); BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade, CM = Carcinoma Medular.

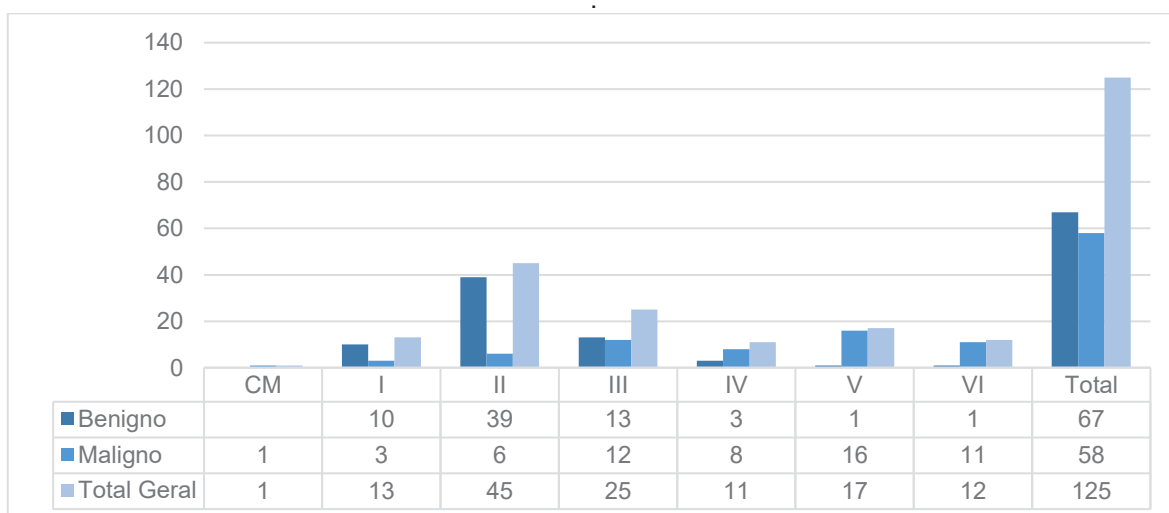
A prevalência de pacientes sem repunção foi predominante no tipo II. A tabela 5 apresenta o quantitativo de pacientes com tireoidectomia por tipo de tumor (TABELA 14).

Em relação ao número de óbitos, constata-se que 1,12% dos pacientes tiveram uma evolução ruim.

Analisando o sistema de Bethesda em relação à tireoidectomia, verifica-se a associação entre as duas variáveis ($X^2 = 105.16$, graus de liberdade = 14, p-valor = 4.834×10^{-16}), com força de associação entre as variáveis igual a 59,45% (V^2 de Cramer = 0.4945229). Ou seja, estatisticamente, é possível comprovar a relação entre Bethesda e a tireoidectomia.

Comparando o sistema de Bethesda com o tipo de tumor, o teste do Qui-Quadrado também indicou pela existência de associação entre as variáveis ($X^2 = 58.295$, graus de liberdade = 13, p-valor = 1.058×10^{-7}). Quanto à força de associação, a estatística V^2 de Cramer indicou uma força igual a 68,56. Os dados são apresentados no gráfico 4:

GRÁFICO 4 - Quantitativo de pacientes por tipo de tumor.



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório Benigno (BII); BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade; CM = Carcinoma Medular.

TABELA 15 - Casos dos Bethesda que foram submetidos a cirurgia total e parcial.

Tireoidectomia	CM		I		II		III		IV		V		VI		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Parcial	0		4	30,77	25	56,55	16	64	5	45,45	3	18,75	4	36,36	56	45,90
Total	1	100	9	69,23	20	44,45	9	36	6	54,55	13	81,25	7	63,64	66	54,10
Total Geral	1		13		45		25		11		16		11		122	

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório Benigno (BII); BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade; CM = Carcinoma Medular.

Os resultados observados na tabela 15 indicam que há maior indicativo de cirurgia com aumento do Bethesda, o que era esperado. Já na classificação Bethesda II (benigna) houve maior indicativo de cirurgias, refletindo o maior do número de casos em comparação aos demais nódulos classificados pelo Sistema de Bethesda. Na maioria dos nódulos submetidos a cirurgia o anátomo patológico foi benigno.

4.3 ACHADOS CITOLÓGICOS E ULTRASSONOGRÁFICO DAS CITOPUNÇÕES

Os pacientes que aceitaram participar da pesquisa mediante o consentimento do TCLE, foram 81 lâminas de citopunção de tireoide, apesar que o exame de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) resulta em várias lâminas com amostra tecidual da tireoide do paciente, para a pesquisa foi necessária apenas uma das (n) lâminas de citopunção resultantes.

As lâminas das citopunções de tireoide foram revisadas vide prontuário pela patologista participante do estudo, seguindo os critérios do (*Cancer Intitute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference Guideline* (CIBAS e SYED, 2009), é importante ressaltar que estes casos estavam armazenados no arquivo de lâminas do Departamento de Patologia do Hospital de Clínicas.

Dentre os 81 casos os achados ultrassonográficos foram observados a prevalência do nódulo tireoidiano localizados no lobo direito da tireoide seguido do lobo esquerdo (TABELA 16), e podemos notar neste grupo a frequência dos nódulos puncionados das categorias Bethesda II e Bethesda III, do que de da categoria Bethesda I e IV.

Além disso, houve 27% dos casos que não continha dados ultrassonográficos no prontuário eletrônico (GRÁFICO 6).

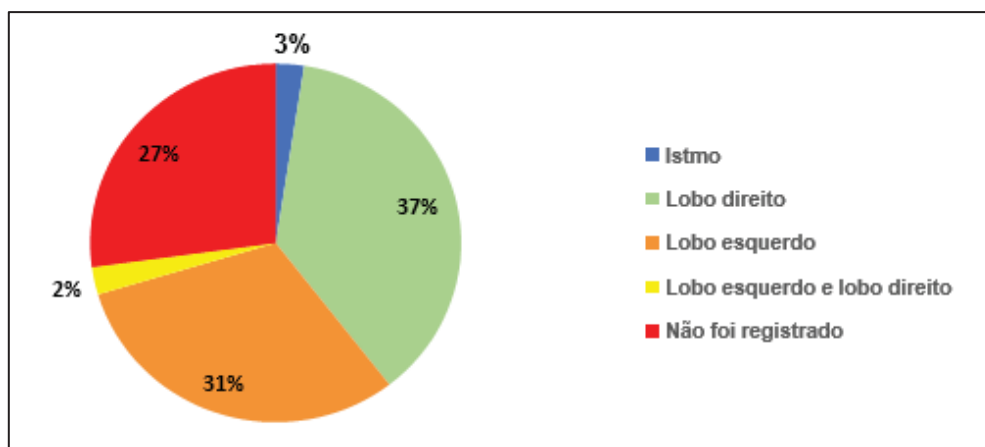
TABELA 16 - Achados ultrassonográficos versus categoria Bethesda.

Ultrassom / localização	Bethedas						Total
	I	II	III	IV	V	VI	
Istmo	1					1	2
Lobo direito	4	9	13	3		1	30
Lobo esquerdo	5	10	4	1	3	2	25
Lobo esquerdo e lobo direito		2					2
Não foi registrado	3	7	5	2	4	1	22
Total	13	28	22	6	7	5	81

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade.

GRÁFICO 5 - Localização do nódulo versus categoria Bethesda.



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade.

A composição dos nódulos tireoidianos dentre esses grupamentos de 81 casos foi sólido, porém, esse número pode aumentar ou não pois infelizmente muitos casos não haviam o registro dos achados ultrassonográficos completos (TABELA 17), foi uma limitação observado no presente estudo, pois a tabulação dos dados ultrassonográficos dos casos são importantes para o seguimento conducente da pesquisa, bem como para o conhecimento do seguimento clínico.

TABELA 17 - Composição dos nódulos tireoidianos versus categoria Bethesda.

Ultrassom / composição	Bethedas						Total
	I	II	III	IV	V	VI	
misto	1	3					4
misto, sólido	1	1	1				3
múltiplos, sólido		1					1
não foi registrado	8	13	15	2	6	4	48
sólido	3	8	6	2	1	1	21
sólido, misto		1		1			2
sólido, único		1					1
único, múltiplos, sólido				1			1
Total	13	28	22	6	7	5	81

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade.

Ao analisarmos os achados sobre a ecogenicidade dos nódulos de tireoide, pudemos notar que em sua maioria comportam-se como hipoecoico e isoecoico, porém, salientamos a importância da anotação completa dos prontuários seja eletrônico ou impresso, no presente estudo 35 dos 81 casos não continham informação sobre a ecogenicidade do nódulo (TABELA 18).

TABELA 18 - Ecogenicidade dos nódulos tireoidianos versus categoria Bethesda.

Ultrassom / ecogenicidade	Bethedas						Total
	I	II	III	IV	V	VI	
espongiforme		2					2
heterogêneo	1		1			1	3
heterogêneo, hipoecoico	1	1					2
hiperecoico			1	1			2
hiperecoico, heterogênio		1					1
hiperecoico, hipoecoico			1				1
hipoecoico	3	4	3	1	1	2	14
hipoecoico, halo completo	1						1
hipoecoico, hiperecoico		1					1
isoecoico	3	6	4	1			14
isoecoico, focos ecogênicos			1				1
isoecoico, halo hipoecoico		1					1
isoecoico, heterogênio		1					1
isoecoico, hiperecoico		1	1				2
não foi registrado	4	10	10	3	6	2	35
Total	13	28	22	6	7	5	81

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade.

Ao que diz respeito a margem do nódulo se é bem ou mal definido, observou-se que em geral conforme as categorias Bethesda comportam-se como bem definidos, porém muitos casos não foram registrados essa informação. Em relação a presença de cistificação e calcificação manteve-se a proporcionalidade direta dos casos, em contrapartida, os nódulos classificados como indeterminados e benignos tendem a ter uma margem mais delimitada (TABELA 19).

TABELA 19 - Margem, cistificação e calcificação dos nódulos tireoidianos versus categoria Bethesda.

Rótulos de Linha	Cistificação	Contagem de Calcificação
I	13	13
bem definido	6	6
não foi registrado	7	7
II	27	27
bem definido	8	8
mal definido	1	1
não foi registrado	19	19
III	22	22
bem definido	9	9
não foi registrado	13	13
IV	6	6
bem definido	4	4
não foi registrado	2	2
V	7	7
bem definido	1	1
não foi registrado	6	6
VI	5	5
mal definido	2	2
não foi registrado	3	3
Total Geral	81	81

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade.

Em relação aos achados citológicos das 81 punções aspirativas por agulha fina (PAAF), conforme o protocolo PAAF de tireoide (ANEXO 3), do que diz aos elementos tireoidianos como a presença ou ausência de coloide notou-se que a presença de coloide foi escassa e moderado visto na categoria benigna e a de atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (TABELA 20).

Além disso, notou-se que alguns casos o coloide era ausente não pela falta de registro, mas pela ausência do elemento tireoidiano coloide. É interessante salientar que nas outras categorias como neoplasia folicular ou suspeito para neoplasia folicular, o aspecto do coloide variou entre escasso, grumos, moderado e aquoso, na classe suspeito para malignidade o coloide foi ausente, mas apresentou-se em alguns casos aquoso e moderado, escasso, aquoso e em

grumos. A categoria malignidade colóide ausente em 4 (quatro) dos 5 (cinco) casos sendo 1 (hum) com colóide escasso.

TABELA 20 - Elemento tireoidianos colóide dos nódulos tireoidianos versus categoria Bethesda

Citologia / colóide	Bethedas						Total
	I	II	III	IV	V	VI	
Abundante			1				1
abundante entremeado		1					1
aquoso, abundante, bubble gum		1					1
aquoso, moderado					1		1
ausente	5	7	7	1	3	4	27
denso		1					1
denso, em grumos	1						1
discreto	1						1
escasso	5	4	7	2	1	1	20
escasso, aquoso	1	1			1		3
escasso, aquoso denso			1				1
escasso, aquoso, espesso				1			1
escasso, espesso		1					1
escasso, grumos					1		1
espesso		1					1
grumos			1	1			2
moderado		7	3				10
moderado, aquoso				1			1
moderado, aquoso, espesso		1	1				2
moderado, espesso		1					1
moderado, espesso, Bubble gum			1				1
moderado, grumos		1					1
presente		1					1
Total	13	28	22	6	7	5	81

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade

A lâmina de citopunção de tireoide são coradas em sua maioria pela coloração de Giemsa é constituído por adições de soluções de azul de metileno e eosina Y dissolvidas em metanol, o corante Giemsa foi descrito pelo bacteriologista Gustav Giemsa (GIEMSA, 1904). Outra coloração muito utilizada na análise citopatológica é a coloração Papanicolau, desenvolvida pelo médico citologista Geórgios Papanicolau, constitui uma coloração multicromática composta pela Hematoxilina de Gill ou Hematoxilina de Harris (Álcool Etilico Anidro 50mL,

Hematoxilina 7,0g, Oxido de Mercúrio Vermelho 2,5g, Sulfato de Alumínio e Potássio 100g, e Água Deionizada 1000ml); EA-36 (Ácido Fosfotungstico 2g, Álcool Etilico Anidro 900ml, Eosina amarelada 2,25g, Light Green 2,25g, Marron Bismark Y 0,5g, Água Deionizada 100mL, e Sol. Sat. Carbonato de Lítio 0,5mL); e por fim Orange G-6 composto por: Ácido Fosfotungstico 0,15g, Álcool Etilico 800mL, Orange G 5g, e Água Deionizada 200mL (BERKAN, 1984).

Além da coloração especial de Giemsa ou Papanicolau muito utilizadas na coloração de esfregaços citológicos, a lâmina também pode ser corada em álcool a seco. No presente estudo a maioria dos casos foram corados pelo coraçõ Giemsa, é mais utilizada, porém como já descrito anteriormente, o exame da PAAF's pode resultar (n) lâminas do esfregaço citológico onde o citopatologista pode optar em corar pelas duas colorações, por exemplo: se são 4 lâminas de PAAF's, duas coradas pela coloração de Papanicolau e duas pela Giemsa (TABELA 21).

TABELA 21 - Coloração dos nódulos tireoidianos versus categoria Bethesda.

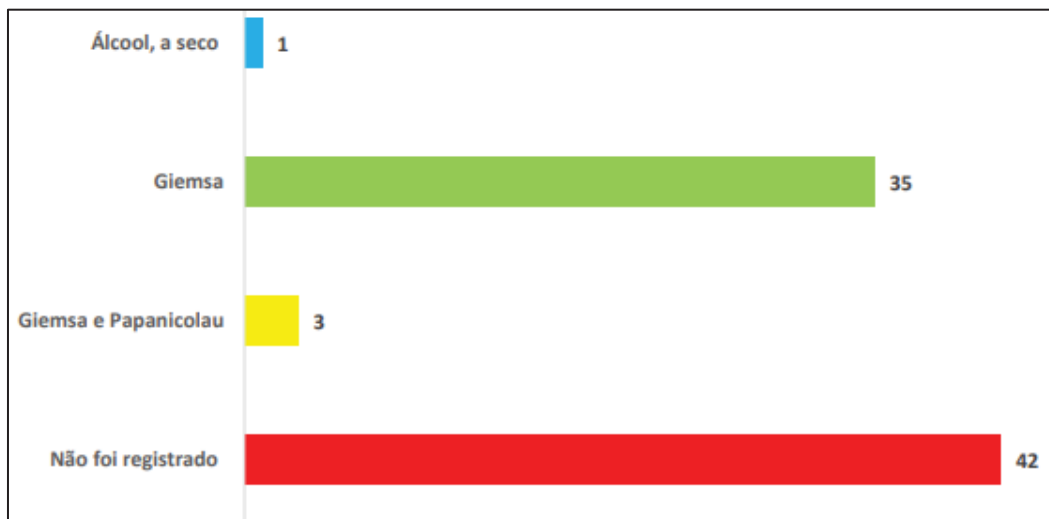
Citologia /coloração	Bethedas						Total
	I	II	III	IV	V	VI	
Álcool, a seco					1		1
Giemsa	9	11	13	1	1		35
Giemsa e Papanicolau		2	1				3
Não foi registrado	4	15	8	5	5	5	42
Total	13	28	22	6	7	5	81

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade.

Essas disposições foram observadas, mas não com muita frequência. Porém, houve muitos casos que não foi registrado no prontuário do SIH (Sistema de Informação Hospitalar), isso pode acarretar divergência nos dados (GRÁFICO 6).

GRÁFICO 6 - Coloração dos nódulos tireoidianos versus categoria Bethesda.



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade.

Tabela 22 - Coloração dos nódulos tireoidianos versus categoria Bethesda.

Citologia/fundo	Bethedas						Total
	I	II	III	IV	V	VI	
Hemático	6	8	8	1	2	2	27
Hemorrágico	5	8	6	3			22
Não foi registrado	2	12	8	2	5	3	32
Total	13	28	22	6	7	5	81

FONTE: Os autores (2022).

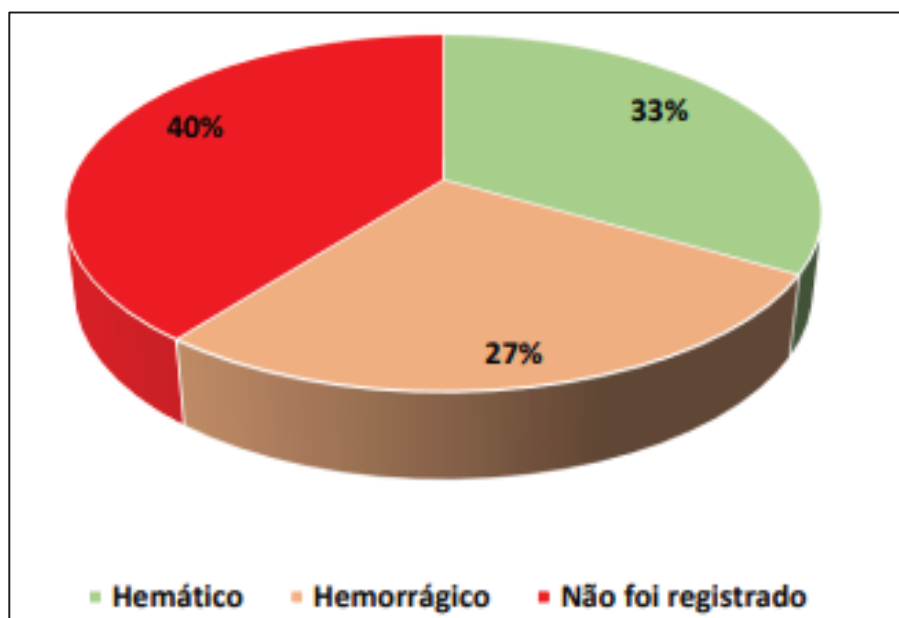
LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade.

Em relação ao fundo dos esfregaços citológicos resultantes da citopunção de tireoide foi observado que a maioria era hemático (TABELA 22) do que hemorrágico, algo contundente pois ao puncionar o nódulo de tireoide, não só resíduo tecidual contém o esfregaço mas células de eritrócitos, são aspirados também, claro que procura-se aspirar menos hemácias pois a presença desta no esfregaço citológico pode ser insatisfatório, algo visto na categoria Bethesda I, pois,

a grande quantidade de hemácia dificulta a análise do citopatologista. A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é um exame invasivo e dolorido que ninguém quer submeter o paciente há várias repunções sem necessidade. Por isso, a experiência no manejo da agulha, o local exato por mais ser guiado por ultrassom é muito importante pois reflete na qualidade do esfregaço, na análise citológica e priori zelo ao paciente.

Os casos que não continham registro do fundo do esfregaço foram de 40%, em relação aos 33% hemático e por fim 27% esfregaços com funcho hemorrágico (GRÁFICO 7).

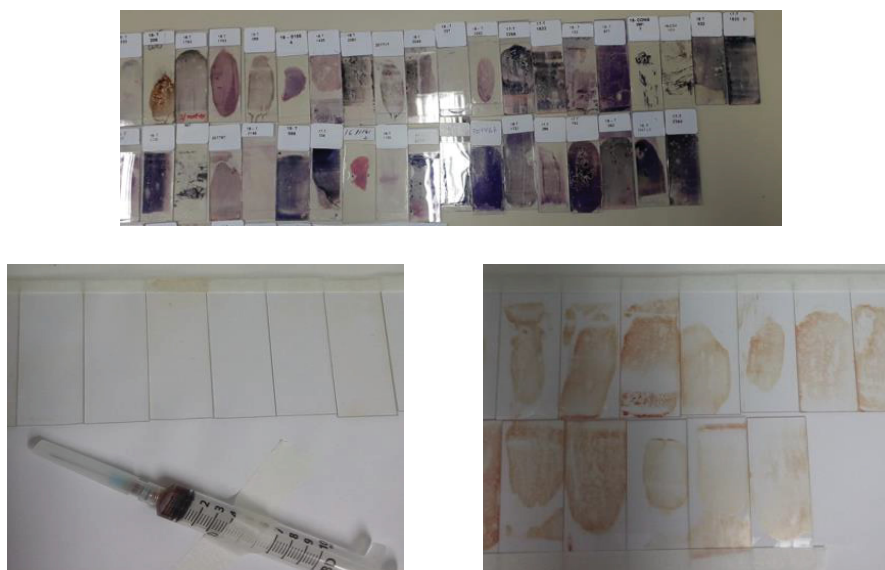
GRÁFICO 7 - Fundo dos esfregaços citológicos



FONTE: Os autores (2022).

A punção aspirativa por agulha fina do nódulo tireoidiano (PAAF), é o melhor exame indicado para determinar se o nódulo é benigno ou maligno, onde é feito o esfregaço do material tecidual contido no lavabo da agulha do nódulo puncionado, podendo ser corado pela coloração Giemsa, Papanicolau ou álcool a seco, onde é analisado por especialista da área (FIGURA 15).

Figura 15 - Esfregaços citológicos das lâminas de citopunção de tireoide.



FONTE: Os autores (2022).

Em relação ao aspecto das células foliculares deste grupamento de estudo a maioria apresenta característica discreto visto na categoria Bethesda II, haja vista, que os casos ausentes é porque realmente não houve indícios de células foliculares, diferentemente do não registrado, onde foi descrito se havia ou não esse elemento tireoidiano (TABELA 23).

TABELA 23 – Células foliculares nos esfregaços citológicos.

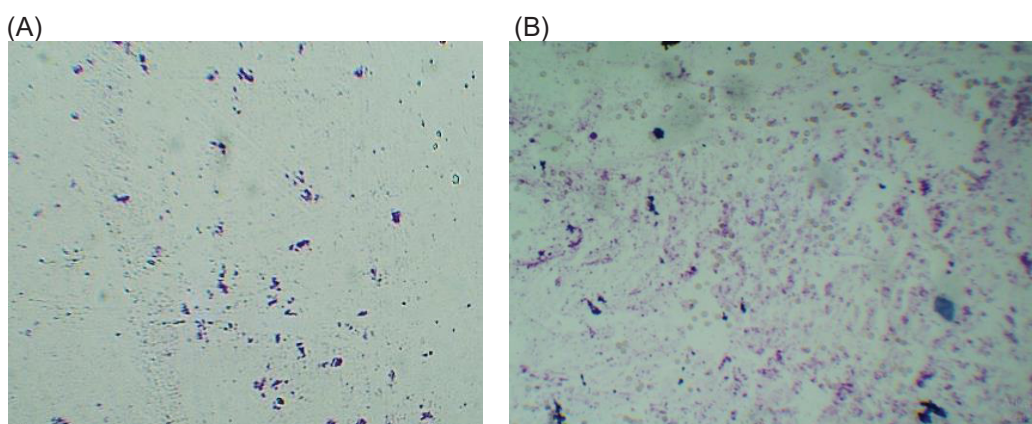
Células foliculares aspecto	Bethedas						Total
	I	II	III	IV	V	VI	
abundante					1		1
acentuado				1	2		3
acentuado, discreto		1					1
ausente	3	2	4		2	2	13
células de Hurthle oncocítica			1				1
discreto	9	11	4	2			26
moderado		6	5	1	2	1	15
não registrado	1	8	7	2		2	20
presente			1				1
Total	13	28	22	6	7	5	81

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade.

Embora alguns Bethesda I apresentem células foliculares discreto como mostra na Tabela 23. Houve alguns esfregaços citológicos da categoria Bethesda I cujos aspectos microscópicos eram constituídos por fundo hemático com pequena quantidade de macrófagos com escassas células foliculares, dissociado, sem atipia e com pequena quantidade de coloide ou exclusivamente de conteúdo de cisto (FIGURA 16. A e B).

FIGURA 16 - Microscopia da citopunção de tireoide da categoria Bethesda I.



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: Lâminas coradas em Giemsa, aumento 100X. (A) e (B) Insatisfatório.

As células foliculares podem estar dispostas em arranjo em monocamada ou lençóis em monocamada, visto na categoria Bethesda II, porém, observamos a vasta variação do tipo de arranjos das células foliculares, tendo mais de uma característica, conforme o protocolo de PAAF de tireoide (ANEXO 3). É interessante pois notar que o arranjo fornece informação sobre a maneira que a célula folicular está disposta, visto na análise microscópica, podendo ser dissociada, em macrofóliculo ou microfolicular, lençóis em mocamada, papilas, trabéculas ou folículos “in toto”. Num caso classificado Bethesda III, o tipo de arranjo foi isolado, pequenos grupamentos, microfóliculos, clareamento nuclear, variação tamanho núcleo (TABELA 24).

TABELA 24 - Arranjo das células foliculares versus categoria Bethesda.

Tipo do arranjo	Bethesda						Total Geral
	I	II	III	IV	V	VI	
Arranjados			1				1
Ausente	10	7	5		2	2	26
Ausente, folículos "in toto"	1						1
Citoplasma denso, núcleos ovalados			1				1
Dipostas, pequenos grupos, lençóis, raros microfolículos		1					1
Dispostas grupamentos, tamanhos e forma variadas, sobreposição celular					1		1
Dissociadas						1	1
Dissociadas, lençóis em monocamada, folículos "in toto"		2					2
Dissociadas, folículos "in toto"			1				1
Dissociadas, lençóis em monocamada				1			1
Dissociadas, macrofolículos, lençóis em monocamada			1				1
Dissociadas, macrofolículos, lençóis em monocamada, folículos "in toto"		1	1				2
Dissociadas, macrofolículos, papilas, lençóis bidimensionais, "grooving"			1				1
Dissociadas, microfolículos				1			1
Dissociadas, microfolículos, lençóis em monocamada, papilas, folículos "in toto"					1		1
Dissociadas, lençóis em monocamada		1					1
Em grupamentos			1				1
Folículos "in toto"		1					1
Grupamentos em monocamada		2					2
Grupamentos, sem sobreposição		1					1
Grupamentos, sobreposição, aspecto moruliforme		1					1
Grupos e folhetos, microfolículos "in toto", moderado número células hurthle				1			1
Grupos monocamada			1				1
Grupos, sobreposição, macrofolículos, microfolículos					1		1
Isoladas	1	1					2
Isoladas, agrupadas, tridimensionais			1				1
Isoladas, em pequenos grupos	1						1
Isoladas, grupamentos monocamada, discreto pleomorfismo		1					1
Isoladas, grupamentos, microfolicular, tridimensional, núcleos aumentados, irregulares		1					1
Isoladas, grupamentos, microfolículos, sobreposição nuclear			1				1
Isoladas, grupamentos, sobreposição nuclear, microfolículos				1			1
Isoladas, grupamentos, sobreposição nuclear, núcleos aumentados, hipercoreados, com clareamento nuclear			1				1
Isoladas, grupos com sobreposição nuclear, alta relação núcleo e citoplasma			1				1
Isoladas, grupos em monocamada, macrofolículos		1					1
Isoladas, monocamada			1				1
Isoladas, pequenos grupamentos		1					1
Isoladas, pequenos grupamentos, microfolículos, clareamento nuclear, variação tamanho núcleo			1				1
Isoladas, pequenos lençóis em monocamada		1					1
Isolado, macrofolículos, microfolículos				1			1
Isolados, grupamentos, sobreposição nuclear, microfoliculos							

(Continua)

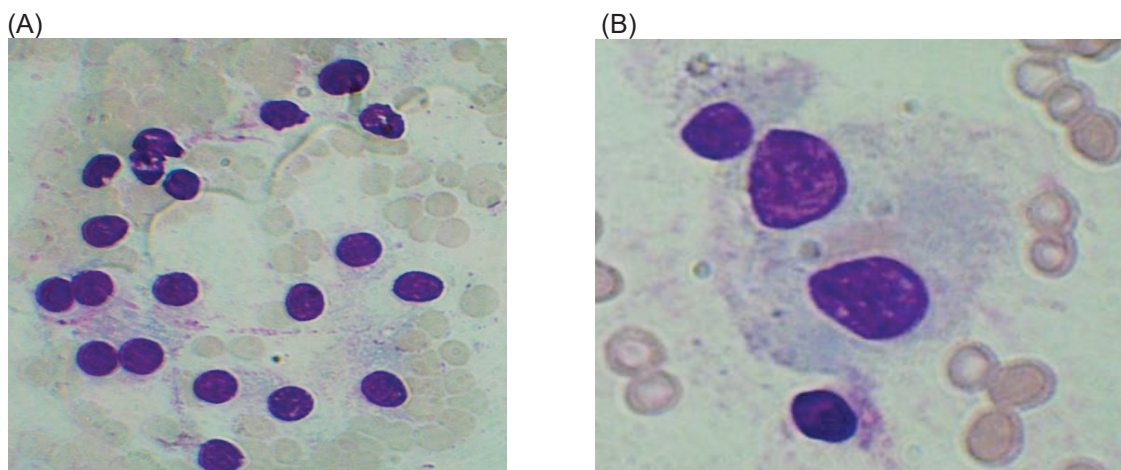
Lençóis em monocamada	2						2
Lençóis em monocamada, microfóliculos, fóliculos "in toto"						1	1
Lençóis, dissociados, alterações regressivas	1						1
Macrofóliculos, lençóis em monocamada, papilas, fóliculos "in toto"						1	1
Metaplasia oxifílica, isoladas, grupamentos monocamada	1						1
Microfóliculos	1	1					2
Microfóliculos, lençóis em monocamada, papilas, sobreposição com grupos irregulares						1	1
Pequenos grupamentos, sobreposição, nucleares	1						1
Poligonais ou fusiformes com citoplasma moderado, núcleos atípicos, dissociadas, grupos com sobreposição celular						1	1
Total geral	13	27	22	6	7	5	80

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade.

Os elementos tireoidianos variam conforme o grupamento tecidual constituinte do nódulo biopsiado. Na categoria Bethesda II, alguns apresentam microscopia com fundo extensamente hemorrágico com raras células foliculares ora isoladas, ora em pequenos grupos em monocamada, organizados em macrofóliculos, com coloide aquoso em pequena quantidade (FIGURA 17.A). Entretanto, os aspectos celulares constituído por escassa quantidade de células foliculares sem atipias, podem apresentar moderada quantidade de coloide e fundo hemorrágico (FIGURA 17.B).

FIGURA 17 - Microscopia da citopunção de tireoide da categoria Bethesda II.



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: Lâminas coradas em Giemsa, aumento 400X. (A) Elementos de interesse (células foliculares em pequeno número satisfatório limítrofe. (B) A hipocelularidade relativa, associada a extensos artefatos de compressão dificultam a análise do material.

Outro elemento tireodiano que pode ser visto na lâmina de citopunção são as células oxifílicas (oncocíticas), que podem ser discretos, moderados ou acentuados, porém, dentro deste grupo de estudo 69 dos casos não apresentaram células oxifílicas, embora tenha uns casos com células oxifílicas acentuado na categoria Bethesda IV, moderado nas categorias Bethesda II, III, IV e V. Apenas 3 (três) casos sem registro e um caso presente, mas não sem o registro do aspecto celular em estudo (TABELA 25).

TABELA 25 - Células oxifílicas versus categoria Bethesda.

Células Oxifílicas	Bethesda						Total Geral
	I	II	III	IV	V	VI	
Atipia							
acentuado					1		1
ausente	13	26	17	4	5	4	69
discreto		2	1	1	1		5
moderado					1		1
não registrado			3				3
presente			1				2
						1	
Total Geral	13	28	22	6	7	5	81

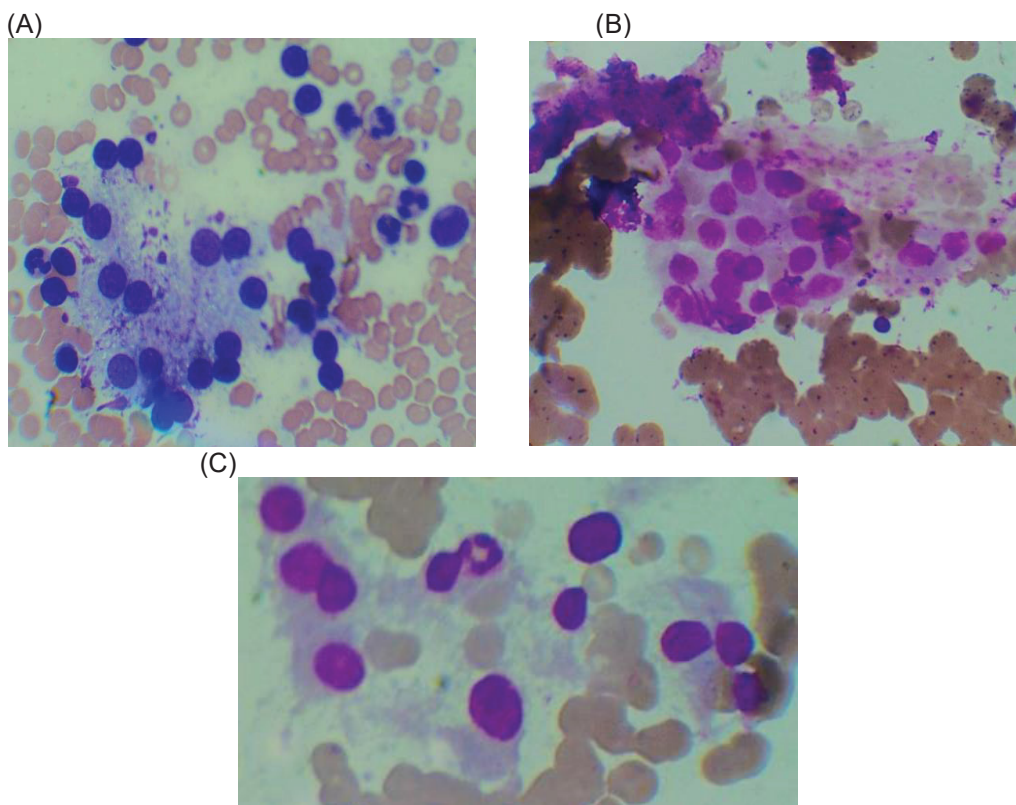
FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade.

Sendo assim, a maneira que estão arranjadas podendo estarem dissociadas, em macrofóliculo, ou microfóliculo, em lençóis em monocamada, podem apresentar papilas ou trabéculas, no presente estudo, como não houve muitos casos que apresentaram grupamento de células oxifílicas, compatível com aqueles com arranjo ausente (TABELA 26).

Os esfregaços citológicos de punção de nódulo de tireoide de Atipia de Significado Indeterminado, podem ser constituídos por células ora isoladas, ora em grupamentos em monocamada, com presença de macrófagos e moderada quantidade de coloide (FIGURA 18.B e C). Além disso, na microscopia da categoria Bethesda III, os elementos tireoidianos como células epiteliais do tipo folicular, com pouco coloide, e células oxifílicas com metaplasia oxifílica arranjadas com microfóliculos, são vistos nesta categoria, e tendem ser acompanhados de células inflamatórias, na Figura 18.A são vistos raros macrófagos.

FIGURA 18 - Microscopia da citopunção de tireoide da categoria Bethesda III.



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: Lâminas coradas em Giemsa, aumento 400X. (A) Lesão Epitelial de Significado Indeterminado (AUS\FLUS). (B) e (C) Atipia de Significado Indeterminado, amostra consiste quase exclusivamente, de células de Hürtle.

TABELA 26 - Arranjo das células oxifílicas versus categoria Bethesda.

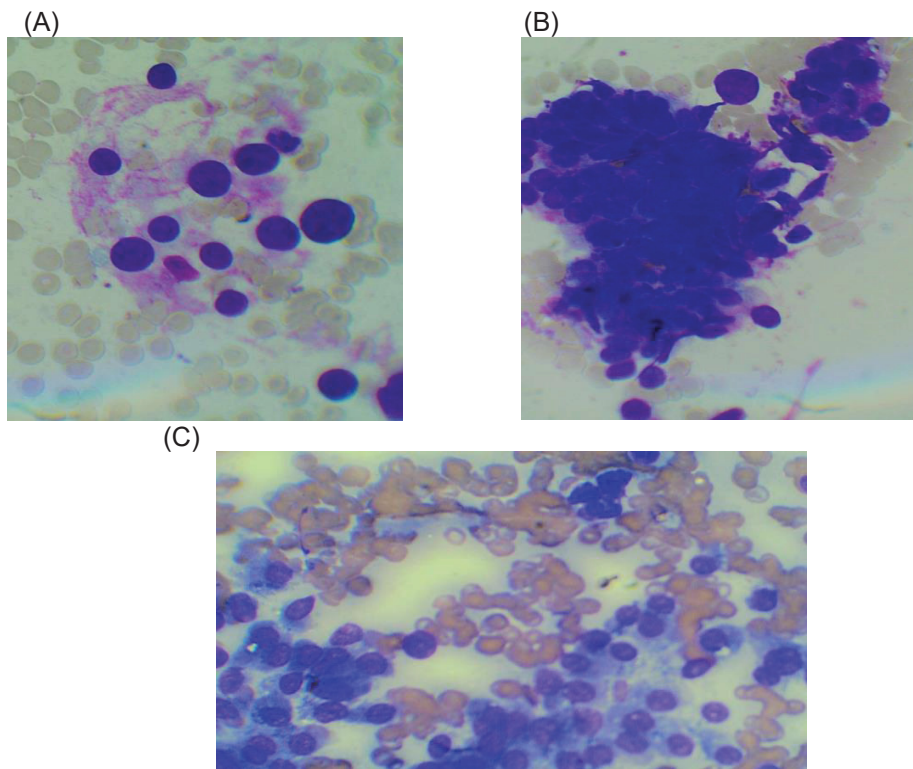
Contagem de Arranjo	Bethesda	I	II	III	IV	V	VI	Total Geral
ausente		12	24	19	5	5	4	69
ausente e folículos "in toto"			1					1
dissociadas				1		1		2
dissociadas, macrofóliculos, microfóliculos, lençóis em monocamada					1			1
folículos "in toto"		1	3			1		5
lençóis em monocamada			1					1
Metaplasia oxifílica				1				1
metaplasia oxifílica, com variação dos tamanhos nucleares				1				1
Total Geral		13	29	22	6	7	5	81

FONTES: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade.

Na análise microscópica da categoria Bethesda IV os elementos tireoidianos podem ser constituídos por pouca quantidade de células foliculares, ora isoladas, ora em grupamentos por vezes com sobreposição nuclear que formam microfóliculos. Há escassa quantidade de coloide, presença de pouca quantidade de células de Hürtle, com fundo hemorrágico (FIGURA 19 A e B). Por outro lado, presença de coloide pode estar presente moderadamente, bem como, o arranjo das células foliculares em macrofóliculos, microfóliculos e folículos "in toto". As células inflamatórias como macrófagos e linfócitos discretos, são observados plasmócitos e neutrófilos. Em muitos casos, outros achados, tais como, estroma denso, necrose e calcificação podem estar ausentes (FIGURA 19 C).

FIGURA 19 - Microscopia da citopunção de tireoide da categoria Bethesda IV.



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: Lâminas coradas em Giemsa, aumento 400X. (A) e (B) Neoplasia folicular. (C) Suspeito para neoplasia de células de Hürtle.

TABELA 27 - Aspecto das células C parafoliculares versus categoria Bethesda.

Células c parafoliculares	I	II	III	IV	V	VI	Total Geral
Bethesda							
"Grooving", nucléolos			1				1
Ausência de pseudonclusões e fendas				1			1
Ausente	13	22	12	4	3	2	57
Células cubóides de citoplasma amplo, oxifílico, núcleos arredondados, centrais, excêntricos e discreta variação de tamanho. Núcleos contornos irregulares, sem arranjo tridimensional.			1				1
Células cubóides, hipercoreadas e microfóliculos			1				1
Células de Hurthle			1				1
Células de Langerhans			1				1
Células epiteliais, moderado, cubóides, núcleos arredondados, centrais, hipercromáticos e sem papilas atípicos			1				1
Células foliculares núcleos de tamanhos variados, arredondados, alongados, esboço de fenda ("Grooving"), citoplasma amplo, denso e granular					1		1
Células oncócicas: abundante, dispostas em lençóis, trabeculas dissociadas e estruturas microacinares						1	1
Células pleomorfismo, arredonda e ovalada, presença de fendas intranucleares e áreas clareamento nuclear					1		1
Citoplasma amplo, granular, núcleos variados tamanhos, nucléolos evidentes e fendas nucleares, células Hurthle			1				1
Citoplasma granular, diferenciação oxifílicas		1					1
Citoplasma granular, núcleos aumentados, nucléolos evidentes		1					1

(Continua)

Debris celulares de permeio, figuras mitóticas	1	1					
Exclusivamente células de Hurthle: moderado, esparsas, aumento nuclear, marcado e anisonucleose.	1						1
Fundo azurofilo, em grupos com extensa sobreposição de nuclear, hipercromasia nuclear, variação do tamanho dos núcleos.	1						1
Micelas, adiposas, microfragmentos teciduais hipocelulares, capilares e núcleos regulares, alongados e sem atipias, citoplasma vacuolado, estriações no citoplasma.	1						1
Morfologia de células de Hurthle.		1					1
Pleomorfismo, núcleos com fendas e clareamento, não há células pigmentação melânico no citoplasma	1						1
Presente células Hurthle	1						1
Pseudoinclusões.						1	1
Pseudoinclusões, "Grooving", nucleolos, granulos,metacromáticos						1	1
Pseudoinclusões, "Grooving", pleomorfismo e clareamento					1		1
Pseudoinclusões, granulos metacromáticos, "Grooving", nucléolos					1		1
Total geral	13	27	22	6	7	5	81

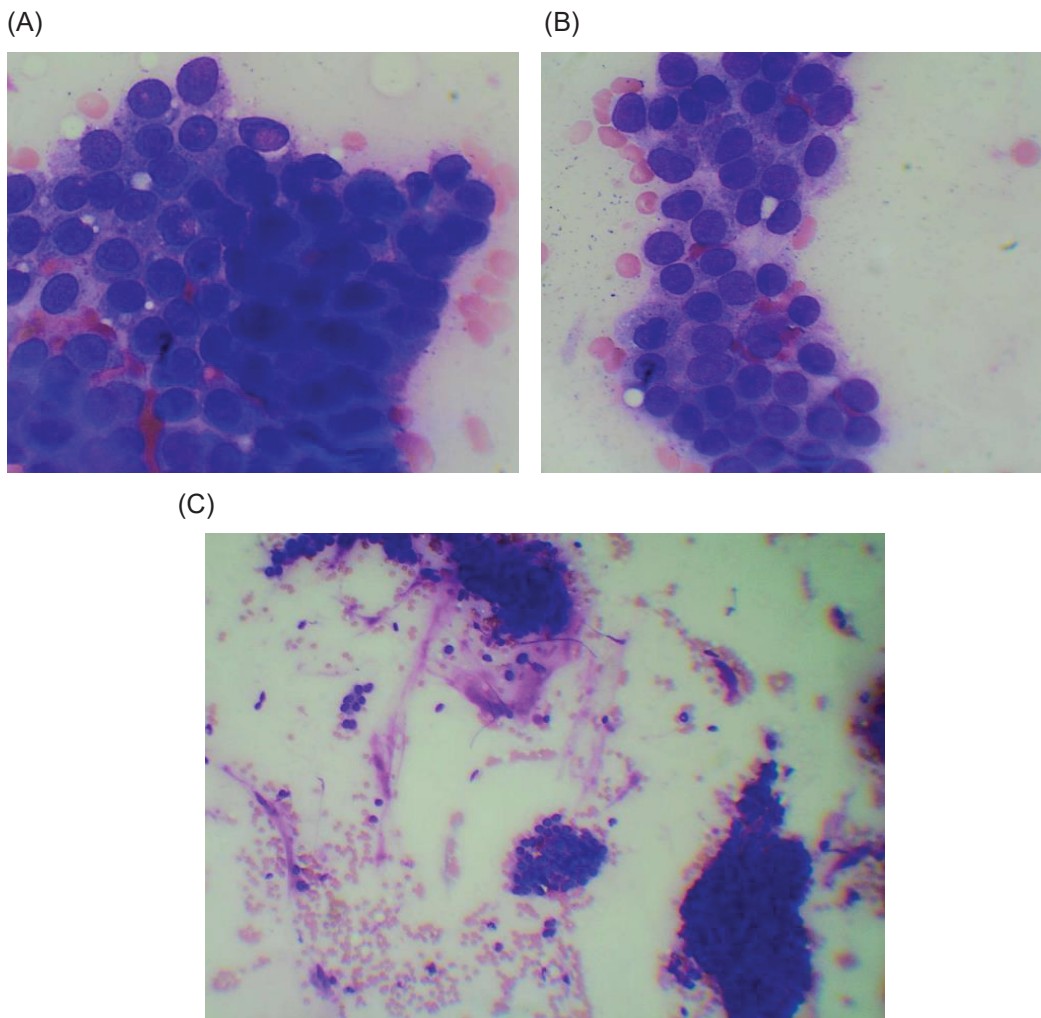
FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade.

Os aspectos da citologia na categoria Bethesda V é observado coloide moderado aquoso, a presença de células foliculares bem característico, de moderado com arranjos dissociados, microfolículos, lençóis em monocamada e

papilas, folicúlos “in toto. Além disso, outros tipos celulares podem estar presentes como “Grooving”, nucléolos

FIGURA 20 – Microscopia da citopunção de tireoide da categoria Bethesda V.



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: Lâminas coradas em Giemsa, aumento 400X. (A), (B) e (C) Quadro citológico sugestivo de lesão proliferativa de tipo papilífero de tireoide.

A presença de células C parafoliculares responsáveis pela produção de calcitonina, hormônio o qual regula a produção de cálcio no organismo, apresentam características celulares tais que podem ser observadas, tais como pseudoinclusões, grânulos metacromáticos, grooving, nucléolos. Outros tipos de celulares também podem ser observados como micelas, adiposas, microfragmentos teciduais hipocelulares, capilares e núcleos regulares, alongados e sem atipias, citoplasma vacuolado, estriações no citoplasma, visto no esfregaço da categoria Bethesda II, em contrapartida, presença de células Hurthle podem ser

vistas nas classes Bethesda III e V, e pleomorfismo, núcleos com fendas e clareamento, sem células pigmentação melânico no citoplasma em Bethesda II e V (TABELA 27). São característica que cada caso apresenta em particular pois os aspectos celulares variam de grupamento celular e morfológico de indivíduo para indivíduo.

Por se tratar de esfregaço tecidual da tireoide sendo que a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é um exame recomendado e mais utilizado para tal, sabemos que é uma região vascularizada onde há presença de células inflamatórias, sendo assim, na análise citopatológica podem ser vistos a presença de macrófagos, linfócitos, plasmócitos e neutrófilos. Estas células são liberadas por citocinas medeiam a resposta inflamatória, no caso do macrófago é uma célula de defesa inume presentes no tecido conjuntivo cuja função é de fagocitar partículas ou células estranhas do organismo.

Nos esfregaços das citopunções de tireoide do presente estudo, observou-se que os aspectos dos macrófagos variaram de discreto, acentuado, moderado, com células gigantes multinucleadas, histiócitos com atividade macrofágica, visto na classe Bethesda II e III (TABELA 28).

TABELA 28 - Aspecto dos macrófagos versus categoria Bethesda.

Aspecto dos macrófagos	bethesda	I	II	III	IV	V	VI	Total Geral
Acentuado		1	1					2
Acentuado, células gigantes multinucleadas			1					1
Acentuado, espumosos					1			1
Ausente		10	7	10	2	5	2	38
Células gigantes multinucleadas			1	1				2
Discreto		2	2	1	1	2	1	9
Discreto, células gigantes multinucleadas							1	1
Discreto, histiócitos com atividade macrofágica				3				3
Discreto, histiócitos com atividade macrofágica, células gigantes multinucleadas			1					1
Esparso		1						1
Esparso de permeio			1					1
Moderado			3	2	1			6
Moderado, histiócitos com atividade macrofágica			1	1				2
Permeio			1					1
Presente			7	4	1		1	13
Total geral		13	27	22	6	7	5	81

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade.

É interessante notarmos, que os macrófagos apresentam quando presentes apresentam aspecto discreto ou células gigantes multinucleadas na categoria Bethesda IV (TABELA 28). E muitas vezes, vem acompanhado de moderado coloide, presença de células de foliculares com arranjo microfolicular, macrofolicular e folículos “in toto”. Embora, a presença de células inflamatória além dos macrófagos, como discretos linfócitos, linfócitos e plasmócitos, outros achados como estroma, necrose e calcificação não foram observados em algumas citopunções (FIGURA 21 C).

Entretanto, as características histológicas de carcinoma papilífero clássico, unifocal como mostra a Figura A e B, é um caso resultante de uma lobectomia direita. As informações da macroscopia descreve um segmento de tecido tireoidiano de 42 g e 6,0x4,5x4,0cm, a superfície externa acastanhada, lobulada, firme e elástica. Aos cortes notou-se que uma lesão nodular heterogênea com áreas brancacentas, amarronzadas e vinhosas, medindo 5,8x3,5x3,5cm nos seus maiores eixos. O tamanho do tumor nesse caso, era de 2,5cm em sua maior dimensão, não foi identificado angioivasão e nem linfática, margem radial livre de neoplasia onde a extensão extratireoidiana não foi identificada.

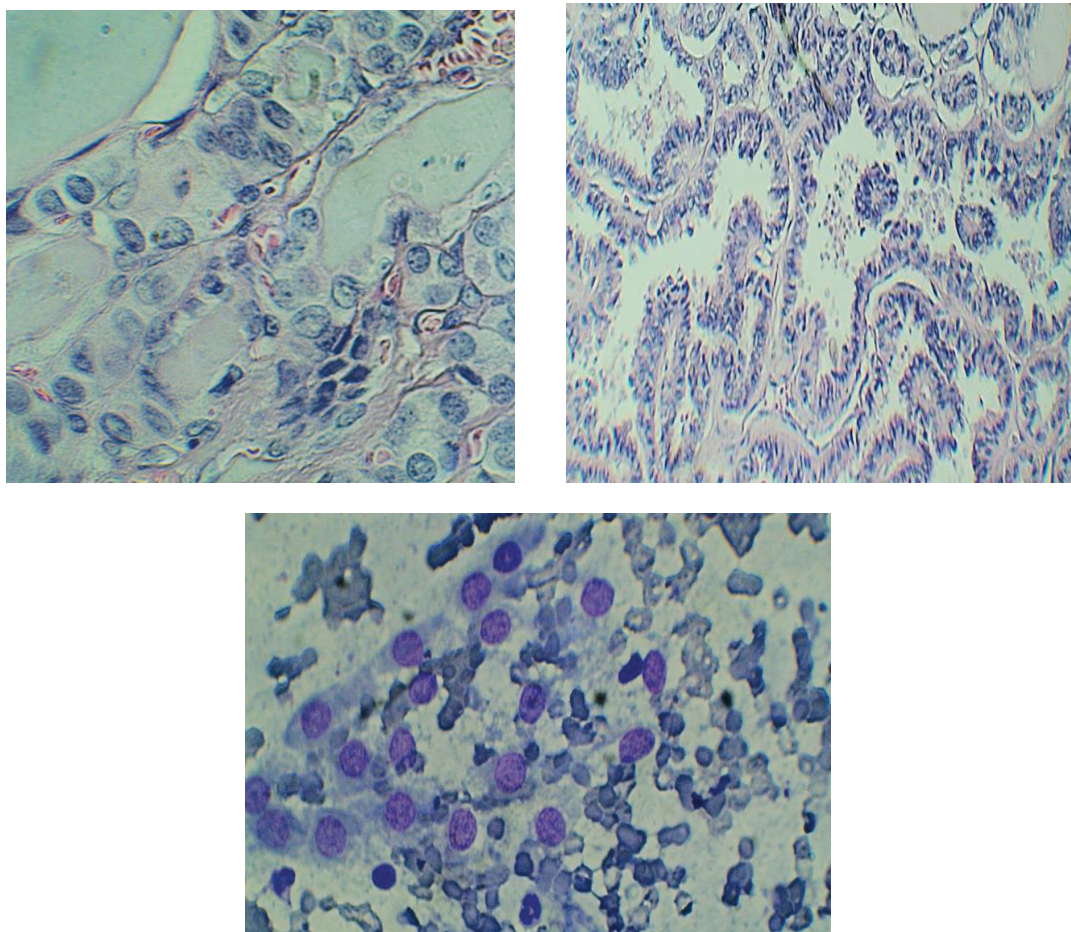
TABELA 29 - Aspecto dos linfócitos versus categoria Bethesda.

Linfócitos	Bethesda							Total Geral
	I	II	III	IV	V	VI		
Ausente	12	15	17	3	5	2	54	
Discreto		2	1	1	1	2	7	
discreto, permeio			1				1	
Moderado		1					1	
moderado, permeando células foliculares					1		1	
moderado, polimórficos			1				1	
Presente	1	10	3	2		1	17	
Total Geral	13	27	22	6	7	5	81	

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade.

FIGURA 21 – Microscopia da citopunção de tireoide da categoria Bethesda VI.



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: Lâminas coradas em Giemsa, aumento 400X. (A), (B) Padrão histológico predominante folicular com pequeno foco papilar, estadiamento papilar: pT2pNx. (C) Suspeito para neoplasia de células de Hürtle.

Já as células inflamatórias como os linfócitos e plasmócitos responsáveis pela produção de anticorpos no organismo, foram observados nos esfregaços das citopunções de tireoide. O aspecto dos linfócitos variou de discreto, permeio e moderado e polimórficos ou em permeio a células foliculares em Bethesda III e V (TABELA 29). Em comparação aos plasmócitos apenas nos Bethesda II, IV e V, foram observados no esfregaço citológico (TABELA 30).

TABELA 30 - Quantidade de Plasmócitos versus categoria Bethesda

Plasmócitos								
	Bethesda	I	II	III	IV	V	VI	Total Geral
ausente		13	26	22	5	6	5	78
presente			2		1	1		4
Total Geral		13	27	22	6	7	5	81

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade.

A presença de célula inflamatória nos casos os neutrófilos apenas 20 dos esfregaços continham esta célula, visto em todas as categorias Bethesda, com destaque de 10 casos no Bethesda II. (TABELA 31).

TABELA 31 - Quantidade de Neutrófilo versus categoria Bethesda.

Neutrófilo								
	Bethesda	I	II	III	IV	V	VI	Total Geral
ausente		12	18	20	3	5	3	61
presente		1	10	2	3	2	2	20
Total Geral		13	27	22	6	7	5	81

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: BI = Não diagnóstico ou não satisfatório; BII = Benigno; BIII = Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS\SFN); BIV = Neoplasia folicular ou Suspeito para uma neoplasia folicular (FN\SFN); BV = Suspeito para malignidade; BVI = Malignidade.

Em relação aos outros achados que apresentaram estroma denso apenas 10 casos do grupamento das 81 citopunções de tireoide, entres eles: 5 (cinco) Bethesda II, 2 (dois) Bethesda I, 2 (dois) Bethesda III e por fim 1 (hum) Bethesda V. Porém dos 81 casos não houve indícios de necrose, apenas 1 (hum) caso apresentou calcificação que foi observado na categoria Bethesda VI para malignidade.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL *IN SILICO* DE microRNAs.

Ferramenta computacional que utiliza modelo de covariância para gerar perfis probabilísticos de sequências e estruturas secundárias de famílias de RNA (NAWROCKI, KOLBE e EDDY, 2009).

O modelo de covariância é um caso especial de modelo probabilístico que valoriza uma combinação da sequência consenso e de estrutura secundária consenso de um dado RNA de modo que, em muitos casos, é capaz de identificar RNAs homólogos que tem a estrutura secundária conservada, mas baixa conservação de sequência primária (NAWROCKI, KOLBE e EDDY, 2013). O Infernal 1.1.1 é composto por cinco programas: *cmbuild*, *cmcalibrate*, *cmsearch*, *cmscan* e *cmalign*.

Os dados foram submetidos à ANOVA e, posteriormente a pressuposição de normalidade dos resíduos, foi verificada pelo teste de normalidade na estatística frequentista Shapiro-Wilk, sendo esse pressuposto violado (SHAPIRO, WILK 1965). O teste da ANOVA é utilizado para testar a igualdade de três ou mais médias populacionais, baseado na análise das variâncias amostrais (MONTGOMERY, RUNGER, 2003).

A hipótese testada na ANOVA, é a de que as médias populacionais dos tratamentos não diferem entre si, com o determinado nível de significância de 5%, a qual pode ser representada da seguinte forma:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots \mu_a,$$

em que a representa o número total de tratamentos do ensaio e μ_i representa a média populacional do i -ésimo tratamento, $i=1, \dots, a$.

Portanto como o pressuposto de normalidade dos resíduos foi violado, aplicamos então o teste de Kruskal-Wallis que é o método não-paramétrico alternativo à ANOVA para um fator (KRUSKAL, WALLIS 1952), sendo utilizado nos casos em que as suposições exigidas pela ANOVA não são atendidas. O teste não-paramétrico é um método que compara duas ou mais amostras independentes de tamanhos iguais ou diferentes após a aplicação de teste não paramétricos, aplicamos o teste de comparação múltipla de Nemenyi com o intuito de verificar qual dos fatores que diferem entre si (NEMENYI, 1963).

A lista completa das sequências dos transcritos do gene BRAF é a seguinte: BRAF-207, BRAF-208, BRAF-209, BRAF-210, BRAF-211, BRAF-212,

BRAF-214, BRAF-216, BRAF-216 e BRAF-218. Os resultados estão listados na TABELA 32. Adotando esta abordagem, nenhum ncRNA foi detectado em BRAF-218, devido ao número significativo de andaimes e contigs que são identificados em sequência incompleto. Os transcritos com maior número de ncRNAs, comuns foram, BRAF-214 e BRAF-216.

TABELA 32 - ncRNAs PREVISTAS NAS SEQUÊNCIAS INTRÔNICAS DO GENE BRAF.

Sequência Intrônicas	ncRNAs
BRAF	CRISPR-DR45, CRISPR-DR62, Metazoa_SPR, mir-1255, mir-544, mir-574, mir-562, mir-6, Plant_SPR, plasmodium_snoR14, plasmodium_snoR21, snopsi28S-3316, snoR07, snoR13 and U6.
BRAF-207	CRISPR-DR45, CRISPR-DR62, Metazoa_SPR, mir-1255, mir-544, mir-562, mir-574, mir-6, Plant_SPR, snoR07, snoR13 and U6.
BRAF-208	CRISPR-DR45, CRISPR-DR62, Metazoa_SPR, mir-1255, mir-544, mir-562, mir-574, mir-6, Plant_SPR, snoR07, snoR13 and U6.
BRAF-209	Metazoa_SPR, mir-544, mir-562, mir-574, Plant_SPR, snoR07, snoR13 and snopsi28S-3316.
BRAF-210	Metazoa_SPR.
BRAF-211	CRISPR-DR45, CRISPR-DR62, Metazoa_SPR, mir-1255, mir-544, mir-562, mir-574, mir-6, Plant_SPR, snoR07, snoR13 and U6.
BRAF-212	Metazoa_SPR, mir-562, mir-544, mir-574, Plant_SPR, snoR07, snoR13 and snopsi28S-3316.
BRAF-214	CRISPR-DR45, CRISPR-DR62, Metazoa_SPR, mir-1255, mir-544, mir-562, mir-574, mir-6, Plant_SPR, plasmodium_snoR14, plasmodium_snoR21, snopsi28S-3316, snoR07, snoR13 and U6.
BRAF-216	CRISPR-DR45, CRISPR-DR62, Metazoa_SPR, mir-1255, mir-544, mir-574, mir-6, Plant_SPR, plasmodium_snoR14, plasmodium_snoR21, snopsi28S-3316, snoR07, snoR13 and U6.
BRAF-217	Metazoa_SPR.
BRAF-218	Ausente.
GRCh38.p14	CRISPR-DR45, CRISPR-DR62, Metazoa_SPR, mir-1255, mir-544, mir-574, mir-6, Plant_SPR, plasmodium_snoR14, plasmodium_snoR21, snopsi28S-3316, snoR07, snoR13 and U6.

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: Sequências intrônicas do gene BRAF = 10; BRAF = gene BRAF; GRCh38.p14 = Cromossomo 7 do Homo sapiens, GRCh38.p14 Montagem Primária; ncRNAs = RNAs não codificantes.

Como pudemos observar na tabela 33, o número de preditos variou conforme a sequência, com exceção das sequências intrônicas BRAF-207, BRAF-208, BRAF 214 e BRAF-216, obtiveram a mesma quantidade de ncRNAs preditos,

refletindo na menor variabilidade com desvio padrão igual a 11,36 e 10,76 respectivamente. A sequência intrônica BRAF-217 apresentou a maior variabilidade por ter o menor desvio padrão de 5,89 tendo uma média e mediana igual.

TABELA 33 - ANÁLISE DESCRITIVA DAS SEQUÊNCIAS INTRÔNICAS BRAF, GENE BRAF E GRCh 38.p 14.

Tipo_BRAF	n	média	DP	mínimo	Q1	mediana	Q3	máximo
BRAF	327	43,00	10,37	24,10	35,10	43,40	50,40	85,10
BRAF-207	145	42,46	11,36	24,10	33,55	42,90	50,10	85,10
BRAF-208	145	42,46	11,36	24,10	33,55	42,90	50,10	85,10
BRAF-209	92	43,14	9,93	24,20	35,87	44,35	50,55	66,20
BRAF-210	6	37,50	10,49	24,60	26,17	39,00	51,60	51,60
BRAF-211	125	42,63	11,61	24,10	33,55	42,90	50,10	85,10
BRAF-212	109	43,31	9,71	24,20	35,75	44,50	51,00	66,20
BRAF-214	217	42,97	10,76	24,10	35,05	43,50	50,75	85,10
BRAF-216	217	42,97	10,76	24,10	35,05	43,50	50,75	85,10
BRAF-217	4	46,80	5,89	41,70	41,70	46,80	51,90	51,90
Chr7	230	42,94	10,76	24,10	34,97	43,40	50,60	85,10

FONTE: Os autores (2022).

n = preditos, DP=desvio padrão, Q1= 1° quartil, Q3= 3° quartil.

FIGURA 22 – Resultado da predição in silico pela ferramenta Infernal.1.1.2.

```
cmscan -o sequencegene.out -tblout sequencegene.tbl -T 24 -
notrunc Rfam.cm sequencegene
```

```
Query: BRAF-207 [L=25613]
Description: intron 3:retained_intron
Hit scores:
```

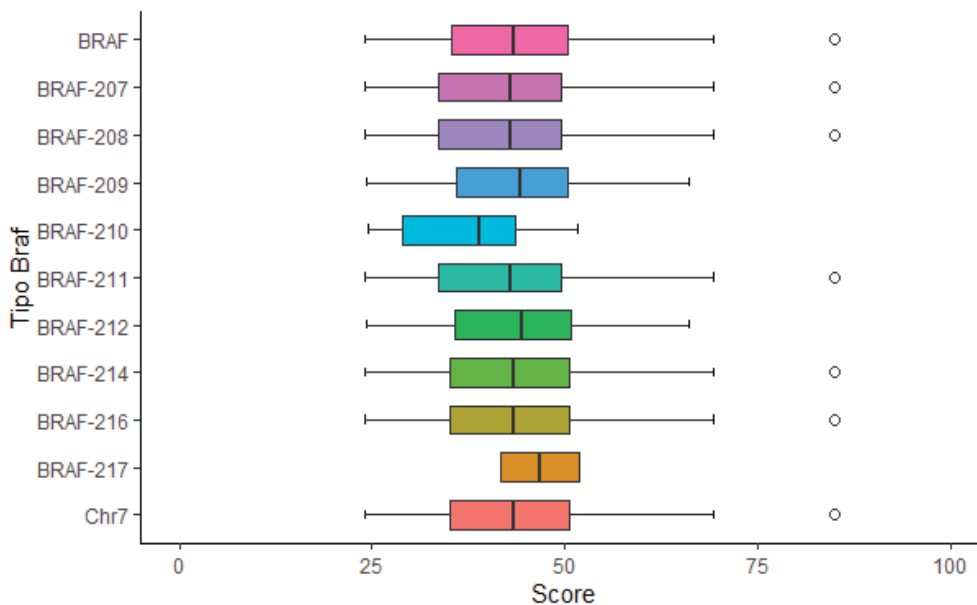
rank	E-value	score	bias	modelname	start	end	mdl	trunc	gc	des
(1) !	1.8e-11	55.5	0.0	Metazoa_SRP	6418	6530	+	cm	no	0.57 -
(2) !	2.3e-11	55.2	0.0	Metazoa_SRP	13327	13443	+	cm	no	0.56 -
(3) !	3.2e-11	54.7	0.0	Metazoa_SRP	19308	19455	+	cm	no	0.63 -
(4) !	1.2e-10	52.5	0.0	Metazoa_SRP	16133	16280	+	cm	no	0.58 -
(5) !	1.3e-10	52.5	0.0	Metazoa_SRP	9476	9622	+	cm	no	0.62 -
(6) !	2.1e-09	48.2	0.0	Metazoa_SRP	15999	16114	+	cm	no	0.56 -
(7) !	2.3e-09	48.0	0.0	Metazoa_SRP	24321	24205	-	cm	no	0.52 -
(8) !	1.2e-08	45.5	0.0	Metazoa_SRP	20225	20109	-	cm	no	0.56 -
(9) !	4.1e-08	43.5	0.0	Metazoa_SRP	9343	9457	+	cm	no	0.57 -
(10) !	6.4e-08	42.9	0.0	Metazoa_SRP	20090	19943	-	cm	no	0.57 -
(11) !	1.2e-07	53.0	0.0	mir-562	10930	10828	-	cm	no	0.33 -
(12) !	1.3e-07	41.8	0.0	Metazoa_SRP	13151	13293	+	cm	no	0.56 -
(13) !	1.6e-07	52.4	0.0	mir-562	12883	12984	+	cm	no	0.39 -
(14) !	3.6e-07	40.2	0.0	Metazoa_SRP	6550	6697	+	cm	no	0.60 -
(15) !	1.2e-06	38.4	0.0	Metazoa_SRP	11623	11765	+	cm	no	0.53 -
(16) !	6.8e-06	35.7	0.0	Metazoa_SRP	19012	19157	+	cm	no	0.55 -
(17) !	9.7e-06	35.1	0.0	Metazoa_SRP	13950	13834	-	cm	no	0.56 -
(18) !	1e-05	35.0	0.0	Metazoa_SRP	1572	1719	+	cm	no	0.63 -
(19) !	2.4e-05	33.7	0.0	Metazoa_SRP	1427	1551	+	cm	no	0.59 -
(20) !	3e-05	33.3	0.0	Metazoa_SRP	24185	24038	-	cm	no	0.57 -
(21) !	8.8e-05	31.7	0.0	Metazoa_SRP	18875	18991	+	cm	no	0.55 -
(22) !	0.00041	29.3	0.0	Metazoa_SRP	11487	11603	+	cm	no	0.53 -
(23) !	0.0015	25.2	0.0	Plant_SRP	6418	6531	+	cm	no	0.56 -
(24) !	2.4	25.7	0.1	mir-574	20696	20765	+	cm	no	0.49 -
(25) !	2.4	24.1	0.0	mir-562	9948	9854	-	cm	no	0.34 -

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: Listagem dos preditos do BRAF-207 destacada pelo retângulo em cor vermelho.

A predição in silico através do Infernal.1.1.2 apresenta duas formas de resultados devido a linha de comando específica da ferramenta. Onde a saída “*out*” resulta na listagem dos preditos (FIGURA 22). A segunda forma que a ferramenta apresenta dita “*tbl*” descreve os resultados mostrando não apenas a listagem dos preditos, mas o alinhamento múltiplo que ocorre entre a sequência do intrônica do BRAF e sequência alvo (FIGURA 23).

GRÁFICO 8 - Densidade das sequências intrônicas BRAF, gene BRAF e GRCh 38.p 14.



FONTE: Os autores (2022).

Foi utilizado o teste de Análise de Variância Simples (One-Way ANOVA), onde os dados receberam tratamento estatístico por meio do software *RStudio* versão 4.2.0, sendo adotado o nível de significância (α) de 5% como critério de decisão (GRÁFICO 8). Considerando as hipóteses da tabela ANOVA: H0: As médias são iguais ($\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_i$), H1: Existe pelo menos uma das médias diferentes (TABELA 33). Temos um valor=0.984>0,05, portanto não existem evidências estatísticas de que as médias sejam diferentes (TABELA 34)

TABELA 34 - Teste Anova.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F value	Pr(>F)
tipo_braf	10	330	33.04	0.286	0.984
Resíduos	1606	185259	115.35		

FONTE: Os autores (2022). Teste de análise de variância simples (One-WayANOVA).

Para as análises de normalidades dos resíduos foi utilizado o Teste de Shapiro-Wilk, tem como objetivo avaliar se uma distribuição é semelhante a uma distribuição normal. Tendo conhecimento então das hipóteses e analisando os resultados dos testes propostos, considerando-se o nível de 5% de significância rejeitamos a hipótese nula. Logo, há evidências para afirmarmos que os erros não seguem uma distribuição normal. O p-valor do teste de Kruskal-Wallis de 0.9277 >0,05 nos leva a não rejeitar a hipótese nula de que os grupos são semelhantes entre si.

A análise da densidade do ncRNAs preditos nas sequências em estudo (TABELA 1), de modo geral, observou-se uma diferença significativa na quantidade total de preditos conforme a família de RNA pertencente, como pudemos notar o ncRNAs Metazoa_SPR apresentou 1441 no total em comparação com o ncRNAs Plant_SPR com 40 e mir-562. Dentro da coleção das famílias de RNA é importante ressaltar que dentro dessas famílias há vários alinhamentos de sequência, estruturas secundárias de consenso e modelos de convivência.

Na tabela 34 houve a variabilidade no conjunto de dados do ncRNAs Metazoa_SRP, mir-1255, mir-544, mir-562 e Pant_SRP, porque o desvio padrão maior do que nos ncRNAs CRISPR-DR45, CRISPR-DR62, mir-574, mir-6, plasmodium_snoR14, plasmodium_snoR21, snopsi28S-3316, snoR07, snoR13 e U6, apresentaram desvio padrão igual a 0, onde os valores da média, da mediana, do Quartil 1 e Quartil 3 se mantiveram iguais conforme os valores atribuídos para cada família (TABELA 35).

TABELA 35 - Análise descritiva das sequências dos ncRNAs preditos.

Target_name	n	méd a	DP	mínimo	Q1	mediana	Q3	máximo
CRISPR-DR45	7	24,70	0	24,7	24,7	27,7	24,7	24,7
CRISPR-DR62	7	24,70	0	24,7	24,75	24,7	24,7	24,7
Metazoa_SRP	1441	43,65	9,35	24,2	37,2	44,1	50,6	68,7
mir-1255	14	68,00	1,45	66,6	66,6	68	69,4	69,4
mir-544	14	41,10	15,46	26,2	26,2	41,1	56	56
mir-562	38	42,49	11,75	24,1	31,5	47,7	52,4	53
mir-574	7	25,70	0	25,7	25,7	25,7	25,7	25,7
mir-6	7	25,60	0	25,6	25,6	25,6	25,6	25,6
Plant_SRP	40	27,13	3,06	24,2	25,2	25,8	27,6	32,8
plasmodium_snoR1 4	7	25,40	0	25,4	25,4	25,4	25,4	25,4
plasmodium_snoR2 1	7	24,20	0	24,2	24,2	24,2	24,2	24,2
snopsi28S-3316	7	25,10	0	25,1	25,1	25,1	25,1	25,1
snoR07	7	27,60	0	27,6	27,6	27,6	27,6	27,6
snoR13	7	27,40	0	27,4	27,4	27,4	27,4	27,4
U6	7	85,10	0	85,1	85,1	85,1	85,1	85,1

FONTE: Os autores (2022).

n = preditos, DP=desvio padrão, Q1= 1° quartil, Q3= 3° quartil.

Como os critérios exigidas pela ANOVA não foram atendidas, foi realizado Teste de Kruskal-Wallis é o método não-paramétrico alternativo à ANOVA, onde pressupõem a hipótese de normalidade dos dados (H0), os grupos são semelhantes ou hipótese (H1), pelo menos um grupo difere dos demais. Temos um p-valor= $<2e-16 < 0,05$, portanto existem evidências estatísticas de que as médias sejam diferentes (TABELA 36).

TABELA 36 - Teste de análise de variância simples (ONE-WAY ANOVA).

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F value	Pr (>F)
Target_name	14	51022	3644	43,39	$<2e-16^{***}$
Resíduos	1602	134568	84		

FONTE: Os autores (2022).

Já o teste para a normalidade dos resíduos fez uso do teste de Shapiro-Wilk que tem como objetivo avaliar se uma distribuição é semelhante a uma distribuição normal. E, de fato, pelo teste Shapiro-Wilk evidenciamos que este

grupamento amostral é diferente de uma distribuição normal, como resultado o $W = 0,988896$ e $p = 9.717e-10$.

Fizemos o uso do teste de Kruskal-Wallis que é o método não-paramétrico alternativo à ANOVA, onde o p-valor $p\text{-value} < 2.2e-16$ do teste de Kruskal-Wallis foi menor que um nível de significância de 0,05, e nos leva a rejeitar a hipótese nula de que os grupos são semelhantes e sim os RNAs curtos não codificantes apresentam diferenças significativas.

A predição *in silico* de cada transcrito do gene BRAF resultou em ampla listagem de RNA não codificador de proteínas nos transcritos do gene BRAF, resultou em 15 RNAs não codificantes, dentre eles os microRNAs, cujo objetivo principal do presente estudo, e identificamos os mir-1255, mir-544, mir-574, mir-6.

O teste não-paramétrico de comparação múltipla de Nemenyi, foi feito para avaliar os p-valores das comparações duas a duas, onde o teste apresentou evidências de diferença significativa entre os grupos. Os grupos de ncRNAs preditos nas sequências intrônicas do gene BRAF, do gene BRAF e GRCh 38.p 14, verificou-se que a família CRISPR-DR45 e CRISPR-DR62 são diferentes do ncRNAs Metazoa_SPR, mir-544 e mir-574, mas não de mir-1255 e os demais ncRNAs analisados. Já o ncRNAs Metazoa_SPR denominado RNA de partícula de reconhecimento de sinal, integra o complexo ribonucleoproteína de partícula de sinal (SPR), que identifica o peptídeo sinal e se liga ao ribossomo inibindo assim a síntese de proteínas (LIU *et al.*, 2003). Este por sua vez, comparado com os ncRNAs: mir-574, mir-6, Plasmodium_snoR14, Plasmodium_snoR21, snopsi28S-316, snoR07, snoR13 e U6 houve diferença. Além disso, o mir-544 e o mir-562 diferem dos microRNAs mir-574 e mir-6, Plasmodium_snoR14, Plasmodium_snoR21, snopsi28S-316, snoR07, snoR13 e U6. O microRNA mir-562 não é diferente do Planst_SRP, já o mir-1255 difere apenas do mir-544 (FIGURA 24).

Os mir-544, mir-562 e o Metazoa_SRP foram os únicos que apresentaram diferença significativa aos serem comparados com snRNA U6 é um componente não codificante de pequeno RNA nuclear, formado por um complexo RNA-proteína que interage com outros snRNPs resultando pré-miRNA não modificado e com outras proteínas forma-se o complexo molecular RNA-proteína que catalisa a retirada de íntrons do pré-mRNA (BROW e GUTHRIE, 1988).

As diferenças ou semelhanças entre os RNA não codificantes (ncRNAs), é porque são formados por famílias que apresentam características específicas que evoluíram de ancestral comum, onde ao longo do tempo sofreram modificações dando origem a outras famílias. Sendo assim, o banco de dados Rfam (Item 3.2.1) possibilita o acesso a essas famílias de ncRNAs onde são representadas por múltiplos alinhamentos de sequências e modelo de covariância (CM) usados para a detecção de homólogos, semelhantes, mas não iguais (KALVARI *et al.*, 2018).

FIGURA 24 - Teste de comparação múltiplos de Nemenyi.

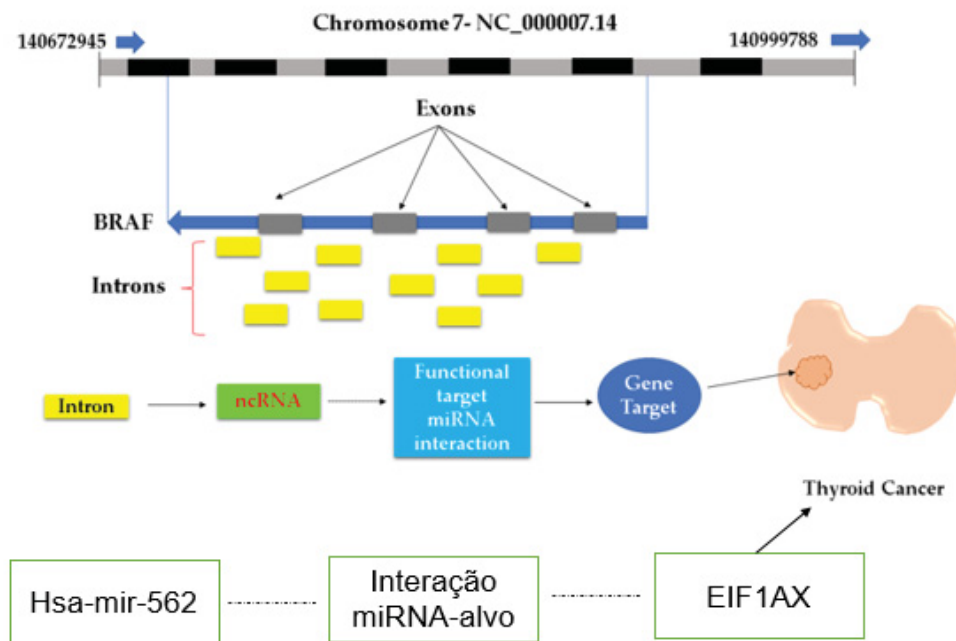
	CRISPR-DR45	CRISPR-DR62	Metazoa_SRP	mir-1255	mir-544	mir-562	mir-574	mir-6	Plant_SRP	plasmodium_snoR14
CRISPR-DR62	1.00000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metazoa_SRP	0.00059	0.00059	-	-	-	-	-	-	-	-
mir-1255	7.0e-11	7.0e-11	2.0e-07	-	-	-	-	-	-	-
mir-544	0.03680	0.03680	1.00000	0.00057	-	-	-	-	-	-
mir-562	0.00350	0.00350	1.00000	1.8e-05	1.00000	-	-	-	-	-
mir-574	1.00000	1.00000	0.00220	4.0e-10	0.07856	0.01034	-	-	-	-
mir-6	1.00000	1.00000	0.00186	3.2e-10	0.07137	0.00900	1.00000	-	-	-
Plant_SRP	1.00000	1.00000	1.4e-13	1.7e-13	0.00056	5.2e-09	1.00000	1.00000	-	-
plasmodium_snoR14	1.00000	1.00000	0.00144	2.2e-10	0.06162	0.00728	1.00000	1.00000	1.00000	-
plasmodium_snoR21	1.00000	1.00000	0.00028	2.6e-11	0.02353	0.00187	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
snopsi285-3316	1.00000	1.00000	0.00085	1.1e-10	0.04544	0.00471	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
snoR07	1.00000	1.00000	0.01003	3.4e-09	0.17993	0.03541	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
snoR13	1.00000	1.00000	0.00740	2.2e-09	0.15309	0.02770	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
U6	3.5e-08	3.5e-08	0.00138	1.00000	0.01383	0.00471	1.3e-07	1.1e-07	1.6e-12	8.6e-08
	plasmodium_snoR21	snopsi285-3316	snoR07	snoR13						
CRISPR-DR62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metazoa_SRP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mir-1255	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mir-544	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mir-562	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mir-574	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mir-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Plant_SRP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
plasmodium_snoR14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
plasmodium_snoR21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
snopsi285-3316	1.00000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
snoR07	1.00000	1.00000	-	-	-	-	-	-	-	-
snoR13	1.00000	1.00000	1.00000	-	-	-	-	-	-	-
U6	1.7e-08	5.1e-08	6.8e-07	4.8e-07	-	-	-	-	-	-

FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: Os exemplos de ncRNAs que apresentaram diferença significativa pelo teste de Nemenyi estão contidos nos retângulos em cor (vermelha). U6 = RNA, U6 Small Nuclear 1; Metazoa_SRP = Metazoan signal recognition particle RNA; mir-1255 = microRNA mir-1255; mir-562 = microRNA 2; mir-544 = microRNA 544; mir-574 = microRNA 574; mir-6 = microRNA 6;

Como o microRNA mir-562 foi previsto na grande maioria das sequências em estudo (APENDICE 3) onde propomos uma nova rede putativa miRNA:mRNA que pode levar a um novo caminho para estudos funcionais, a inferência de alvos do mir-562, o que resultou em 122 mRNA alvos, dentre estes destacamos o gene EIF1AX (FIGURA 25). Recentemente, o estudo do Atlas do Genoma do Câncer (TCGA) em uma grande coorte de carcinomas papilíferos de tireoide (PTC) relatou mutações do gene EIF1AX nesses tumores (ROMAN *et al.*, 2017).

FIGURA 25 - Painel da interação mRNA alvo do HSA-mir-652.



O gene EIF1AX está localizado no cromossomo X e codifica um fator de iniciação da tradução eucariótica 1A (eIF1A). A proteína promove a formação do complexo 43S estabilizando a ligação do complexo ternário tRNA (Met-tRNA) do iniciador de eIF2-GTP-metionil à subunidade 40S e, juntamente com outro fator de iniciação da tradução, está envolvido em um sofisticado sistema de varredura responsável por localizar com precisão o códon de início adequado no mRNA em eucariotos. eIF1A é o ortólogo eucariótico do fator de iniciação da tradução bacteriana IF1, com sequências entre 32 e 95 aminoácidos que constituem o domínio de ligação ao RNA que são homólogos ao IF1.

Domínios adicionais em eIF1, ausentes em IF1, são um domínio helicoidal adjacente ao enrolamento de ligação de ARN e caudas N- e C-terminais estruturadas e com carga elevada (NTT, CTT). A cauda C-terminal é principalmente carregada negativamente, mas contém alguns resíduos hidrofóbicos no final que foram propostos para estar envolvidos em interações proteína-proteína. Mutações de resíduos na superfície de ligação ao ARN de eIF1A foram relatadas como causadoras de defeitos na formação do complexo de pré-iniciação 43S e 48S. Antes do estudo TCGA de PTC, mutações no gene EIF1AX foram relatadas em

melanomas uveais. Um estudo recente também relatou mutações EIF1AX em carcinomas anaplásicos da tireoide (ATC) (AGRAWAL *et al.*, 2018).

No entanto, a prevalência dessas mutações em outros tipos comuns de câncer de tireoide, como o carcinoma folicular, e em nódulos tireoidianos benignos permanece desconhecida. Além disso, as características histopatológicas dos tumores da tireoide que possuem mutações EIF1AX não estão bem caracterizadas.

Analisados as sequências dos transcritos não codificantes de proteínas no gene BRAF, o RNA, U6 Small Nuclear 1; Metazoan signal recognition particle RNA; mir-1255; mir-562, mir-544 e mir-574. Anbalagan e cols (2014) observaram miR-562 aumenta a formação de tubos de células endoteliais influenciando no aumento dos fatores secretados angiogênicos de células tumorais de mama MCF-7 (ANBALAGAN *et al.*, 2014). O miR-455-5p pode interagir com o inibidor de quinase dependente de ciclina 1B é um inibidor de enzima que em humanos é codificado pelo gene CDKN1B influenciando no processo do ciclo celular e miR-1255a pode regular proteínas do fator de transcrição, que atuam como mediadores da transdução de sinal TGF- β a SMAD4 para participar da via de sinalização de TGF- β , foi descrito no estudo identificação de exossomal miR-455-5p e miR-1255a como alvos terapêuticos para câncer de mama (XANG *et al.*, 2020).

No estudo de Zhang e cols (2020) descreveram o mir-574 ativado por NF- κ B promove múltiplos fenótipos malignos e metastáticos direcionando o bnip3 no carcinoma da tireoide, identificaram a sinalização NF- κ B/mir-574 pode reduzir a agressividade do câncer de tireoide, mas, o mir-574, regulado diretamente pelo NF-KB/p65, promove a tumorigênese do câncer de tireoide através da inibição da via BNIP3/AIF (ZHANG *et al.*, 2020). Pois BNIP3 e AIF cooperam para induzir apoptose e cavitação durante a morfogênese epitelial, AIF também regulou a expressão do BNIP3 através da produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio e consequente estabilização do HIF-2 α (QI *et al.*, 2012). Estudos mostraram que a regulação positiva do mir-544a pode estar crucialmente envolvida na repressão translacional de GKN1, sugerindo assim seu papel potencial como biomarcador e alvo terapêutico em pacientes com câncer gástrico (STELLA DI STADIO *et al.*, 2019).

Záveský e cols (2022) no prospectivo e multicêntrico de descoberta de biomarcadores, analisamos a expressão de pequenos RNAs não codificantes (principalmente microRNAs) no plasma perfil de RNA não codificante pequeno no

câncer de mama: snRNA U6 no plasma, mir-451a e mir-548b-5p como novos biomarcadores diagnósticos e prognósticos, indicaram que o snRNA U6 e o mir-548b-5p podem ter funções pró-oncogênicas, enquanto o mir-451a pode atuar como supressor tumoral no câncer de mama (ZÁVESKÝ *et al.*, 2022).

A partícula de reconhecimento de sinal (SRP) desempenha um papel central na entrega de proteínas secretoras e de membrana clássicas ao retículo endoplasmático (ER), a partícula de reconhecimento de sinal medeia o direcionamento pós-traducional em eucariotos (ABELL *et al.*, 2004). Desde a descoberta dos microRNAs no processo de desregulação da expressão de células tumorais descrito por Calin e cols (2002), observaram a diminuição da expressão dos miR-15 e miR-16 em pacientes com leucemia linfoblástica crônica, pois apresentam papel fundamental na regulação da expressão gênica, no processamento da formação da célula neoplásica onde estão relacionados a causa de várias doenças (CALIN *et al.*, 2002).

Os achados clínicos de doença nodular neste grupo de estudo submetidos à punção aspirativa por agulha fina (PAAF) foram classificados como “benignos”, assim como os resultados da anatomia patológica com diagnóstico compatível com lesão benigna, seguidos daqueles tireoidectomizados por suspeita de malignidade. A prevalência de nódulos repuncionados foi na categoria Atipia de Significado Indeterminado ou Lesão Folicular de Significado Indeterminado (AUS\SFN). Consideremos a importância de estudos descritivos que tendem a compreender as principais características clínicas que afetam a doença nodular da tireoide, bem como, o reconhecimento dos mecanismos pós-transcricionais regulados por esses pequenos RNA, contribuem no diagnóstico clínico, corroborando na decisão terapêutica não só em casos de nódulos tireoidianos indeterminados, como no entendimento da doença nodular de modo geral.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos sobre a relação microRNA e câncer expandiu-se notavelmente, considerando a estabilidade para prognóstico em várias doenças, sinalizando para mecanismos envolvidos não só no câncer de tireoide, mas em outros tipos de cânceres. O presente estudo proporcionou a identificação *in silico* de alguns

micoRNAs com alvo provável envolvidos na via de sinalização intracelular do desenvolvimento do câncer de tireoide. Destacamos o miR-562 onde foram observados vários mRNA alvos (APENDICE 4), que desempenham um papel funcional importante de biomarcadores, para a estratificação e previsão de prognóstico e conduta clínica, proporcionando seguimento clínico personalizado.

A análise descritiva realizado com as 449 amostras de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de nódulos de tireoide com categoria citopatológicas do Sistema Bethesda provenientes do ambulatório do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas do Paraná – SEMPR, proporcionou descrever o perfil das características clínicas dos casos de citopunções no Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná – SEMPR\CHC-UFPR. Além disso, esses dados podem auxiliar no mapeamento do seguimento clínico dos pacientes com recidiva ou não durante o tratamento, bem como, a importância das informações contidas nos prontuários dos pacientes.

- ✓ Identificar microRNAs nas regiões intrônicas dos não transcritos do gene BRAF: Realizamos a identificação in silico dos microRNAs mir-1255, mir-544, mir-574, mir-562, mir-6, contidos nas regiões intrônicas do gene BRAF (BRAFF-207, BRAFF-208, BRAFF-209, BRAFF-210, BRAFF-211, BRAFF-212, BRAFF-214, BRAFF-216, BRAFF-217, BRAFF-218. Identificamos outros RNA não codificantes proteínas como: CRISPR-DR45, CRISPR-DR62, Metazoa_SPR Plant_SPR, plasmodium_snoR14, plasmodium_snoR21, snopsi28S-3316, snoR07, snoR13 and U6. Com exceção do BRAFF-218 que não houve preditos e vimos que há diferença significativas entre eles, destacamos a importância de estudos in silico que fornecem assinaturas de RNA curtos não codificantes para serem validados experimentalmente. Destacamos o mir-562 onde inferimos RNAm alvos dentre estes (APENDICE 3), destacou-se o EIF1AX (eukaryotic translation initiation factor 1A X-linked), este por sua vez, estudo recente também relatou mutações EIF1AX em carcinomas anaplásicos da tireoide (ATC) (AGRAWAL *et al.*, 2018).

- ✓ Quantificar o número de citopunções de tireoide realizadas no Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Complexo Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná SEMPR/CHC-UFPR/Ebserh: Realizou-se a análise descritiva dos achados citológicos de 449 citopunções de tireoide, onde observamos a prevalência dos nódulos tireoidianos no sexo feminino.
- ✓ Analisar os resultados das citopunções de tireoide quanto ao Sistema classificatório de Bethesda e quantificar os resultados pertencentes a cada categoria (I, II, III, IV, V e IV): Analisou-se e quantificou-se os dados das citopunções e observou a frequência na categoria Bethesda II, refletindo na maior quantidade de nódulos repuncionados.
- ✓ Analisar o perfil das características indicações clínicas das citopunções: Analisou-se as indicações clínicas onde a maioria dos casos foi bócio, bem como se havia PAAF anterior, ou se o nódulo era indeterminado. Análise dos achados ultrassonográficos e citopatológicos das citopunções: Realizou-se o perfil das características clínicas de todas as 449 citopunções de tireoide variáveis: a classificação Bethesda, idade e sexo; a quantidade de repunções, qual a classificação Bethesda dos casos repuncionados; se houve revisão de lamina da citopunção e qual o diagnóstico resultante da revisão; observou-se os casos e tireoidectomia e se a remoção cirúrgica foi total ou parcial, se o diagnóstico do anátomo patológico (AP) era maligno ou benigno; o estadiamento do tumor, os anátomos patológicos que apresentam imuno-histoquímica com diagnóstico e a revisão do AP com diagnóstico.
- ✓ Integrar os achados ultrassonográficos e citológicos dos pacientes com lesões indeterminadas de tireoide: Notou-se que a maioria dos casos indeterminados submetidos a tireoidectomia seja parcial ou total tinham o anátomo patológico condizente para benigno, compatível para bócio.
- ✓ Quantificar as repunções e o diagnóstico Bethesda: Observou-se que os nódulos de tireoide da categoria Bethesda II foram os mais repuncionados dentro a totalidade do grupamento.
- ✓ Descrever os casos de revisão de lâmina de citopunção: Realizou-se ou recrutamento de 81 lâminas de punção aspirativa por agulha fina (PAAF), as quais foram revisadas pela patologista do trabalho, para confirmação do diagnóstico e a foto da microscopia.

- ✓ Quantificar as tireoidectomias realizadas no grupo de pacientes estudados e associar os diagnósticos anatomopatológicos dos nódulos tireoidianos com os diagnósticos citológicos dos mesmos nódulos na classificação Bethesda: Observou-se na análise descritiva que a classificação Bethesda II (benigna) houve maior indicativo de cirurgias, refletindo o maior do número de casos em comparação aos demais nódulos classificados pelo Sistema de Bethesda, sendo na maioria dos nódulos submetidos a cirurgia o anátomo patológico foi benigno.

5.1 LIMITAÇÃO DO ESTUDO

No decorrer no presente estudo foi observado algumas limitações que divergiram e nos remetem a importância do preenchimento do prontuário eletrônico. O Sistema de Informação Hospitalar (SIH) utilizado para o recrutamento das informações das punções aspirativas por agulha fina (PAAF), como dados citológicos e ultrassonográficos, foi um divisor de águas para análise descritiva. As vantagens de poder ter acesso à informação do prontuário eletrônico é prático, acessível e ágil, porém, se não há o preenchimento completo das informações contidas no prontuário impresso ou na hora que o médico insere as informações do paciente na rotina ambulatorial, isso dificulta o acesso à informação, divergindo dados que as vezes pode divergir um dado para mais ou para menos.

Muitos casos não tinham dados do resultado do ultrassom, ou da citologia completa, na análise descritiva tivemos dificuldades pois quando realizamos o mapeamento das citopunções vimos que havia casos que não preenchiam na sua totalidade, pois pacientes com três PAAFs apenas havia dados completos de uma PAAF. O presente estudo sugeri que haja atenção no preenchimento dos prontuários e siga veemente a sua totalidade, bem como a padronização das informações do ultrassom e da citologia, pois a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é guiada por ultrassom. Também sugerimos a se pensar na possibilidade da qualidade e na quantidade das lâminas dos esfregaços citológicos resultantes das citopunções e numa análise microscópica prévia no próprio ambulatório.

5. 2 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O presente trabalho de doutorado, evidenciou a importância da investigação clínica dos nódulos tireoidianos bem como a conduta terapêutica a ser tomada, como pudemos observar a maioria das cirurgias de tireoide vieram com anátomo patológico para benignidade, como também o estudo revelou que nas regiões intrônicas do gene BRAF podem proporcionar indícios de função regulatória pois no caso do mir-562 um dos mRNAs alvo é o gene EIF1AX que está envolvido do processo de tumorigênese do câncer de tireoide. Sendo assim, os resultados possibilitaram o desenvolvimento de uma linha sobre a inferência de um “*Proling genic*”, ligados ao processo de câncer de tireoide, pois além da mutação BRAF^{V600E} podemos utilizar outros genes não só para carcinoma papilífero de tireoide, mas para o carcinoma folicular, carcinoma medular e carcinoma anaplásico. Importante lembrar que está em andamento pensando no Pós-doutorado.

REFERÊNCIAS

ABELL, BM.; POOL, M.R.; SCHLENKER, O.; SINNING, I.; HIGH, S. A partícula de reconhecimento de sinal medeia o direcionamento pós-traducional em eucariotos. O jornal **EMBO**, v. 23, n. 14, p. 2755-2764, 2004.

AGRAWAL, N. et al. Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. **Cell**, v. 159, n. 3, p.676-690, 2014.

ALI, S. Z. Thyroid cytopathology: Bethesda and beyond. **Acta. Cytol**, v. 55, n. 1, p. 4-12, 2010.

ALI, S. Z.; CIBAS, E. S. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology II. **Acta. Cytol**, v. 60, n. 5, p. 397-398, 2016.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMANL, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol**, p. 403–410, 1990.

ALTUVIA, S. Identification of bacterial small non-coding RNAs; experimental approaches. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, p. 257-261, 2007.

ALVAREZ-NUÑEZ, F.; BUSSAGLIA, E.; MAURICIO, D.; YBARRA, J.; VILAR, M.; LERMA, E.; DE LEIVA, A.; MATIAS-GUIU, X. Thyroid Neoplasia Study Group (2006). PTEN promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 16, n. 1, p. 17–23, 2006.

ANBALAGAN, D.; YAP, G.; YUAN, Y.; PANDEY, V.K.; LAU, W.H, et al. Annexin-A1 Regulates MicroRNA-26b* and MicroRNA-562 to Directly Target NF- κ B and Angiogenesis in Breast Cancer Cells. **Plos One**, v. 9, n. 12, p. e114507, 2014.

ASIOLI, S.; ERICKSON, L.A.; RIGHI, A. et al. Carcinoma pouco diferenciado da tireóide: Validação da proposta de Turin e análise da expressão de IMP3. **Mod Pathol**. v, 23, p. 1269–1278, 2010.

AZHIKINA, T. L.; IGNATOV D. V., SALINA, E. G.; FURSOV, M. V.; KAPRELYANTS, A. S. Role of Small Noncoding RNAs in Bacterial Metabolism. **Biochemistry**, Moscow, v. 80, n. 13, p. 1633-1646, 2015.

BALOCH, Z.W.; LIVOLSI, V.A.; ASA, S.L.; ROSAI, J.; MERINO, M.J.; RANDOLPH, G.; VIELH, P.; DEMAY, R.M.; SIDAWY, M.K.; FRABLE, W.J. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. **Diagn Cytopathol**, v. 36, n. 6, p. 425-437, 2008.

BALOCH, Z.W.; LIVOLSI, V.A. Fine-needle aspiration of the thyroid: today and tomorrow. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 22, n. 6, p. 929-939, 2008.

BALOCH, Z. W.; ASA, S. L.; BARLETTA, J. A.; GHOSSEIN, R. A.; JUHLIN, C. C.; JUNG, C. K.; LIVOLSI, V. A.; PAPOTTI, M. G.; SOBRINHO-SIMÕES, M.; TALLINI, G.; METE, O. Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. **Endocrine pathology**, v. 33, n. 1, p. 27–63, 2022.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004.

BARLETTA, J. A.; NOSÉ, V.; SADOW, P. M. Genomics and Epigenomics of Medullary Thyroid Carcinoma: From Sporadic Disease to Familial Manifestations. **Endocrine pathology**, v. 32, n. 1, p. 35–43, 2021.

BIBLE, K.C.; KEBEBEW, E.; BRIERLEY, J.; BRITO, J.P.; CABANILLAS, M.E.; CLARK, T.J.; J.R, DI CRISTOFANO. A.; FOOTE, R.; GIORDANO, T.; KASPERBAUER, J., NEWBOLD, K.; NIKIFOROV, Y.E, RANDOLPH, G.; ROSENTHAL, M.S.; SAWKA, A.M.; SHAH, M.; SHAHA, A.; SMALLRIDGE, R.; WONG-CLARK, C.K. Diretrizes da American Thyroid Association para Tratamento de Pacientes com Câncer Anaplásico de Tireóide. **Thyroid: jornal oficial da American Thyroid Association**, v. 31, n. 3, p. 337–386, 2021.

BONGIOVANNI, M.; KRANE, J.F.; CIBAS, E.S.; FAQUIN, W.C. The atypical thyroid fine-needle aspiration: past, present, and future. **Cancer. Cytopathol**, v. 120, n. 2, p. 73-86, 2011.

BONGIOVANNI, M.; SPITALE, A.; FAQUIN, W.C.; MAZZUCHELLI, L.; BALOCH, Z.W. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a meta-analysis. **Acta. Cytol**, v. 56, n. 4, p. 333-339, 2012.

BOLIN J. Thyroid Follicular Epithelial Cell-Derived Cancer: New Approaches and Treatment Strategies. **Journal of Nuclear Medicine Technolog**. v.49, n. 3, 199–208, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: **INCA**, 2022.

BRENNECKE, J.; STARK, A.; RUSSELL, R.B.; COHEN, S.M. Principles of microRNA-target recognition. **PLoS. Biol**, v. 3, n. 3, p. e85, 2005.

BERKAN, T.K.; REEDER, J.E.; LOPEZ, P.A.JR.; GORMAN, K.M.; WHEELESS, L.L. JR. A protocol for Papanicolaou staining of cytologic specimens following flow analysis. **Cytometry**. 1986.

BRIERLEY, J.D.; GOSPODAROWICZ, M.K.; WITTEKIND, C (eds). Classificação TNM de tumores malignos, 8 edn. Wiley-Blackwell, **Hoboken**, 2017.

BROSIUS, J.; RAABE, C. A. What is an RNA? A top layer for RNA classification. **RNA. Biology**, v. 13, n. 2, p. 140-144, 2016.

BROW, DA.; GUTHRIE, C. "Spliceosomal RNA U6 é notavelmente conservado de levedura a mamíferos". **Nature**. v. 334, n. 6179, p. 213–8, 1988.

BRUNI, R.; CESARONE, F.; SCOZZARI, A.; TARDELLA, F. 2013. "No arbitrage and a linear portfolio selection model," *Economics Bulletin*, **Access Econ**, v. 33, n. 2, p. 1247-1258, 2013.

BUERMANS, H.P.; ARIYUREK, Y.; VAN, OMMEN, G.; DEN, DUNNEN, J.T.T.; HOEN, P.A. New methods for next generation sequencing based microRNA expression profiling. **BMC. Genomics**, v. 11, p. 716, 2010.

CALIN, G. A.; DUMITRU, C. D.; SHIMIZU, M.; BICHI, R.; ZUPO, S.; NOCH, E.; ALDLER, H.; RATTAN, S.; KEATING, M.; RAI, K.; RASSENTI, L.; KIPPS, T.; NEGRINI, M.; BULLRICH, F; CROCE, C.M. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 99, n. 24, p. 15524-15529, 2002.

CANTARA, S.; CAPEZZONE, M.; MARCHISOTTA, S.; CAPUANO, S.; BUSONERO, G.; TOTI, P.; DI. SANTO, A.; CARUSO, G.; CARLI, A.F, BRILLI, L.; MONTANARO, A.; PACINI, F. Impact of proto-oncogene mutation detection in cytological specimens from thyroid nodules improves the diagnostic accuracy of cytology. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 95, n. 3, p. 1365-1369, 2010.

CARVALHO, G.A.; GRAF, H. Anaplastic thyroid carcinoma. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 49, n. 5, 2005.

CARLING, T.; UDELSMAN, R. Thyroid cancer. *Annual review of medicine*, 65, 125–137, 2014.

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

CIBAS, E. S.; ALI, S. Z. THE 2017 BETHESDA SYSTEM FOR REPORTING THYROID CYTOPATHOLOGY. **THYROID**, V. 27, N.11, P,1341-1346, 2017.

CEOLIN, L.; DUVAL, M.; BENINI, A.F.; FERREIRA, C.V.; MAIA, A.L. Carcinoma medular de tireoide além da cirurgia: avanços, desafios e perspectivas. **Câncer endócrino**, v. 26, n. 9, p. R499–R518, 2019.

COLIN, I. M.; DENEFF, J. F.; LENGELÉ, B.; MANY, M. C.; GÉRARD, A. C. Recent insights into the cell biology of thyroid angiofollicular units. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 2, p. 209–238, 2013.

COTE, G. J.; GRUBBS, E. G.; HOFMANN, M. C. Thyroid C-Cell Biology and Oncogenic Transformation. Recent results in cancer research. *Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer*, n. 204, p. 1–39, 2015.

COHEN, R. N.; DAVIS, A. M. Management of Adult Patients With Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. **JAMA**, v. 317, n. 4, p. 434–435, 2017.

COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNELL, M. **Biologia Molecular – Princípios e Técnicas**, 1ªed. Artmed, 2012.

CHEN, C.; RIDZON, D.A.; BROOMER, A.J.; ZHOU, Z.; LEE, D.H.; NGUYEN, J.T.; BARBISIN, M.; XU, N.L.; MAHUVAKAR, V.R.; ANDERSEN, M.R.; LAO, K.Q.; LIVAK, K.J.; GUEGLER, K.J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic. Acids. Res**, v. 33, n. 20, p. e179, 2005.

CHO, W.C. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 42, n. 8, p. 1273-81, 2010.

CLARK, P. M.; LOHER, P.; QUANN, K.; BRODY, J.; LONDIN, E. R.; RIGOUTSOS, I. Argonaute CLIP-Seq reveals miRNA targetome diversity across tissue types. **Sci. Rep.**, v. 4, p. 5947, 2014.

CRIPPA, S.; MAZZUCHELLI, L.; CIBAS, E.S.; ALI, S.Z. The Bethesda System for reporting thyroid fine-needle aspiration specimens. **Am. J. Clin. Pathol**, v. 134, n. 2, p. 343-344; author reply 345, 2010.

DAHIA, P.L. PTEN, a unique tumor suppressor gene. **Endocr Relat Cancer.** v. 7, n. 2, p. 115-29, 2000.

DELELLIS, R.A.; HEITZ, P.U.; ENG, C. Patologia e Genética de Tumores de Órgãos Endócrinos. Classificação de Tumores da Organização Mundial da Saúde, **IARC Press**, Lyon, 2004.

DETTMER, M. S.; SCHMITT, A.; KOMMINOTH, P.; PERREN, A. Poorly differentiated thyroid carcinoma: An underdiagnosed entity. Gering differenzierte Schilddrüsenkarzinome: Eine unterdiagnostizierte Entität. **Der Pathologe**, 41 (Suppl 1), 1–8, 2020.

DUMONT, J.E.; VASSART, G. Thyroid gland metabolism and the action of TSH. **Endocrinology.** n. 1, p. 311-29. 2, 1979.

DUH, Q.Y.; GROSSMAN, R.F. Fatores de crescimento da tireoide, vias de transdução de sinal e oncogenes. **As clínicas cirúrgicas da América do Norte**, v. 75, n. 3, p. 421-437.

ENEWOLD, L.; ZHU, K., RON, E. et al. Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v. 18, n. 3, p. 784-791, 2009.

FARAZI, T.A.; HOELL, J.I.; MOROZOV, P.; TUSCHL, T. MicroRNAs in human cancer. **Adv. Exp. Med. Biol**, v. 774, p. 1-20, 2013.

FERRACIN, M.; NEGRINI, M. Micromarkers 2.0: an update on the role of microRNAs in cancer diagnosis and prognosis. **Expert Rev Mol Diagn**. v. 15, n. 10, p. 1369-81, 2015.

FISHER, S. B.; PERRIER, N. D. The incidental thyroid nodule. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 2, p. 97–105, 2018.

FIELD, A. **Descobrimdo Estatísticas Usando SPSS**. 3ª Edição, Sage Publications Ltd., Londres, 2009.

FU, G.; POLYAKOVA, O.; MACMILLAN, C.; RALHAN, R.; WALFISH, P.G. Programmed Death - Ligand 1 Expression Distinguishes Invasive Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma from Noninvasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-like Nuclear Features. **Pathology. Research. International**, v. 18, p. 50-55 2017.

FRASER, DAS. Introdução a Bartlett (1937) Propriedades de Suficiência e Testes Estatísticos. In: Kotz, S., Johnson, NL (eds) **Descobertas em Estatística. Série Springer em Estatística. Springer**, Nova York, NY, 1992.

GARCIA, AC.; CAVALCANTI, TC.; COLAÇO, LM.; GRAF, H. Sinalização da biossinalização do câncer de tireoide. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, [S. l.], v. 11, n. 3, pág. e41811326619.

GEORGAKILAS, G.; VLACHOS, I.S.; ZAGGANAS, K.; VERGOULIS, T.; PARASKEVOPOULOU, M.D.; KANELLOS, I.; TSANAKAS, P.; DELLIS, D.; FEVGAS, A.; DALAMAGAS, T.; HATZIGEORGIU, A.G. DIANA-miRGen v3.0: accurate characterization of microRNA promoters and their regulators. **Nucleic. Acids. Res**, v. 44(D1): D190-5, 2015.

GERALDO, M.V; FUZIWARA, C.S; FRIGUGLIETI, C.U; COSTA, R.B; KULCSAR, M.A; YAMASHITA, A.S; KIMURA, E.T. MicroRNAs miR-146-5p and let-7f as prognostic tools for aggressive papillary thyroid carcinoma: a case report. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol*, v. 56, n. 8, p. 552-557, 2012.

GERALDO, M. V.; NAKAYA, H.I.; KIMURA, E.T. Down-regulation of 14q32-encoded miRNAs and tumor suppressor role for *miR-654-3p* in papillary thyroid cancer. *Oncotarget*, v. 8, n. 6, p. 9597–9607, 2017.

GIEMSA, G. Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung, 1904.

GUIMARÃES, R.M et al. Evolução da mortalidade por câncer de tireoide em adultos no Brasil. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 57, n. 7, p. 538-544, 2013.

GUEDES, V. R.; GARBACCIO, J. L. Punção aspirativa por agulha fina da tireoide, uma reavaliação dos benefícios. *Revista Patologia do Tocantins*. v. 2, n. 01, p. 12-21, 2015.

GRIFFITHS-JONES S. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods. Mol. Biol*, v. 342, p. 129-138, 2006.

HALACHMI, S.; LINN, J. F.; AMIEL, G. E.; MOSKOVITZ, B.; NATIV, O. Urine cytology, tumour markers and bladder cancer. *British journal of urology*, v. 82, n. 5, p. 647–654, 1998.

HAN, Y.; LIU, L.; FANG, N.; YANG, R.; ZHOU, D. Regulation of pathogenicity by noncoding RNAs in bacteria. *Future. Microbiol*, v. 8, n. 5, p. 579-591, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

HAUGEN, B.R.; ALEXANDER, E.K.; BIBLE, K.C.; DOHERTY, G.M.; MANDEL, S.J.; NIKIFOROV, Y.E; PACINI, F; RANDOLPH, G.W; SAWKA, A.M; SCHLUMBERGER, M.; SCHUFF, K.G; SHERMAN, S.I; SOSA, J.A; STEWARD, D.L; TUTTLE, R.M.; WARTOFSKY, L. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. **Thyroid**. v. 26, n. 1, p. 1-133, 2017.

HAROON, A.L.; RASHEED, M. R.; XU, B. Molecular Alterations in Thyroid Carcinoma. **Surgical pathology clinics**, v.12, n. 4, p. 921–930, 2019.

HAYES, J.; PERUZZI, P.P.; LAWLER, S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. **Trends Mol Med**. v. 20, n. 8, p. 460-9, 2014.

HEGEDÜS, L. Clinical practice. The thyroid nodule. **The New England Journal of medicine**, v. 351, n. 17, p. 1764–1771, 2004.

HOU, P.; LIU, D.; SHAN, Y.; HU, S.; STUDEMAN, K.; CONDOURIS, S.; WANG, Y.; TRINK, A.; EL-NAGGAR, A. K.; TALLINI, G.; VASKO, V.; XING, M. Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 13, n. 4, p. 1161–1170, 2007.

HUANG, T.; ALVAREZ, A.; HU, B.; CHENG, S.Y. Noncoding RNAs in cancer and cancer stem cells. **Chin. J. Cancer**. v. 32, n. 11, p. 582-593, 2013.

HÜTTENHOFER, A.; SCHATTNER, P.; POLACEK, N. Non-coding RNAs: hope or hype?. **Trends in genetics: TIG**, 21(5), 289–297, 2005.

HÜTTENHOFER, A.; VOGEL, J. Experimental approaches to identify non-coding RNAs. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 2, p. 635–646, 2006.

HUSSAIN, M.R.; BAIG, M.; MOHAMOUD, H.S.; ULHAQ, Z.; HOESSLI, D.C.; KHOGEER, G.S.; AL-SAYED, R.R.; AL-AAMA, J.Y. Gene BRAF: Dos cânceres

humanos às síndromes de desenvolvimento. **Revista saudita de ciências biológicas**, v. 22, n. 4, p. 359–373, 2015.

KALVARI, I.; ARGASINSKA, J.; QUINONES-OLVERA, N. et al. Rfam 13.0: shifting to a genome-centric resource for non-coding RNA families. **Nucleic Acids Res.** v. 46, n. D1, p. D335-D342, 2018.

KAMILARIS, C.D.C.; FAUCZ, F.R.; VOUTETAKIS, A. et al. Complexo Carneiro. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 127, p. 156-164, 2019.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic. Acids. Res**, v. 42, 2014.

KIMURA S. Thyroid-specific transcription factors and their roles in thyroid cancer. **Journal of Thyroid Research**, 2011, 710213, 2011.

KROLL, T.; SARRAF, P.; PECCIARINI, L.; CHEN, C.J.; MUELLER, F.; SPIEGELMAN, B.M. PAX8-PPAR γ fusion in oncogene human thyroid carcinoma. **Science**, v. 289, p. 1357-60, 2000.

KRÜGER, J; REHMSMEIER, M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. **Nucleic. Acids. Res**, v. 34 (Web Server issue): W 451-4, 2006.

KRUSKAL, W.H.; WALLIS, W.A. Use os ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American Statistical Association**. v.47, n.260, p. 583-621, 1952.

LAM, A. K.; LEE, K. T. Application of Immunohistochemistry in Papillary Thyroid Carcinoma. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), v. 2534, p.175–195, 2022.

LANDA, I.; IBRAHIMPASIC, T.; BOUCAI, L.; SINHA, R.; KNAUF, J. A.; SHAH, R. H.; DOGAN, S., RICARTE-FILHO, J. C.; KRISHNAMOORTHY, G. P.; XU, B.; SCHULTZ, N.; BERGER, M. F.; SANDER, C.; TAYLOR, B. S.; GHOSSEIN, R.;

GANLY, I.; FAGIN, J. A. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 3, p.1052–1066, 2016.

LEWIS, B.P.; BURGE, C.B.; BARTEL, D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, v. 120, n. 1, p. 15-20, 2005.

LEE, K.; ANASTASOPOULOU, C.; CHANDRAN, C.; CASSARO, S. **Thyroid Cancer**. In Stat Pearls. Stat Pearls Publishing, 2021.

LIN, P.Y.; YU, S.L.; YANG, P.C. MicroRNA in lung cancer. **Br. J. Cancer**, v. 103, n. 8, p. 1144–1148, 2010.

LIN, F.; PRICHARD, J. (eds). Manual de imunohistoquímica prática—Perguntas frequentes. **Springer**, Nova York, Heidelberg, Dordrecht, Londres, 2015.

LIU, X.; MEDICI, M.; KWONG, N.; ANGELL, T.E.; MARQUSEE, E.; KIM, M.I.; LARSEN, P.R.; CHO, N.L.; NEHS, M.A.; RUAN, D.T.; GAWANDE, A.; MOORE, F. J.R.; BARLETTA, J.; KRANE, J.F.; CIBAS, E.S.; YANG, T.; ALEXANDER, E.K. Bethesda Categorization of Thyroid Nodule Cytology and Prediction of Thyroid. **Thyroid**, v. 26, n. 2, p. 256-2561, 2016.

LIU, L.; BEN-SHLOMO, H.; XU, Y.X.; STERN, M.Z.; GONCHAROV, I.; ZHANG, Y.; MICHAELI, S. "The trypanosomatid signal recognition particle consists of two RNA molecules, a 7SL RNA homologue and a novel tRNA-like molecule". **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, n. 20, p. 18271–18280, 2003.

LIVNY, J.; WALDOR, M. K. Identification of small RNAs in diverse bacterial species. **Curr. Opin. Microbiol**, v. 10, p. 1096-1101, 2007.

MACIEL, RUI M.B.; KIMURA, E.T.; CERUTTI, J.M. Patogênese dos tumores diferenciados da tireoide (papilífero e folicular). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 49, n. 5, 2005.

MAIA, A. L.; SIQUEIRA, D. R.; KULCSAR, M. A.; TINCANI, A. J.; MAZETO, G. M.; MACIEL, L. M. Diagnosis, treatment, and follow-up of medullary thyroid carcinoma: recommendations by the Thyroid Department of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 58, n. 7, p. 667–700, 2014.

MATLOFF, N. Probability and statistics for data science. Boca Raton: **CRC Press**, 2019.

MATSUO, S.E.; MARTINS, L.; LEONI, S.G.; HAJJAR, D.; RICARTE-FILHO, J.C.M. EBINA, K.N.; KIMURA, E.T. Marcadores biológicos de tumores tiroidianos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, p. 114–125, 2004.

MARTIN, H. E.; ELLIS, E. B. BIOPSY BY NEEDLE PUNCTURE AND ASPIRATION. **Annals of surgery**, v. 92, n. 2, p. 169–181, 1930.

MCTIERNAN, A.M.; WEISS, N.S.; DALING, J.R. Incidence of thyroid cancer in women in relation to reproductive and hormonal factors. **Am. J. Epidemiol.** v. 120, n. 3, p. 423-35, 1984.

MITASH, N.; TIWARI, S.; AGNIHOTRI, S.; MANDHANI, A. Bladder cancer: Micro RNAs as biomolecules for prognostication and surveillance. **Indian. J. Urol**, 2017 v. 33, n. 2, p. 127-133, 2017.

MONTGOMERY, DOUGLAS, C.; RUNGER, GEORGE, C. Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros. LTC: Rio de Janeiro, 2003.

MODI, S. R.; CAMACHO, D. M. KOHANSKI, M. A.; WALKER, G. C.; COLLINS, J. J. Functional characterization of bacterial sRNAs using a network biology approach. **PNAS**, v. 108, p. 15522-15527, 2011.

MURATLI, A.; ERDOGAN, N.; SEVIM, S.; UNAL, I.; AKYUZ, S. Diagnostic efficacy and importance of fine-needle aspiration cytology of thyroid nodules. **J Cytol**, v. 31, n. 2, p. 73–8, 2014.

NAWROCKI, E. P.; KOLBE, D. L.; EDDY, S. R. Infernal 1.0: inference of RNA alignments. *Bioinformatics*, v. 25, n. 10, p. 1335-1337, 2009.

NAWROCKI, E. P.; EDDY, S. R. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. *Bioinformatics*, v. 29, n. 22, p. 2933-2935, 2013.

NEMENYI, P. *Distribution-Free Multiple Comparisons*. 1963.

NIELSEN, C.B.; SHOMRON, N.; SANDBERG, R.; HORNSTEIN, E.; KITZMAN, J.; BURGE, C.B. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA*, v. 13, n. 11, p. 1894-1910, 2007.

NIKIFOROV, Y. E. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Mod. Pathol*, v. 21 Suppl 2: S37-43, 2008.

NIKIFOROV, Y.E.; BIDDINGER, P.W.; THOMPSON, L.D (eds). *Patologia diagnóstica e genética molecular da tireoide*. Lippincott Williams & Wilkins, **Filadélfia**, 2012.

NIKIFOROVA, M.N.; WALD, A.I.; ROY, S.; DURSO, M.B.; NIKIFOROV, Y.E. Painel de sequenciamento de próxima geração direcionado (ThyroSeq) para detecção de mutações no câncer de tireoide. *O Jornal de endocrinologia clínica e metabolismo*, v. 98, n. 11, p. E1852–E1860, 2013.

NIKIFOROVA, M.N.; KIMURA, E.T.; GANDHI, M.; BIDDINGER, P.W.; KNAUF, J.A.; BASOLO, F.; ZHU, Z.; GIANNINI, R.; SALVATORE, G.; FUSCO, A.; SANTORO, M.; FAGIN, J.A.; NIKIFOROV, Y.E. ALI, S. Z.; CIBAS, E. S. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology II. *Acta. Cytol*, v. 60, n. 5, p. 397-398, 2016.

NOONE, A. M.; CRONIN, K. A.; ALTEKRUSE, S. F.; HOWLADER, N. LEWIS, D. R.; PETKOV, V. I.; PENBERTHY, L. Cancer Incidence and Survival Trends by Subtype Using Data from the Surveillance Epidemiology and End Results Program,

1992-2013. Cancer epidemiology, biomarkers e prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the **American Society of Preventive Oncology**, v. 26, n. 4, p. 632–641, 2017.

OGLE, D.; WHEELER, P.; DINNO, A. Simple Fisheries Stock Assessment Methods. [S.l.]: **The Comprehensive R Archive Network**, 2019.

OKAFOR, C.; HOGAN, J.; RAYGADA, M.; THOMAS, B. J.; AKSHINTALA, S.; GLOD, J. W.; DEL RIVERO, J. Update on Targeted Therapy in Medullary Thyroid Cancer. **Frontiers in endocrinology**, v. 12, p. 708949, 2021.

PIRES, A. T.; MUSTAFÁ, A.; MAGALHÃES, M. The 2017 ACR TI-RADS: pictorial essay. **Radiologia brasileira**, v. 55, n. 1, p. 47–53, 2022.

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, 965212, 2013.

PORCELLINI, A.; FENZI, G.; AVVEDIMENTO, E.V. Mutações do gene do receptor de tirotropina. **J Mol Med (Berl)**, v. 75, p. 567-575, 1997.

PULCRANO, M.; BOUKHERIS, H.; TALBOT M. et al. Carcinoma folicular de tireoide mal diferenciado: fatores prognósticos e relevância da classificação histológica. **Tireoide**, v. 17, p. 639-646, 2007.

PUSZTASZERI, M.; ROSSI, E.D.; AUGER, M.; BALOCH, Z.; BISHOP, J.; BONGIOVANNI, M.; CHANDRA, A.; COCHAND-PRIOU, B.; FADDA, G.; HIROKAWA, M.; HONG, S.; KAKUDO, K.; KRANE, J.F.; NAYAR, R.; PARANGI, S.; SCHMITT, F.; FAQUIN, W.C. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: Proposed Modifications and Updates for the Second Edition from an International Panel. **Acta. Cytol**, v. 60, n. 5, p. 399-405, 2016.

QI, Y.; TIAN, X.; LIU, J.; HAN, Y.; GRAHAM, A. M.; SIMON, M. C.; PENNINGER, J. M.; CARMELIET, P.; LI, S. BNIP3 and AIF cooperate to induce apoptosis and

cavitation during epithelial morphogenesis. **The Journal of cell biology**, 198(1), 103–114, 2012.

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

REINERS, C.; WEGSCHEIDER, K.; SCHICHA, H.; et al. Prevalência de distúrbios da tireoide na população trabalhadora da Alemanha: rastreamento ultrassonográfico em 96.278 funcionários não selecionados. *Tireoide*, v. 14, p.926, 2004.

RENNIE, W.; LIU, C.; CARMACK, C. S.; WOLENC, A.; KANORIA, S.; LU, J.; LONG, D.; DING, Y. STarMir: a web server for prediction of microRNA binding sites. **Nucleic acids research**, 42 (Web Server issue), W114–W118, 2014.

RICARTE-FILHO, J.C.M.; KIMURA, E.T. O microRNA LET-7 apresenta função supressora de tumor em carcinoma papilífero da tiroide. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2006.

ROMAN, BENJAMIN R.; MORRIS, LUC G.; DAVIES, LOUISE. The thyroid cancer epidemic, **Current Opinion In Endocrinology & Diabetes And Obesity**, v. 24, n. 5, p.332-336, 2017.

ROSÁRIO, P. W.; WARD, L. S.; CARVALHO, G. A.; GRAF, H.; MACIEL, R. M.; MACIEL, L. M.; MAIA, A. L.; VAISMAN, M. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: update on the Brazilian consensus. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 57, n. 4, p. 240–264, 2013.

SAINI, S.; TULLA, K.; MAKER, A. V.; BURMAN, K. D.; PRABHAKAR, B. S. Therapeutic advances in anaplastic thyroid cancer: a current perspective. **Molecular cancer**, v. 17, n. 1, p. 154, 2018.

SETHUPATHY, P.; CORDA, B.; HATZIGEORGIOU, A. G. TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets. **RNA**, v. 12, n. 2, p. 192–197, 2006.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; FUCHS, H. E.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2021. CA: **A Cancer Journal for Clinicians**, n. 71, n.1, p. 7–33, 2021.

SCHLUMBERGER, M.; PACINI, F. Thyroid tumors. Paris, Editions **Nucléon**, 2003.

SCHRAIVOGEL, D.; MEISTER, G. Import routes and nuclear functions of Argonaute and other small RNA-silencing proteins. **Trends. Biochem. Sci**, 2014 v. 39, n. 9, p. 420-431, 2014.

SHAPIRO, S.S; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3–4, p. 591–611, 1965.

SON, E. J.; NOSÉ, V. Familial follicular cell-derived thyroid carcinoma. **Frontiers in endocrinology**, v. 3, p. 61, 2012.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. Biometry: **The Principles and Practice of Statistics in Biological Research**. 3ª Edição, WH Freeman and Co., Nova York, 1995.

SPONZIELLO, M.A et al. A novel nonsense EIF1AX mutation identified in a thyroid nodule histologically diagnosed as oncocytic carcinoma. **Endocrine**, v. 62, n. 2, p.492-495, 2018.

STAUBITZ, J. I.; SCHAD, A.; SPRINGER, E.; RAJALINGAM, K.; LANG, H.; ROTH, W.; HARTMANN, N.; MUSHOLT, T. J. Novel rearrangements involving the RET gene in papillary thyroid carcinoma. **Cancer genetics**, 230, 13–20, 2019.

STELLA DI STADIO, C.; FARAONIO, R.; FEDERICO, A.; ALTIERI, F.; RIPPA, E.; ARCARI, P. GKN1 expression in gastric cancer cells is negatively regulated by miR-544a. **Biochimie**, 167, 42–48, 2019.

TAGLIAFERRI, P.; ROSSI, M. DI.; MARTINO, M.T.; AMODIO, N.; LEONE, E.; GULLA, A.; NERI, A.; TASSONE, P. Promises and challenges of MicroRNA-based treatment of multiple myeloma. **Curr. Cancer. Drug. Targets**, v. 12, n. 7, p. 838-846, 2012.

TAMHANE, S.; GHARIB, H. Atualização de nódulo de tireoide no diagnóstico e tratamento. **Clin. Diabetes Endocrinol**, v. 2, n.17, 2016.

TESSLER, F. N.; MIDDLETON, W. D.; GRANT, E. G.; HOANG, J. K.; BERLAND, L. L.; TEEFEY, S. A.; CRONAN, J. J.; BELAND, M. D.; DESSER, T. S.; FRATES, M. C.; HAMMERS, L. W.; HAMPER, U. M.; LANGER, J. E.; READING, C. C.; SCOUTT, L. M.; STAVROS, A. T. ACR Thyroid Imaging, Reporting and Data System (TI-RADS): White Paper of the ACR TI-RADS Committee. **Journal of the American College of Radiology: JACR**, v. 14, n. 5, p. 587–595, 2017.

TUTTLE, R.M.; HAUGEN, B.; PERRIER, N.D. Updated American Joint Committee on Cancer/Tumor-Node-Metastasis Staging System for Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer (Eighth Edition): What Changed and Why? **Thyroid**, v. 27, n. 6, p. 751–6, 2017.

WAHID, F.; SHEHZAD, A.; KHAN, T.; KIM, Y.Y. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 11, p. 1231-1243, 2010.

WANG, X. Improving microRNA target prediction by modeling with unambiguously identified microRNA-target pairs from CLIP-ligation studies. **Bioinformatics**, v. 32, n. 9, p. 1316-22, 2016.

WASSARMAN, K. M.; REPOILA, F.; ROSENOW, C.; STORZ, G.; GOTTESMAN, S. Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. **Genes Dev**, v. 15, p. 1637–1651, 2001.

WASHIETL, S.; HOFACKER, I. L. miRNAMap: genomic maps of microRNA genes and their target genes in mammalian genomes. **Nucleic. Acids. Res**, v. 34 (Database issue): D 135-9, 2006.

WATERS, L. S.; STORZ, G. Regulatory RNAs in bacteria. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 615-628, 2009.

WELLS, A.S.; JR, PACINI, F.; ROBINSON, BG.; SANTORO, M. Neoplasia endócrina múltipla tipo 2 e carcinoma medular de tireoide familiar: uma atualização. **O Jornal de endocrinologia clínica e metabolismo**, v. 98, n. 8, p. 3149-3164, 2013.

WINKLER, W. C. *Riboswitches* and the role of noncoding RNAs in bacterial metabolic control. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 594–602, 2005.

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 855–862, 1993.

WONG, K.S.; STRICKLAND, K.C.; ANGELL, T.E.; NEHS, M.A.; ALEXANDER, E.K.; CIBAS, E.S.; KRANE, J.F.; HOWITT, B.E.; BARLETTA, J.A. The Flip Side of NIFTP: an Increase in Rates of Unfavorable Histologic Parameters in the Remainder of Papillary Thyroid Carcinomas. **Endocr. Pathol**, v. 28, n. 2, p. 171-176, 2017.

XIN, Y.; WANG, X.; MENG, K.; NI, C.; LV, Z.; GUAN, D. Identification of exosomal miR-455-5p and miR-1255a as therapeutic targets for breast cancer. **Bioscience reports**, 40(1), BSR20190303, 2020.

XU, B.; SCHULTZ, N.; BERGER, M. F.; SANDER, C.; TAYLOR, B. S.; GHOSSEIN, R.; GANLY, I.; FAGIN, J. A. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 3, p. 1052, 2016.

XU, B. O'DONNELL, M.; O'DONNELL, J.; YU, J.; ZHANG, Y.; SARTOR, M.A.; KOENIG, R.J. A diferenciação adipogênica de células de câncer de tireoide por meio da proteína de fusão Pax8-PPAR γ é regulada pelo fator de transcrição 1 da tireoide (TTF-1). **O Jornal de química biológica**, v. 291, n.37, p. 19274-19286, 2016.

YOUNIS E. Oncogenesis of thyroid cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**. v. 18, p. 1191–1199, 2017.

YI, H. S.; CHANG, J. Y.; KIM, K. S.; SHONG, M. Oncogenes, mitochondrial metabolism, and quality control in differentiated thyroid cancer. **The Korean journal of internal medicine**, v. 32, n. 5, p. 780–789, 2017.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. (Org.). *Biologia molecular básica*, 5. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2014.

ZABALLOS, M. A.; SANTISTEBAN, P. Key signaling pathways in thyroid cancer. **The Journal of endocrinology**, v. 235, n. 2, p. R43–R61, 2017.

ZHOU, X.; ZHENG, Z.; CHEN, C. et al. Características clínicas e fatores prognósticos do carcinoma de células de Hurthle: um estudo de base populacional. **BMC Câncer** v. 20, n. 407, 2020.

ZHANG, B.; PAN, X.; COBB, G.P.; ANDERSON, T.A. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Dev. Biol**, v. 302, n. 1, p. 1-12, 2006.

ZHANG, Z. J.; XIAO, Q.; LI, X. Y. NF- κ B-Activated miR-574 Promotes Multiple Malignant and Metastatic Phenotypes by Targeting BNIP3 in Thyroid Carcinoma. **Molecular cancer research: MCR**, v. 18, n. 7, p. 955–967, 2020.

APENDICE 1: ARTIGO - PERFIL DAS CARACTERÍSTICAS DAS FUNÇÕES TIREÓIDEAS À PUNÇÃO ASPIRATIVA POR FINA.

The profile of the clinical characteristics of thyroid nodules submitted to fine-needle aspiration: a descriptive study.

Amanda Carvalho Garcia¹, Teresa Cristina Santos Cavalcanti², Luiz Martins Collaço², Hans Graf^{1,3}.

¹Department of Internal Medicine, Federal University of Paraná, PR, Curitiba 80.060-240, Brazil.

²Department of Pathology University Hospital of the University of Paraná, Federal University of Paraná, PR, Curitiba 80.060-240, Brazil

³ Endocrinology and Metabolism Service University Hospital of the University of Paraná, PR, Curitiba 80030-110, Brazil.

Correspondence: Amanda Carvalho Garcia, Ph.D student - Internal Medicine, Department of Internal Medicine, Federal University of Paraná, PR, Curitiba 80.060-240, Brazil. Email: amanda.garcia@ufpr.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2314-5774> . Hans Graf, Ph.D, Dr, Department of Internal Medicine, Federal University of Paraná, PR, Curitiba 80.060-240, Brazil; Endocrinology and Metabolism Service University Hospital of the University of Paraná, PR, Curitiba 80030-110, Brazil. E-mail: hansgraf@bigghost.com.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8671-1556>.

Abstract

Context: Descriptive studies of cases treated within the scope of the Unified Health System (SUS) are scarce, the Hospital Information System (SIH) records provide information that make it possible to know the situation of thyroid biopsies, as well as the clinical, ultra-low sonography and cytology.

Objectives: We describe the clinical and epidemiological characteristics of thyroid nodules in Brazilian patients with fine needle aspiration (FNA) in a single patient.

Methods: This cross-sectional and retrospective study included 449 descriptive patients with fine needle aspiration (FNA), registered in the Hospital Information System (SIH), from January 2017 to January 2022.

Results: From January 2017 to January 2022. From the recruitment data of 449 cytopunctures, the mean age was 56 years. years old. We evidenced a frequency of 88.17% of nodular disease in females. Most cases of Bethesda II (56.55%) followed by 4 partial thyroidectomies followed by 4.45% by total thyroid surgery.

Conclusion: The clinical findings of nodular disease in this study group were classified as "benign", whose prevalence in females, as well as the results of the pathological anatomy with a diagnosis compatible with a benign lesion, followed by those thyroidectomized for suspected malignancy. The prevalence of repunctured nodules was in the Atypia of Undetermined Significance or Follicular Lesion of Undetermined Significance (AUS\SFN) category. Let us consider the importance of descriptive studies that tend to understand the main clinical features that affect nodular thyroid disease.

Keywords: Thyroid nodule; fine-needle aspiration; Bethesda; thyroidectomy.

Introduction

The thyroid endocrine gland is responsible for the production of T3 (triiodothyronine) and T4 (thyroxine), has the shape of a butterfly and is located at the base of the neck, in front of the larynx, its role is fundamental for the functioning of human metabolism (1,2). In some situations, such as the menstrual period, the levels of ovarian hormones and pregnancy, environmental factors, radiation or genetics can deregulate its functioning, resulting in changes in the appearance of the thyroid cell, which can be benign or malignant (3, 4, 5).

The main malignant alterations that affect the endocrine system originate from the follicular or parafollicular cells. Thyroid cancer can be classified as differentiated into papillary and follicular, and undifferentiated carcinomas into anaplastic, and has medullary (6). Thyroid carcinoma originates cellular changes due to the presence of mutated genes that control thyroid cell proliferation (7). Thyroid cancer is the 5th most prevalent cancer in American women in the United States, and its incidence ranges from 1% to 4% in relation to other malignant neoplasms (8,9). The incidence of thyroid cancer in the last 10 years has increased although mortality tends to decrease, especially in women, given that in men, as we

know approximately 10% of the adult population has thyroid nodules, however, only 90-95% are benign (10,11).

Thyroid carcinoma and skin melanoma account for 11% and 3% of cancers in adolescents and about 2% and 1% in children (9). Papillary thyroid carcinoma represents 80% to 85% of cases, follicular carcinoma, despite being more aggressive than papillary carcinoma, represents 10% of cases, and medullary carcinoma originated. In addition, the most aggressive and extremely rare thyroid cancer is poorly differentiated or undifferentiated carcinomas, anaplastic carcinoma, representing 1% to 2% of cases (11). Hurthle cell carcinoma of the thyroid (HCC) is responsible for 3% of all thyroid cancers, before considered as an oxyphilic variant of Follicular Thyroid Carcinoma (CFT), genetic and molecular analysis suggest that HCC is a distinct entity (12,13).

Follicular cells give rise to differentiated thyroid cancer (DTC) and parafollicular cells or C cells to medullary thyroid carcinoma (MTC) (13). DTCs include papillary and follicular neoplasms: papillary thyroid carcinoma (PTC), follicular thyroid carcinoma (FTC), and Hurthle cell carcinoma (13,14).

The CDT (papillary and follicular) originates in the follicular epithelium, which have cuboidal epithelial cells arranged in a single layer and secrete thyroid hormones into the colloid, inside the follicles (14,15). When loss of cell differentiation occurs, it results in greater aggressiveness, which makes conventional therapy and prognosis difficult (15).

Studies approaching new diagnostic technologies have been gaining ground in clinical utility, however, they imply the detection and treatment of poorly differentiated tumors, which can generate unnecessary thyroid surgeries. Although studies on the descriptive mapping of cases treated within the scope of the Unified

Health System (SUS) are scarce, the Hospital Information System (SIH) records provide information that make it possible to know the situation of thyroid biopsies, as well as the clinical characteristics, ultrasound and cytology of the punctured nodules.

Materials and methods

Study population

Demographic data were obtained from medical records registered in the Hospital Information System (SIH), and the clinical-demographic variables of this selection were: registration number, examination date, sex, age, cytopuncture diagnosis, as well as of repunctures performed, which Bethesda of the repuncture, whether the patient underwent partial or total thyroidectomy, the result of the thyroidectomy and the clinical evolution.

The data obtained were compiled in the Microsoft® Excel ® Software for Asus Notebooks (Version Windows 7), to obtain the spreadsheet used for the statistical analyses.

Study type

This is a descriptive, retrospective and cross-sectional study. Data were collected from 449 of the cytopunctures performed at the Endocrinology and

Metabology Service of the Hospital de Clinicas, Federal University of Paraná – SEMPR.

Ethical aspects

This study was approved by the Ethics Committee (CEP) on Human Beings of the Complex Hospital de Clinicas (HCH) – Federal University of Paraná (UFPR), the identification of the research consolidated by the Certificate of Presentation of Ethical Appreciation, under the CAEE number: 84075318.2.0000.0096.

Statistical analysis

For the descriptive analysis of the variables studied, the averages, standard deviations, minimum and maximum, Boxplot and proportions were calculated in order to provide an overview of the data (16,17,18). The boxplot was used to evaluate the homogeneity of the variance in the variables (19) and to verify the independence between the groups of the nominal variables, the G/Chi-Square test was used (20). In addition, to find out if there were differences between the means of the numerical variables, the T test and the Cramer V2 test were used to verify the strength of association of the qualitative variables, software R 3.5.2 and Microsoft Excel (21). In cases where it was necessary, a confidence level of 95% was used.

Results

Study population

Data were collected from 449 patients undergoing fine needle aspiration (FNA), registered by the Hospital Information System (SIH), from January 2017 to January 2022. Descriptive statistics, as well as the histogram, show an asymmetry in relation to age, given the greater number of patients with age well below the average (Figure 1).

Following the description of the dataset analyzed, (Table 1) presents the gender of the patients, the absolute frequency of fine needle aspiration (FNA) biopsies was in females, representing 88.17% of cases compared to 53% of gender masculine.

Considering the mean age of 56 years and that most patients are female, (Figure 2) shows the age distribution by sex. It appears that the average age of the two groups is similar, however, there is a greater dispersion between the ages in the group formed by women. This data was expected, as thyroid cancer is more frequent in the head and neck region in women than in men (22)

Differentiated carcinomas such as CPT represent 80% of cases, while CFT accounts for 20% of cases, with Hürthle cell carcinoma being less frequent. On the contrary, poorly differentiated and undifferentiated carcinomas represent 10% of

cases. According to the National Cancer Institute, new cases of thyroid cancer are estimated at about 13,780, with 1,830 men and 11,950 women (22).

Descriptive analysis of cytopunctures

Regarding the Bethesda System for Cytopathological Thyroid Reports, which classifies thyroid nodules submitted to FNA, the data show the predominance of Bethesda type II (benign), as shown in the distribution (Table 2).

Using the chi-square test, the results ($X^2 = 19.182$, degrees of freedom = 14, p-value = 0.1581) indicate that there is no difference between the Bethesda data for men and women (Figure 3).

The prevalence of patients with repuncture was predominantly in the Bethesda II category (benign), representing 84.17% of cases compared to the other categories that classify thyroid nodules (Table 3).

The number of patients who underwent the surgical procedure, thyroidectomy, represents 122 of the cases, being 54.10% total thyroidectomy and 45.90% partial thyroidectomy.

Analyzing the Bethesda system in relation to thyroidectomy, the association between the two variables is verified ($X^2 = 105.16$, degrees of freedom = 14, p-value = 4.834 and -16), with strength of association between the variables equal to 59.45%. (Cramer's $V^2 = 0.4945229$), that is, statistically, it is possible to prove the relationship between Bethesda System for Cytopathological Thyroid Reports and thyroidectomy (Table 4).

Comparing the Bethesda system with tumor type, the Chi-Square test also indicated the existence of an association between the variables ($X^2 = 58.295$,

degrees of freedom = 13, p-value = 1.058 and -07). As for the strength of association, Cramer's V^2 statistic indicated a strength equal to 68.56 (Figure 4).

The results observed in (Table 4) indicate that there is a greater indication for surgery due to the disordered clinical picture of thyroid lesions, which was expected, as these lesions are composed of follicular epithelial cells of highly variable architecture. In the Bethesda II classification (benign) there was a greater indication of surgeries, reflecting the greater number of cases in relation to the other nodules classified by the Bethesda System. In most of the nodules undergoing surgery, the pathological anatomy was benign, compatible with follicular adenoma, or colloid nodule, or Hashimoto's thyroiditis and/or enlarged multinodular thyroid goiter.

Discussion

The results of this study showed the predominance of cases with nodular thyroid disease, who underwent fine needle aspiration (FNA) and were classified as "benign. From the data from the recruitment of 449 cytopunctures, the average was 56 years of age, where we evidenced a frequency of 88.17% of nodular disease in females compared to a frequency of 11.83% in men. The outcomes of this study identified that most thyroid nodules with FNA that are at risk for malignancy affect more women than men.

The predominance found in the present study is consistent, as the prevalence of thyroid nodules increases with advancing age. According to the study by Kwong et al (2015) they observed that the prevalence of multinodularity increases with advancing age, although the risk of malignant nodules decreases, thyroid cancer in

patients of advanced age has histological phenotypes consistent with a higher risk for malignancy (23).

Bearing in mind that nodular thyroid disease is a common disease in adults, with a prevalence between 26 and 67% (23-25). Malignant nodules represent about 8-15% (23,25,26). Thyroid cancer is the one that affects more frequently, about three times in the head and neck region in women compared to men (22). According to a study, the rates grow progressively among those aged 40-59 and those aged 60 and over, with a significantly higher increase among women (27).

The relationship between age and the Thyroid Cytopathological Reports of the Bethesda Classification indicated no differences between the categories, in comparison with the male and female genders, due to the greater dispersion of ages in the group formed by women.

The frequency of thyroid nodules was "benign", of the 449 cytopunctures, 216 were classified as Bethesda's II (benign) with a predominance of females, which differs from 10% of males. In addition, we observed the prevalence of fine needle aspiration punctures (FNAB) in females that fall into the categories of unsatisfactory or unsatisfactory of 86.25%, atypia of undetermined significance or follicular lesion of undetermined significance (AUS\SFN) with 90%, follicular neoplasm or suspected follicular neoplasm (FN\SFN) representing 94.74%, followed by 85.53% suspected for malignancy and 84.62% for malignancy. The male gender has 13.75% unsatisfactory or unsatisfactory, 10% benign, followed by 14.47% atypia of undetermined significance or follicular lesion of undetermined significance (AUS\SFN), follicular neoplasm or suspected follicular neoplasm (FN). \SFN) represents 5.26%, suspected for malignancy 15% and malignancy 15.38%, compared to the absolute values in their entirety (Table 2). In addition, a

concurrency case was observed: Medullary Carcinoma of the thyroid in males, it is a malignant neoplasm that affects the thyroid gland that represents 3-4% of cases, and presents sporadic or hereditary form 20-25% (28).

Interestingly, the increased incidence of thyroid nodules biopsied at risk of malignancy for Follicular Neoplasia or Suspected for Follicular Neoplasia (FN\SFN), suspected for malignancy and Malignancy, proposed cytological diagnoses have an increased risk of malignancy, and treatment approaches are suggested for each of them (29,30).

In the past, the prevalence of patients who did not have their nodules repunctured was predominant in the Bethesda II classification, representing 87.17% of cases (Table 3), we evidenced, among the groups studied on screen, a prevalence of 61.84% in indeterminate nodules (AUS \SFN) with repuncture, followed by 57.50% in the unsatisfactory, in contrast to the 25% with malignancy. Of the 240 benign thyroid nodules followed by FNAC, 18.83% were submitted to repuncture. Fine needle aspiration (FNA) is considered the most suitable test for patients with thyroid nodules (31). According to Bongiovanni et al (2013) about 60% to 70% are classified as "benign" and approximately 20% to 30% in total fall into the categories of "suspected follicular neoplasm" (FN\SFN), "suspected of malignancy" and "malignant (32).

The results of this study can identify that most cases of thyroid nodules biopsied and followed up with repuncture were observed in nodules of indeterminate cytology, followed by nodules classified as unsatisfactory. Considering that the group of indeterminate cytology is heterogeneous, in contrast with the unsatisfactory cytology that in most cases the amount of the group cell growth and excess red blood cells make diagnosis difficult (29,30)

Analyzing the results of thyroid cytology in relation to the 122 cases that underwent surgery, whether partial or total, the present study showed a prevalence of 54.10% of thyroid nodules that underwent total thyroidectomy compared to 45.90% partially thyroidectomized. It is interesting to note that among the benign class group (BII) they underwent thyroid surgery, representing the majority of cases, with 56.55% partial followed by 44.45% total thyroid surgery (Table 4).

The tumor type in relation to thyroidectomized thyroid nodules, regardless of whether the removal was partial or total, were benign with predominance in Bethesda class II, representing 39 of 45 undergoing surgical thyroid removal. Of the pathological anatomy concord for malignancy were observed in those with cytology suspect for malignancy.

Regarding the number of deaths, it appears that 1.12% of the patients had a cause not correlated with cytological or anatomopathological data. Thyroid cancer has been gaining a substantial increase in the population worldwide, with an incidence of 1% of all malignancies, making it increasingly common worldwide. Autopsy studies report a ~50% prevalence of thyroid nodules detected during autopsies in individuals with unknown thyroid pathology (33).

Some limitations related to information from the Hospital Information System (SIH) can be pointed out, including the absence of information for some variables and a possible under-recording of cases. The lack of publications based on information from the SIH makes it difficult to compare results. Despite these limitations, the findings of this investigation are consistent with the epidemiology of thyroid cancer described in the literature (34).

Conclusion

The present study evidenced what so far, the scientific literature reports on the incidence of thyroid cancer affected in females than in males. The clinical findings of nodular disease in this study group undergoing fine needle aspiration (FNA) according to the Bethesda System for Cytopathological Thyroid Reports are Benign, as well as for the outcomes of pathological anatomy with a diagnosis consistent with benign, followed by those thyroidectomized. to suspect for malignancy. The prevalence of repunctured nodules was Atypia of Undetermined Significance or Follicular Lesion of Undetermined Significance (AUS/SFN). In summary, let us consider the importance of descriptive studies that tend to understand the main clinical features that affect nodular thyroid disease.

Declarations

Ethics approval and consent to participate: Ethical approval and consent for participation: Human Ethics Committee (CEP) of the Complexo Hospitalar de Clínicas of the Federal University of Paraná (CHC-UFPR) (Certificate of Presentation of Ethical Appreciation - CAAE nº 84075318.2.0000.0096), approved this study . Informed consent was obtained from all subjects involved in the present study. All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations and approved by said institutional committee.

Consent for publication: not applicable.

Availability of data and materials: The originals generated and analyzed during the study are included in this or in the data data of the article in reference.

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests

Financial support: this work was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - Finance Code 001.

Authors' contributions: ACG performed data collection and wrote the initial article. TCC monitored and performed thyroid cytopuncture reviews. LMC followed the development of the study and reviewed the article. HG investigated and followed up and critically reviewed the article. All authors approved the manuscript as submitted.

Acknowledgments: The authors thank the participants who gave their time and effort to participate in the study, Hamashia, J.C and statistician Marcos Maia. All authors contributed to the analysis and interpretation of data and gave final approval of the version of the manuscript submitted for publication.

References

1. Dumont JE, Vassart G. Thyroid gland metabolism and the action of TSH. *Endocrinology*. 1979;(1):311-292.,
2. Cox MM, Doudna JA, O'donnell M. *Biologia Molecular – Princípios e Técnicas*, 1ªed. Artmed; 2012.
3. McTiernan AM, Weiss NS, Daling JR. Incidence of thyroid cancer in women in relation to reproductive and hormonal factors. *Am J Epidemiol*. 1984;120(3):423-435.
4. Reiners C, Wegscheider K, Schicha H, et al. Prevalence of thyroid disorders in the working population of Germany: ultrasonography screening in 96,278 unselected employees. *Thyroid*. 2004;14(11):926-932.

5. Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *J Cancer Epidemiol*. 2013; 2013:965212.
6. Delellis RA, Heitz PU, Eng, C. Pathology and Genetics of Endocrine Organ Tumors. World Health Organization Tumor Classification, IARC Press, Lyon, 2004.
7. Hegedüs L. Clinical practice. The thyroid nodule. *N Engl J Med*. 2004;351(17):1764-1771.
8. Haroon Al Rasheed MR, Xu B. Molecular Alterations in Thyroid Carcinoma. *Surg Pathol Clin*. 2019;12(4):921-930.
9. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021 [published correction appears in *CA Cancer J Clin*. 2021 Jul;71(4):359]. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(1):7-33.
10. Younis E. Oncogenesis of Thyroid Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;18(5):1191-1199.
11. Bolin J. Thyroid Follicular Epithelial Cell-Derived Cancer: New Approaches and Treatment Strategies. *J Nucl Med Technol*. 2021;49(3):199-208.
12. Zhou X, Zheng Z, Chen C, et al. Clinical characteristics and prognostic factors of Hurthle cell carcinoma: a population-based study. *BMC Cancer*. 2020;20(1):407. Colin IM, Deneff JF, Lengelé B, Many MC, Gérard AC. Recent insights into the cell biology of thyroid angiofollicular units. *Endocr Rev*. 2013;34(2):209-238.
13. Noone AM, Cronin KA, Altekruse SF, et al. Cancer Incidence and Survival Trends by Subtype Using Data from the Surveillance Epidemiology and End

- Results Program, 1992-2013. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017;26(4):632-641.
14. Lee K, Anastasopoulou C, Chandran C, Cassaro, S. Thyroid Cancer. In Stat Pearls. StatPearls Publishing, 2021.
 15. Bruni R, Cesarone F, Scozzari A, Tardella, F. "No arbitrage and a linear portfolio selection model," *Economics Bulletin, Access Econ.* 33(2):1247-1258, 2013.
 16. Ogle D, Wheeler P, Dinno A. Simple Fisheries Stock Assessment Methods. [S.l.]: The Comprehensive R Archive Network; 2019.
 17. Matloff N. Probability and statistics for data science. Boca Raton: CRC Press, 2019.
 18. Fraser, DAS. Introduction to Bartlett (1937) Sufficiency Properties and Statistical Tests. In: Kotz, S., Johnson, NL (eds) Discoveries in Statistics. Springer Series in Statistics. *Springer*, New York: NY; 1992.
 19. Sokal RR, Rohlf FJ. Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. WH Freeman and Co: 3^a Edition. Nova York; 1995.
 20. Field, A. Discovering Statistics Using SPSS. 3^a Edition, Sage Publications Ltd: London; 2009.
 21. BRAZIL. Ministry of Health. National Cancer Institute – INCA. Estimates of cancer incidence and mortality. Rio de Janeiro: INCA; 2022.
 22. Kwong N, Medici M, Angell TE, et al. The Influence of Patient Age on Thyroid Nodule Formation, Multinodularity, and Thyroid Cancer Risk. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(12):4434-4440.

23. Acar T, Ozbek SS, Acar S. Incidentally discovered thyroid nodules: frequency in an adult population during Doppler ultrasonographic evaluation of cervical vessels. *Endocrine*. 2014;45(1):73-78.
24. American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer, Cooper DS, Doherty GM, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer [published correction appears in *Thyroid*. 2010 Aug;20(8):942. Hauger, Bryan R [corrected to Haugen, Bryan R] [published correction appears in *Thyroid*. 2010 Jun;20(6):674-5]. *Thyroid*. 2009;19(11):1167-1214.
25. Yassa L, Cibas ES, Benson CB, et al. Long-term assessment of a multidisciplinary approach to thyroid nodule diagnostic evaluation. *Cancer*. 2007;111(6):508-516.
26. Guimarães RM, Muzi CD, Parreira VG, Santos RD, Sampaio JR. Evolution of thyroid cancer mortality in adults in Brazil. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2013;57(7):538-544.
27. Wells SA Jr, Asa SL, Dralle H, et al. Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2015;25(6):567-610.
28. Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid*. 2017;27(11):1341-1346.
29. Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, et al. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagn Cytopathol*. 2008;36(6):425-437.

30. Gharib H, Goellner JR. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: an appraisal. *Ann Intern Med.* 1993;118(4):282-289.
31. Bongiovanni M, Krane JF, Cibas ES, Faquin WC. The atypical thyroid fine-needle aspiration: past, present, and future. *Cancer Cytopathol.* 2012;120(2):73-86.
32. Mohorea IS, Socea B, Şerban D, et al. Incidence of thyroid carcinomas in an extended retrospective study of 526 autopsies. *Exp Ther Med.* 2021;21(6):607.
33. Ron E, Schneider, AB. Thyroid cancer. In: Thun M, Linet MS, Cerhan JR, Haiman CA, Schottenfeld D, editors. *Cancer epidemiology and prevention.* 4th ed. New York: Oxford University Press; 2017.

Figure 1: Age Histogram

Source: The authors (2022).

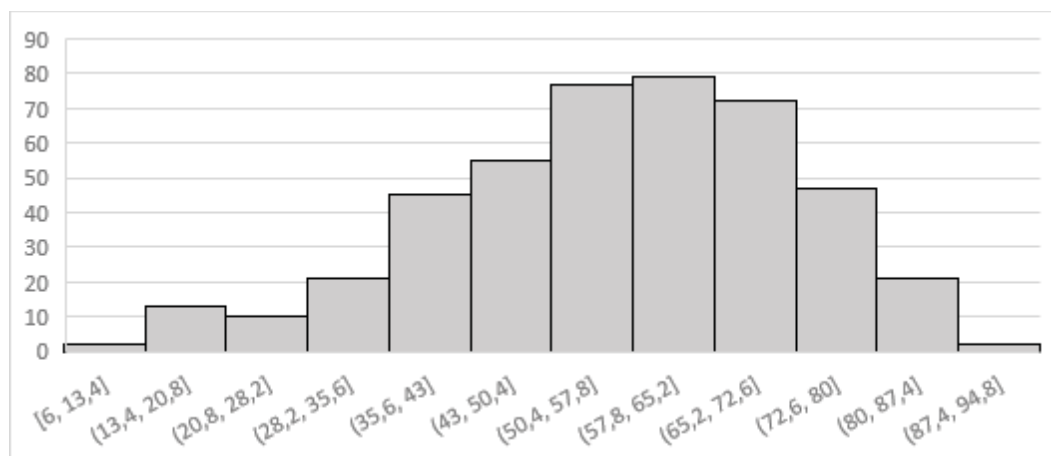


Table 1 - GENDER OF PATIENTS

Source: The authors (2022).

Subtitle: F = Female; M = Male.

Line Labels	Absolute Frequency	Percentage
F	396	88,17%
M	53	11,83%
Grand total	449	100,00%

Figure 2: Box plot of ages by gender

Source: The authors (2022).

Subtitle:

F = Female; M = Male.

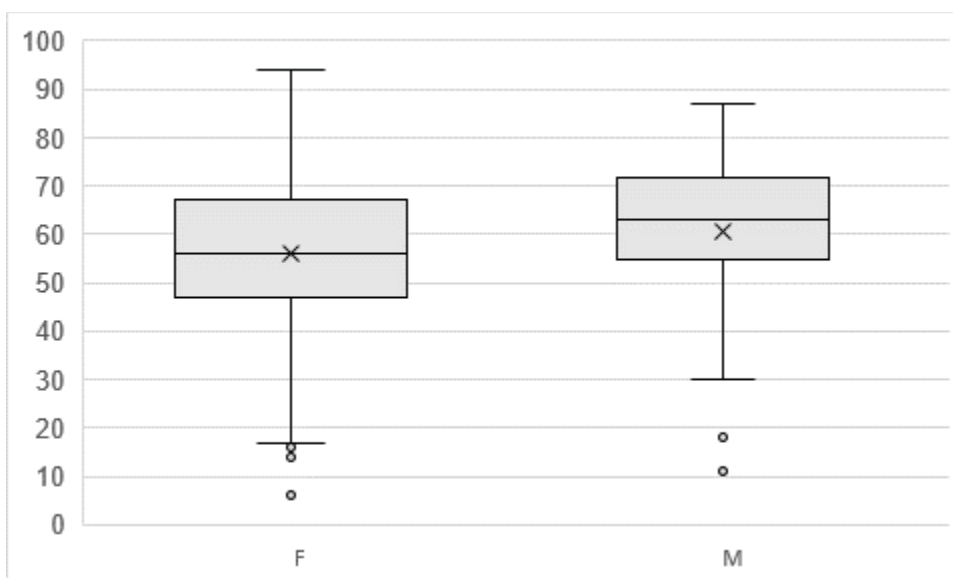


Table 2: Bethesda frequency by gender

Source: The authors (2022).

Subtitle:

BI = non-diagnostic or unsatisfactory; BII = Benign; BIII = Atypia of undetermined significance or follicular lesion of undetermined significance (AUS\SFN); BIV = Follicular neoplasm or Suspect for a follicular neoplasm (FN\SFN); BV = Suspected for malignancy; BVI = Malignancy.

Variáveis	CM		I		II		III		IV		V		VI		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Sexo																
Feminino	0		69	86,25	216	90	65	85,53	18	94,74	17	85	11	84,62	396	88,20
Masculino	1	100	11	13,75	24	10	11	14,47	1	5,26	3	15	2	15,38	53	11,80
Total	1		80		240		76		19		20		13		449	

Figure 3: box plot of ages by Bethesda

Source: the authors (2022).

Subtitle:

BI = non-diagnostic or unsatisfactory; BII = Benign; BIII = Atypia of undetermined significance or follicular lesion of undetermined significance (AUS\SFN); BIV = Follicular neoplasm or Suspect for a follicular neoplasm (FN\SFN); BV = Suspected for malignancy; BVI = Malignancy, CM = Medullary Carcinoma

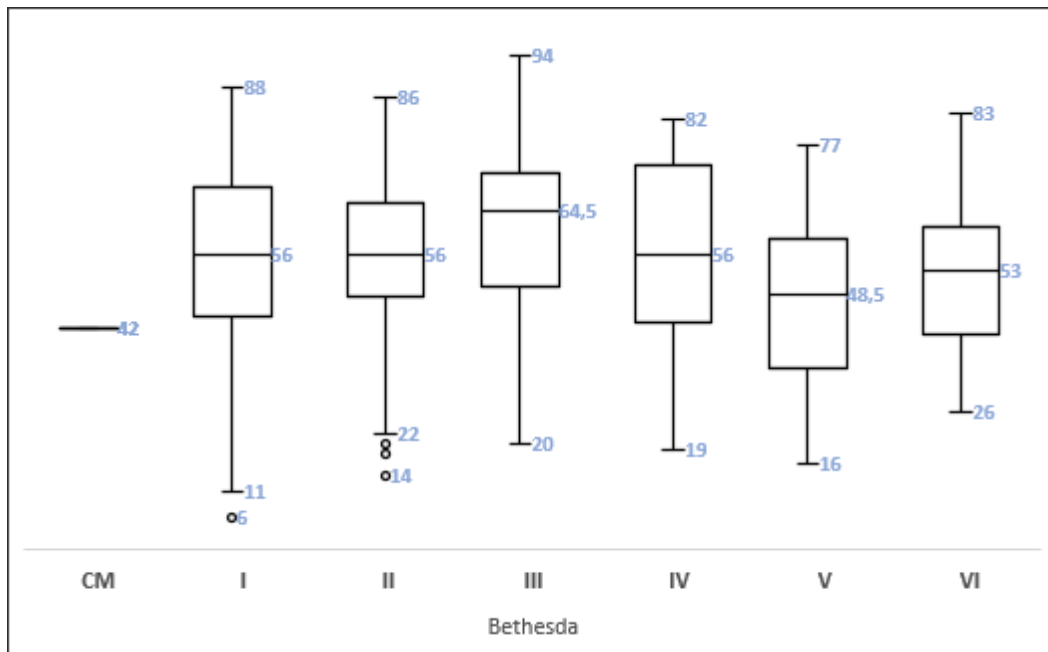


Table 3: frequency of patients with repunction by Bethesda

Source: the authors (2022).

Subtitle:

BI = non-diagnostic or unsatisfactory; BII = Benign; BIII = Atypia of undetermined significance or follicular lesion of undetermined significance (AUS\SFN); BIV = Follicular neoplasm or Suspect for a follicular neoplasm (FN\SFN); BV = Suspected for malignancy; BVI = Malignancy, CM = Medullary Carcinoma.

Repunção	CM		I		II		III		IV		V		VI		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	1	100	34	42,50	202	84,17	29	38,16	12	63,16	14	70	9	75	302	67,26
sim		0	46	57,50	38	15,83	47	61,84	7	36,84	6	30	3	25	147	32,74
Total	1		80		240		76		19		20		12		449	

Figure 4: quantitatives of patients by type of tumor

Source: The authors (2022).

Subtitle:

BI = non-diagnostic or unsatisfactory; BII = Benign; BIII = Atypia of undetermined significance or follicular lesion of undetermined significance (AUS\SFN); BIV = Follicular neoplasm or Suspect for a follicular neoplasm (FN\SFN); BV = Suspected for malignancy; BVI = Malignancy; MC = Medullary Carcinoma.

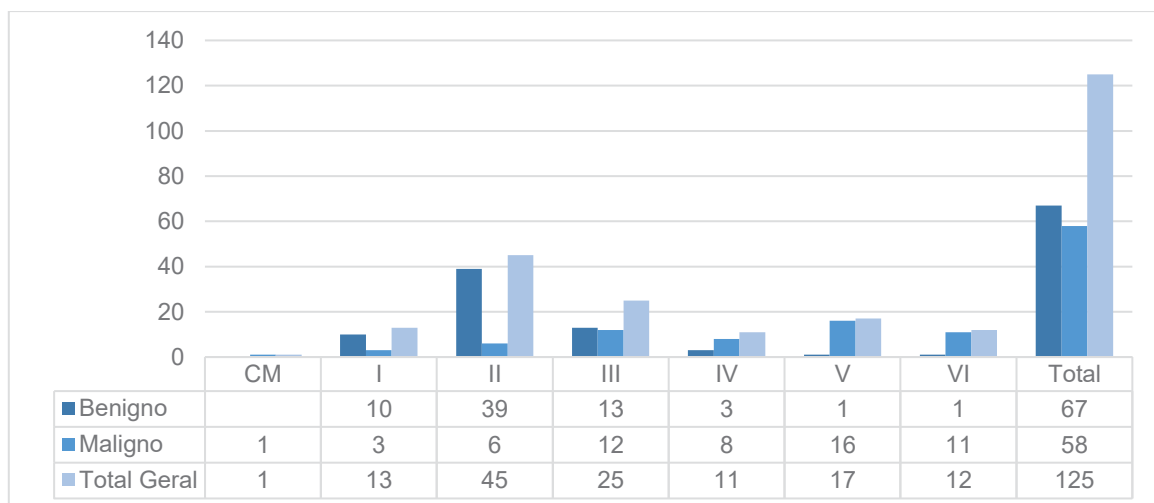


Table 4: cases of Bethesda's that were submitted to total and partial surgery

Source: The authors (2022).

Subtitle:

BI = non-diagnostic or unsatisfactory; BII = Benign; BIII = Atypia of undetermined significance or follicular lesion of undetermined significance (AUS\SFN); BIV = Follicular neoplasm or Suspect for a follicular neoplasm (FN\SFN); BV = Suspected for malignancy; BVI = Malignancy; MC = Medullary Carcinoma.

Tireoidectomia	CM		I		II		III		IV		V		VI		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Parcial	0		4	30,77	25	56,55	16	64	5	45,45	3	18,75	4	36,36	56	45,90
Total	1	100	9	69,23	20	44,45	9	36	6	54,55	13	81,25	7	63,64	66	54,10
Total Geral	1		13		45		25		11		16		11		122	

APENDICE 2 ARTIGO - Small RNAs in the intronic region of the BRAF genes

Small RNAs in the intronic region of the BRAF gene

Amanda Carvalho. Garcia ^{1, *}, Teresa Cristina Santos Cavalcanti ², Luiz Martins Collaço ², Sabrina Wolenski Bartoszewski ³ and Hans Graf ¹

¹ Department of Internal Medicine, Federal University of Paraná, Curitiba 80.060-240, Brazil; hansgraf@bigghost.com.br (H.G.)

² Department of Pathology, Federal University of Paraná, PR, Curitiba 80.060-240, Brazil; tecava@yahoo.com.br (T.C.S.C.); lmcollaco@uol.com.br (L.M.C.)

³ Department of Statistic, Federal University of Paraná, Curitiba 81530-015, Brazil; swolenski@hotmail.com (SWB)

* Correspondence: amanda.ufpr@gmail.com; Tel.: +55-41-99833-0124

Received: ; Accepted: ; Published: date

Abstract: In papillary thyroid carcinoma (PTC) the BRAFV600E mutation represents 90% of the cases, considered a punctual mutation by the thymine transversion (T1799A) of the BRAF gene by the replacement of valine by glutamate (V600E), in the serine/threonine kinase, activates the recruitment of RAF proteins (BRAF in thyroid follicular cells) to the plasma membrane activates ERK kinase (MEK), which phosphorylates and activates the extracellular signal regulated by protein kinase (ERK), where in the nucleus it regulates the transcription genes involved in cell differentiation, proliferation and survival. In the human genome, the evidence of microRNAs in regions favorable to carcinogenesis has an index of 50%. MicroRNAs (small RNAs that do not encode proteins) act in post-transcriptional regulation, causing inhibition of translation or degradation of mRNAs, whose altered expression is evidenced in papillary thyroid carcinoma, for example, miR-146, miR-222 and miR-221. We identified 9 families of small RNAs in the intronic regions of the BRAF gene: BRAF-207, BRAF-208, BRAF-209, BRAF-211, BRAF-211, BRAF-212, BRAF-214, BRAF-216, BRAF-217 and BRAF -218. The results provide a better understanding of the participation of this type of RNA in post-transcriptional regulation in thyroid cancer, which represents an accessible and differentiated molecular methodological development in these cases, thus contributing to a therapeutic decision in cases of indeterminate thyroid nodules.

Keywords: non-coding RNA (ncRNA); BRAF; microRNA; intronic region.

1. Introduction

Thyroid cancer is the fifth most common cancer in women in the US [1]. and its incidence continues to increase worldwide, even though mortality has changed minimally over the last five decades [2]. The incidence has indicated a dramatic increase in incidence, the findings

suggest that changing patterns of treatment of thyroid nodules may have led to a decrease in the diagnosis of small indolent tumors, but not more advanced tumors [3,4,5,6], mainly small papillary carcinomas [7], with the highest increase found in South Korea [4]. Most thyroid cancers have mutations along the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cell signaling pathway. This pathway transmits growth signals from the plasma membrane to the nucleus, playing a central role in regulating cell proliferation. Somatic mutation of the BRAF 1799 A gene, resulting from mutant kinase-BRAF V600E, is unique to papillary thyroid carcinoma (PTC) cancer and in PTC-derived anaplastic cancer. The BRAF V600E mutation has an 80% prevalence of genetic alterations in cases of papillary thyroid carcinoma [8]. Another frequent mutation is that of the RAS oncogene family, mainly in the follicular type and in the follicular variant CPT. Furthermore, chromosomal translocations are seen in the CT, and thus these genomic rearrangements lead to the expression of new oncogenic fusions, initiating events in various CTs [2,5,6]. RET and TRK somatic rearrangements are found almost exclusively in PTC and can be found in early stages [5].

In the human genome, evidence of microRNAs in regions conducive to carcinogenesis presents an incidence of 50% [9]. Scientific and technological advances led to the discovery of the functions of those considered to be the main RNAs: messenger RNA (mRNA), a molecule that transfers information during protein synthesis; Ribosomal RNA (rRNA) component of the structure of protein synthesis and transfer RNA (tRNA) capable of transporting amino acids and interacting with proteins [10]. Several structural and functional studies of RNA have been carried out and have enabled the description of new classes of RNA, with varied functions and in the Archaea, Bacteria and Eukarya domains [11].

RNAs are transcribed from a DNA template and can be classified according to their function. In addition to this main group, there is a second group composed of a wide variety of RNAs with special functions and that do not contain information for protein synthesis: riboswitches, RNAi, snoRNA, miRNA/sRNA, among others [12]. Riboswitches are RNAs that undergo a change in structure in response to the binding of regulatory molecules and act in cis to control the expression of a wide range of bacterial genes [13]. RNAi, or interfering RNAs, participate in a natural mechanism of post-transcriptional regulation of gene expression that can silence individual genes creating a knockout phenotype [14]. The snoRNA are unique to eukaryotes and chemically modify other ncRNAs such as rRNA, tRNA. MiRNAs, which are equivalent to prokaryotic sRNAs, are involved in several post-transcriptional regulatory processes [15,16].

The nomenclature of non-coding RNAs is quite diverse and has varied over time and according to the advancement of knowledge about these molecules [17]. In eukaryotes, non-coding RNAs with a regulatory function are made up of small single-stranded RNA molecules that act in the post-transcriptional regulation of gene expression, regulate important signaling pathways and control several pathophysiological processes [18,19].

The main function of microRNAs is in the imperfect pairing with the target mRNAs, being able to regulate multiple targets, generating the so-called regulatory network. Studies have shown that many genes involved in the endocrine system are microRNA targets and changes in microRNA expression levels have been coadjutants in tumor processes [22,23]. The recognition of the mechanisms regulated by these small RNAs could help in the clinical diagnosis [20,21].

MicroRNA expression is altered in some tumors, and tumor-specific inactivating mutations have been identified in some microRNAs, which may act as tumor suppressor genes [20,21]. Calin et al. (2002) found frequent deletions and inhibition of miR 15 and miR 16 in the 13q14 region in cases of chronic lymphocytic leukemia, which inhibited the expression of an oncogene, soon identified as anti-apoptotic BCL-2) [24]. In lung cancer, considered one of the most aggressive, analyzed that the decrease in let-7 miRNA modulates the action of RAS and MYC oncogenes [20].

Oncogenic action is with increased expression in tumors that negatively modulate tumor suppressor genes, as is the case of miR-221 in glioblastoma, and miR-372 and miR-373 in testicular cell neoplasia and miR-221, miR- 222 and miR-146 in thyroid tumors [9]. The suppressor effect, a certain regulatory mechanism that includes miRNA can lead to down regulation of tumor

suppressor genes and/or up regulation of oncogenes [5]. MicroRNAs can act in post-transcriptional regulation in the 3'UTR region of gene expression, influencing the translation of target mRNAs, which can lead to inhibition of translation or degradation of mRNAs, bringing new knowledge in thyroid tumorigenesis [2].

We further analyzed the predicted ncRNAs in BRAF-207, BRAF-0208, BRAF-209, BRAF-211, BRAF-211, BRAF-212, BRAF-214, BRAF-216 and BRAF-218 using Infernal 1.1 bioinformatics tools. Furthermore, these analyzes constitute the first documented evidence of the presence of sRNAs in the intronic regions of the BRAF gene.

2. Results

2.1. Prediction of New ncRNAs in the intronic regions of the BRAF gene

The computational tool Infernal 1.1.2 was employed for this study [see Section 4.1] and the detection of multiple covariances and sequence analysis had as input the RNA family database (Rfam, link available <http://rfam.xfam.org/>; accessed August 22, 2022), the prediction of nine families of RNAs that made up the intronic regions of the BRAF gene, and of the sequence BRAF and GRCh 38.p 14 as demonstrated in **Supplementary Material S1**.

The complete list of BRAF gene intronic sequences is as follows: BRAF-207, BRAF-208, BRAF-209, BRAF-210, BRAF-211, BRAF-212, BRAF-214, BRAF-216, BRAF-216 and BRAF-218. The results are listed in Table 1. Taking this approach, no ncRNA was detected in BRAF-218, due to the significant number of scaffolds and contigs that are identified in incomplete sequence. Transcripts with the highest number of common ncRNAs were BRAF-214 and BRAF-216 shown in table 1.

Table 1. ncRNAs predicted in the intronic sequences of the BRAF gene. The computational tool Infernal (version 1.1.2) was used.

Intronic sequences	ncRNAs
BRAF	CRISPR-DR45, CRISPR-DR62, Metazoa_SPR, mir-1255, mir-544, mir-574, mir-562, mir-6, Plant_SPR, plasmodium_snoR14, plasmodium_snoR21, snopsi28S-3316, snoR07, snoR13 and U6.
BRAF-207	CRISPR-DR45, CRISPR-DR62, Metazoa_SPR, mir-1255, mir-544, mir-562, mir-574, mir-6, Plant_SPR, snoR07, snoR13 and U6.
BRAF-208	CRISPR-DR45, CRISPR-DR62, Metazoa_SPR, mir-1255, mir-544, mir-562, mir-574, mir-6, Plant_SPR, snoR07, snoR13 and U6.
BRAF-209	Metazoa_SPR, mir-544, mir-562, mir-574, Plant_SPR, snoR07, snoR13 and snopsi28S-3316.
BRAF-210	Metazoa_SPR.
BRAF-211	CRISPR-DR45, CRISPR-DR62, Metazoa_SPR, mir-1255, mir-544, mir-562, mir-574, mir-6, Plant_SPR, snoR07, snoR13 and U6.
BRAF-212	Metazoa_SPR, mir-562, mir-544, mir-574, Plant_SPR, snoR07, snoR13 and snopsi28S-3316.
BRAF-214	CRISPR-DR45, CRISPR-DR62, Metazoa_SPR, mir-1255, mir-544, mir-562, mir-574, mir-6, Plant_SPR, plasmodium_snoR14, plasmodium_snoR21, snopsi28S-3316, snoR07, snoR13 and U6.
BRAF-216	CRISPR-DR45, CRISPR-DR62, Metazoa_SPR, mir-1255, mir-544, mir-574, mir-6, Plant_SPR, plasmodium_snoR14, plasmodium_snoR21, snopsi28S-3316, snoR07, snoR13 and U6.
BRAF-217	Metazoa_SPR.
BRAF-218	Absence
GRCh38.p14	CRISPR-DR45, CRISPR-DR62, Metazoa_SPR, mir-1255, mir-544, mir-574, mir-6, Plant_SPR, plasmodium_snoR14, plasmodium_snoR21, snopsi28S-3316, snoR07, snoR13 and U6.

Intronic sequences of the BRAF gene = 10; BRAF = gene BRAF; GRCh38.p14 = Homo sapiens chromosome 7, GRCh38.p14 Primary Assembly; ncRNAs = non-coding RNAs.

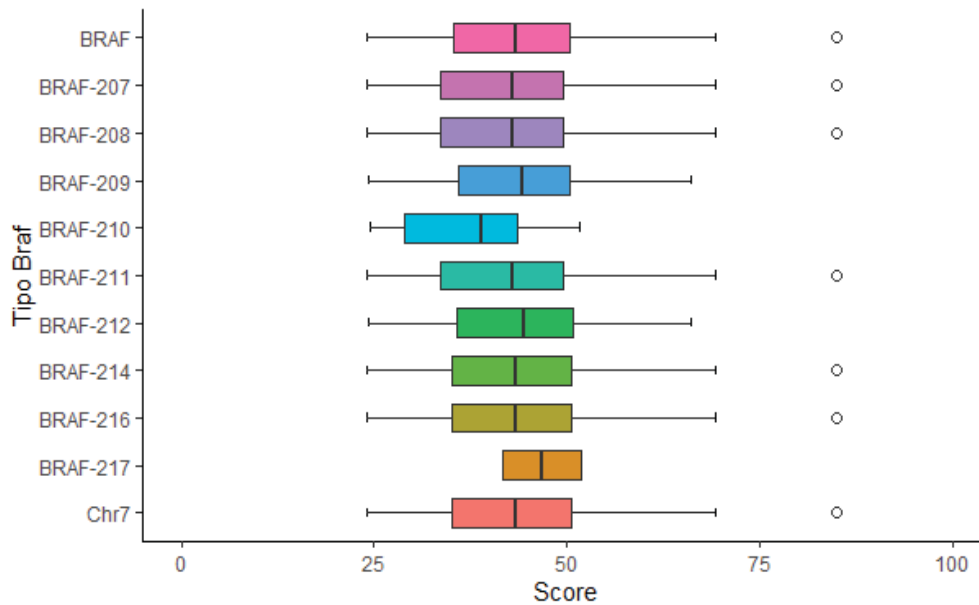
All ncRNAs predicted by the Infernal tool 1.1.2 in the intronic sequences of the BRAF in the BRAF gene and GRCh 38.p 14 are shown in **Supplementary Material S1**. As we can observe in table 1, the number of predicted varied according to the sequence, except for the intronic sequences BRAF-207, BRAF-208, BRAF 214 and BRAF-216, which obtained the same amount of predicted ncRNAs, reflecting in the smaller variability with deviation default equal to 11.36 and 10.76 respectively. The BRAF-217 intronic sequence showed the greatest variability because it had the lowest standard deviation of 5.89, having an equal mean and median.

Table 2. Descriptive analysis of BRAF intronic sequences, BRAF gene and GRCh 38.p 14.

BRAF	Type_	a	D	r	Q	m	Q	r
		verage	P	inimum	1	edian	3	aximum
		4	1	2	3	4	5	8
BRAF	27	3,00	0,37	4,10	5,10	3,40	0,40	5,10
BRAF-		4	1	2	3	4	5	8
207	45	2,46	1,36	4,10	3,55	2,90	0,10	5,10
BRAF-		4	1	2	3	4	5	8
208	45	2,46	1,36	4,10	3,55	2,90	0,10	5,10
BRAF-		4	9	2	3	4	5	6
209	2	3,14	,93	4,20	5,87	4,35	0,55	6,20
BRAF-		3	1	2	2	3	5	5
210		7,50	0,49	4,60	6,17	9,00	1,60	1,60
BRAF-		4	1	2	3	4	5	8
211	25	2,63	1,61	4,10	3,55	2,90	0,10	5,10
BRAF-		4	9	2	3	4	5	6
212	09	3,31	,71	4,20	5,75	4,50	1,00	6,20
BRAF-		4	1	2	3	4	5	8
214	17	2,97	0,76	4,10	5,05	3,50	0,75	5,10
BRAF-		4	1	2	3	4	5	8
216	17	2,97	0,76	4,10	5,05	3,50	0,75	5,10
BRAF-		4	5	4	4	4	5	5
217		6,80	,89	1,70	1,70	6,80	1,90	1,90
GRCh		4	1	2	3	4	5	8
38.p 14	30	2,94	0,76	4,10	4,97	3,40	0,60	5,10

n = predicted, SD=standard deviation, Q1= 1st quartile, Q3= 3rd quartile.

Graph 1 boxplot the BRAF intronic sequence showed only ncRNA predicted was the BRAF-207 sequence, the Metazoa_SRP (ncRNA signal recognition particle RNA), this reflects in the quartin dataset of the BRAF-217 sequence considered the most condensed, on the other hand, the BRAF-210 type presents a significant difference from the others, the interquartile range of the third quartile and the first quartile is greater and is not influenced by outliers, it is positive asymmetric, while the dataset of BRAF, BRAF-207 and BRAF -208 are symmetrical and there are outliers seen in the 1 box plot.



Graph 1. Density of braf intronic sequences, braf gene and grch 38.p 14.

The Simple Variance Analysis test (One-Way ANOVA) was used, where the data received statistical treatment using the RStudio software version 4.2.0, adopting a significance level (α) of 5% as a decision criterion (Graph 1). Considering the hypotheses of the ANOVA table: H_0 : The means are equal ($\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_i$), H_1 : There is at least one of the different means (Table 3). We have a value=0.984>0.05, so there is no statistical evidence that the means are different (Table 3).

Table 3. Simple Analysis of Variance (One-Way ANOVA).

source of variation	Degrees of freedom	sum of squares	mean squares	F value	Pr(>F)
tipo_braf	10	330	33.04	0.286	0.984
waste	1606	185259	115.35		

For the analyzes of normality of the residues, the Shapiro-Wilk test was used, which aims to assess whether a distribution is like a normal distribution. Knowing then the hypotheses and analyzing the results of the proposed tests, considering the 5% level of significance, we reject the null hypothesis (Figure 1). Therefore, there is evidence to state that the errors do not follow a normal distribution.

```

shapiro-wilk normality test

data:  anova1$residuals
w = 0.9776, p-value = 3.401e-15

```

Figure 1. Shapiro-Wilk test BRAF transcripts.

The p-value of the Kruskal-Wallis test of 0.9277 > 0.05 leads us not to reject the null hypothesis that the groups are similar to each other (Figure 2).

```

kruskal-wallis rank sum test

data: score by tipo_braf
kruskal-wallis chi-squared = 4.3971, df = 10, p-value = 0.9277

```

Figure 2. Kruskal-Wallis test of BRAF intronic sequences.

The analysis of the density of predicted ncRNAs in the sequences under study (Table 1), in general, there was a significant difference in the total amount of predicted according to the family of RNA belonging, as we could see the ncRNAs Metazoa_SPR presented 1441 in total in comparison with the Plant_SPR ncRNAs with 40 and mir-562. Within the collection of RNA families, it is important to note that within these families there are several sequence alignments, secondary consensus structures and coexistence models.

In table 4, there was variability in the dataset of ncRNAs Metazoa_SRP, mir-1255, mir-544, mir-562 and Pant_SRP, because the standard deviation is greater than in ncRNAs CRISPR-DR45, CRISPR-DR62, mir-574, mir -6, plasmodium_snoR14, plasmodium_snoR21, snopsi28S-3316, snoR07, snoR13 and U6, presented a standard deviation equal to 0, where the mean, median, Quartile 1 and Quartile 3 values remained the same according to the values assigned to each family (Table 4).

Table 4. Descriptive analysis of predicted ncRNAs sequences.

F	Type_BRA	verage	P	l inimum	m 1	edian	m 3	aximum	m	
DR45	CRISPR-	4,70		4,7	2	4,7	7,7	4,7	4,7	2
DR62	CRISPR-	4,70		4,7	2	4,75	4,7	4,7	4,7	2
RP	Metazoa_S	441	3,65	,35	4,2	2	7,2	4,1	0,6	8,7
	mir-1255	4	8,00	,45	6,6	6	6,6	8	9,4	9,4
	mir-544	4	1,10	5,46	6,2	2	6,2	1,1	6	6
	mir-562	8	2,49	1,75	4,1	2	1,5	7,7	2,4	3
	mir-574		5,70		5,7	2	5,7	5,7	5,7	5,7
	mir-6		5,60		5,6	2	5,6	5,6	5,6	5,6
	Plant_SRP	0	7,13	,06	4,2	2	5,2	5,8	7,6	2,8
m_snoR14	plasmodiu		5,40		5,4	2	5,4	5,4	5,4	5,4
m_snoR21	plasmodiu		4,20		4,2	2	4,2	4,2	4,2	4,2
3316	snopsi28S-		5,10		5,1	2	5,1	5,1	5,1	5,1
	snoR07		7,60		7,6	2	7,6	7,6	7,6	7,6
	snoR13		7,40		7,4	2	7,4	7,4	7,4	7,4
	U6		5,10		5,1	8	5,1	5,1	5,1	5,1

n = predicted, SD=standard deviation, Q1= 1st quartile, Q3= 3rd quartile.

As the criteria required by the ANOVA were not met, the Kruskal-Wallis test was performed, which is the non-parametric alternative method to the ANOVA, where they presuppose the hypothesis of data normality (H0), the groups are similar or hypothesis (H1), at least at least one group differs from the others. We have a p-value= $<2e-16 < 0.05$, therefore there is statistical evidence that the means are different (Table 5).

Table 5. Simple variance analysis test (One-Way ANOVA).

variação	Fonte de	Grau	Soma de	Quad	F	P
		s de liberdade	quadrados	rados médios	value	r (>F)
ame	Target_n	14	51022	3644	3,39	< 2e-16***
	waste	1602	134568	84		

The test for the normality of the residuals made use of the Shapiro-Wilk test, which aims to assess whether a distribution is like a normal distribution. And, in fact, using the Shapiro-Wilk test, we showed that this sample group is different from a normal distribution, as a result of which $W = 0.988896$ and $p = 9.717e-10$. (Figure 3).

```

shapiro-wilk normality test
data: anova2$residuals
w = 0.98896, p-value = 9.717e-10

```

Figure 3. Shapiro Wilk ncRNAs test.

We used the Kruskal-Wallis test, which is an alternative non-parametric method to ANOVA, where the p-value $p\text{-value} < 2.2e-16$ of the Kruskal-Wallis test was less than a significance level of 0.05, and leads us to reject the null hypothesis that the groups are similar and that the short non-coding RNAs do show significant differences (Figure 4).

```

kruskal-wallis rank sum test
data: score by target_name
kruskal-wallis chi-squared = 304.52, df = 14, p-value < 2.2e-16

```

Figure 4. Kruskal-Wallis ncRNAs test.

The in silico prediction of each BRAF gene transcript resulted in a wide listing of non-protein coding RNA in the BRAF gene transcripts, resulting in 15 non-coding RNAs, among them microRNAs, the main objective of the present study, and we identified the myr- 1255, mir-544, mir-574, mir-6 (Table 4).

Nemenyi's non-parametric multiple comparison test was performed to assess the p-values of two-by-two comparisons, where the test showed evidence of significant difference between groups (Figure 5). The groups of ncRNAs predicted in the intronic sequences of the BRAF gene, the BRAF gene and GRCh 38.p 14, the CRISPR-DR45 and CRISPR-DR62 family were found to be different from the ncRNAs Metazoa_SPR, mir-544 and mir-574, but not mir-1255 and the other ncRNAs analyzed. The Metazoa_SPR ncRNAs, called signal recognition particle RNA, integrate the signal particle ribonucleoprotein (SPR) complex, which identifies the signal peptide and binds to the ribosome, thus inhibiting protein synthesis [25]. This in turn, compared with the ncRNAs: mir-574, mir-6, Plasmodium_snoR14, Plasmodium_snoR21, snopsi28S-316, snoR07, snoR13 and U6 there was no difference. Furthermore, mir-544 and mir-562 differ from the microRNAs mir-574 and mir-6,

Plasmodium_snoR14, Plasmodium_snoR21, snopsi28S-316, snoR07, snoR13, and U6. The mir-562 microRNA is not different from Plant_SRP, whereas the mir-1255 differs only from the mir-544 (Figure 5).

The mir-544, mir-562 and Metazoa_SRP were the only ones that showed significant difference when compared with snRNA U6 is a non-coding component of small nuclear RNA, formed by an RNA-protein complex that interacts with other snRNPs resulting in pre-miRNA unmodified and with other proteins, the RNA-protein molecular complex is formed, which catalyzes the removal of introns from the pre-mRNA [26].

The differences or similarities between non-coding RNAs (ncRNAs) is because they are formed by families that have specific characteristics that evolved from a common ancestor, where over time they underwent modifications giving rise to other families. Therefore, the Rfam database (Item 3.4) allows access to these families of ncRNAs where they are represented by multiple sequence alignments and covariance model (CM) used for the detection of homologues, similar but not equal [27].

	CRISPR-DR45	CRISPR-DR62	Metazoa_SRP	mir-1255	mir-544	mir-562	mir-574	mir-6	Plant_SRP	plasmodium_snoR14
CRISPR-DR62	1.00000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metazoa_SRP	0.00059	0.00059	-	-	-	-	-	-	-	-
mir-1255	7.0e-11	7.0e-11	2.0e-07	-	-	-	-	-	-	-
mir-544	0.03680	0.03680	1.00000	0.00057	-	-	-	-	-	-
mir-562	0.00350	0.00350	1.00000	1.8e-05	1.00000	-	-	-	-	-
mir-574	1.00000	1.00000	0.00220	4.0e-10	0.07856	0.01034	-	-	-	-
mir-6	1.00000	1.00000	0.00186	3.2e-10	0.07137	0.00900	1.00000	-	-	-
Plant_SRP	1.00000	1.00000	1.4e-13	1.7e-13	0.00056	5.2e-09	1.00000	1.00000	-	-
plasmodium_snoR14	1.00000	1.00000	0.00144	2.2e-10	0.06162	0.00728	1.00000	1.00000	1.00000	-
plasmodium_snoR21	1.00000	1.00000	0.00028	2.6e-11	0.02353	0.00187	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
snopsi28S-3316	1.00000	1.00000	0.00085	1.1e-10	0.04544	0.00471	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
snoR07	1.00000	1.00000	0.01003	3.4e-09	0.17993	0.03541	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
snoR13	1.00000	1.00000	0.00740	2.2e-09	0.15309	0.02770	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
U6	3.5e-08	3.5e-08	0.00138	1.00000	0.01383	0.00471	1.3e-07	1.1e-07	1.6e-12	8.6e-08
plasmodium_snoR21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
snopsi28S-3316	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
snoR07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
snoR13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U6	1.7e-08	5.1e-08	6.8e-07	4.8e-07	-	-	-	-	-	-

Figure 5. Nemenyi multiple comparison test. Examples of ncRNAs that showed significant difference by the Nemenyi test are contained in the rectangles in color (red). U6 = RNA, U6 Small Nuclear 1; Metazoa_SRP = Metazoan signal recognition particle RNA; mir-1255 = mir-1255 microRNA; mir-562 = microRNA 2; mir-544 = microRNA 544; mir-574 = microRNA 574; mir-6 = microRNA 6.

As the mir-562 microRNA was predicted in the vast majority of sequences under study (**Supplementary Material S2**) where we propose a new putative miRNA:mRNA network that can lead to a new path for functional studies, the inference of mir-562 targets, which resulted in 122 mRNA targets, among which we highlight the EIF1AX gene. Recently, the Cancer Genome Atlas (TCGA) study in a large cohort of papillary thyroid carcinomas (PTC) reported mutations of the EIF1AX gene in these tumors [16,28,29,30].

The EIF1AX gene is located on the X chromosome and encodes a eukaryotic translation initiation factor 1A (eIF1A) [29,30,31]. The protein promotes 43S complex formation by stabilizing the binding of the ternary tRNA complex (Met-tRNA) of the eIF2-GTP-methionyl primer to the 40S subunit and, together with another translation initiation factor, is involved in a sophisticated scanning system responsible for precisely locating the proper start codon on mRNA in eukaryotes [29,30,31]. eIF1A is the eukaryotic ortholog of the bacterial translation initiation factor IF1, with sequences between 32 and 95 amino acids that constitute the RNA-binding domain that are

homologous to IF1 [30,31,34]. Additional domains in eIF1, absent in IF1, are a helical domain adjacent to the RNA binding coil and highly charged, structured N- and C-terminal tails (NTT, CTT) [34]. The C-terminal tail is mostly negatively charged but contains some hydrophobic residues at the end that have been proposed to be involved in protein-protein interactions. Residue mutations on the RNA binding surface of eIF1A have been reported to cause defects in the formation of the 43S and 48S pre-initiation complex [34]. Prior to the TCGA study of PTC, mutations in the EIF1AX gene were reported in uveal melanomas [35,36]. A recent study also reported EIF1AX mutations in anaplastic thyroid carcinomas (ATC) [8, 28,29,30,32,33].

3. Discussion

We analyzed the sequences of the non-protein coding transcripts in the BRAF gene, the RNA, U6 Small Nuclear 1; Metazoan signal recognition particle RNA; mir-1255; mir-562, mir-544 and mir-574. Anbalagan et al (2014) observed miR-562 increases the formation of endothelial cell tubes influencing the increase in angiogenic factors secreted from breast tumor cells MCF-7 [37]. miR-455-5p can interact with cyclin-dependent kinase inhibitor 1B is an enzyme inhibitor that in humans is encoded by the CDKN1B gene influencing the cell cycle process and miR-1255a can regulate transcription factor proteins, which act as mediators of TGF- β signal transduction to SMAD4 to participate in the TGF- β signaling pathway, was described in the study identification of exosomal miR-455-5p and miR-1255a as therapeutic targets for breast cancer [38].

In the study by Zhang et al (2020) described NF- κ B-activated mir-574 promoting multiple malignant and metastatic phenotypes by targeting bnip3 in thyroid carcinoma, identified NF- κ B/mir-574 signaling can reduce the aggressiveness of thyroid cancer. thyroid, but mir-574, directly regulated by NF-KB/p65, promotes thyroid cancer tumorigenesis through inhibition of the BNIP3/AIF pathway [39]. Because BNIP3 and AIF cooperate to induce apoptosis and cavitation during epithelial morphogenesis, AIF also upregulated BNIP3 expression through mitochondrial production of reactive oxygen species and consequent stabilization of HIF-2 α [40].

Studies have shown that mir-544a upregulation may be crucially involved in the translational repression of GKN1, thus suggesting its potential role as a biomarker and therapeutic target in patients with gastric cancer [41].

Záveský et al (2022) in the prospective and multicenter study of biomarker discovery, we analyzed the expression of small non-coding RNAs (mainly microRNAs) in plasma small non-coding RNA profile in breast cancer: U6 snRNA in plasma, mir-451a and mir -548b-5p as new diagnostic and prognostic biomarkers, indicated that U6 snRNA and mir-548b-5p may have pro-oncogenic functions, while mir-451a may act as a tumor suppressor in breast cancer [42].

The signal recognition particle (SRP) plays a central role in the delivery of classic secretory and membrane proteins to the endoplasmic reticulum (ER), the signal recognition particle mediates post-translational targeting in eukaryotes [43]. Since the discovery of microRNAs in the process of dysregulation of tumor cell expression described by Calin et al (2002), they have observed a decrease in the expression of miR-15 and miR-16 in patients with chronic lymphoblastic leukemia, as they play a fundamental role in the regulation of gene expression, in the processing of neoplastic cell formation where they are related to the cause of several diseases [24].

However, the prevalence of these mutations in other common types of thyroid cancer, such as follicular carcinoma, and in benign thyroid nodules remains unknown. Furthermore, the histopathological features of thyroid tumors that carry EIF1AX mutations are not well characterized.

4. Materials and Methods

4.1 Data set

Made use of the infernal-1.1.2 tool, the following command line was used: `cmscan -o sequencegene.out -tblout sequencegene.tbl -T 24 -notrunc Rfam.cm sequencegene`, to predict non-coding RNA the following transcripts that do not encode protein (Table 6) [44]. The result of the prediction evidences the existence of ncRNAs in BRAF-207, BRAF-208, BRAF-209, BRAF-210, BRAF-211, BRAF-212, BRAF-214, BRAF-216, BRAF-217 and BRAF-218 transcripts, considered introns that do not encode proteins, however, with the use of the infernal-1.1.2 tool, the nomenclature of the ncRNAs can be observed, as well as the non-prediction of ncRNAs in the transcript using the infernal-1.1.2 tool, the following command line was used: `cmscan -o sequencegene.out -tblout sequencegene.tbl -T 24 -notrunc Rfam.cm sequencegene`.

Table 6. BRAF gene transcripts.

Name	Transcribed ID	Number of base pairs	Access
BRAF-212	<u>ENST0000064412</u>	3	06\08\
	<u>0.1</u>	889	2019
BRAF-211	<u>ENST0000064379</u>	5	06\08\
	<u>0.1</u>	75	2019
BRAF-208	<u>ENST0000064280</u>	4	06\08\
	<u>8.1</u>	39	2019
BRAF-214	<u>ENST0000064490</u>	5	06\08\2019
	<u>5.1</u>	217	
BRAF-209	<u>ENST0000064287</u>	2	06\08\
	<u>5.1</u>	871	2019
BRAF-207	<u>ENST0000064227</u>	2	06\08\
	<u>2.1</u>	320	2019
BRAF-218	<u>ENST0000064642</u>	2	06\08\
	<u>7.1</u>	265	2019
BRAF-216	<u>ENST0000064544</u>	2	06\08\
	<u>3.1</u>	190	2019
BRAF-217	<u>ENST0000064633</u>	1	06\08\
	<u>4.1</u>	779	2019
BRAF-210	<u>ENST0000064335</u>	8	06\08\
	<u>6.1</u>	53	2019
BRAF	<u>ENSG00000157764</u>	3	06\08\
		447	2019
GRCh 38.p 14	<u>NC_000007.14</u>	3	06\08\
		449	2019

4.2 Prediction of ncRNAs in silico

Computational tool that uses a covariance model to generate probabilistic profiles of sequences and secondary structures of RNA families [47]. The covariance model is a special case of a probabilistic model that values a combination of the consensus sequence and the consensus secondary structure of a given RNA so that, in many cases, it can identify homologous RNAs that have a conserved secondary structure, but low primary sequence conservation [48]. Infernal 1.1.1 consists of five programs: `cmbuild`, `cmcalibrate`, `cmsearch`, `cmscan` and `cmalign`.

4.3 Annotation of microRNA sequences

For annotation of microRNA sequences, we will use the online database Rfam versions 12.0 and 12.1. This bank contains a collection of ncRNA families represented by manually curated alignment sequences, consensus secondary structures, annotations gleaned from taxonomy and ontology sources [47]. The database is a broad and diverse source of ncRNAs, includes 2,474 ncRNA families, with information on diverse types of ncRNAs across the three domains of life and viruses. Infernal 1.1.1 was used to perform multiple sequence alignments by the covariance model and, in addition to ncRNA annotation, Rfam 12.1 classifies ncRNAs and provides bibliographic references for each family, links to the PDB (Protein Data Bank), miRBase, ENA and Gene Ontology (GO).

4.4 Target prediction

The miRBase tool provides interfaces for microRNA sequences, covers data from gene annotation and predicted targets, nomenclature and publication of new microRNA sequences [48]. The latest version of miRBase has 24,521 microRNA loci covering 206 species, with processing capacity to produce 30,424 mature microRNAs, data is updated in response to the discovery and development of microRNA sequencing methods, maintaining the mapping standard [49].

4.5 Análise estatística

For the descriptive analysis of the variables studied, the means, standard deviations, minimum and maximum, Boxplot and proportions were calculated in order to provide an overview of the data [49,50,51]. The boxplot was used to assess the homogeneity of the variance in the variables and to verify the independence between the [52].

groups of nominal variables, the G/Chi-Square test [53] was used. In addition, to find out if there were differences between the means of numerical variables, the t test and the Cramer V2 test were used to verify the strength of association of qualitative variables, R 3.5.2 software and Microsoft Excel [54]. Where necessary, a 95% confidence level was used.

For data analysis of the functional characterization of microRNA in the BRAF gene transcripts, the data were described by statistical procedures that make it possible to summarize, form, explain and transmit numerical information.

The information obtained was entered into spreadsheets in the Microsoft Excel® 2019 program, then the data were generated, applying descriptive statistical analysis techniques, obtaining the definitive results in frequency of simple and absolute (%), demonstrated in mean, standard deviation, minimum values, quartiles and maximum values. After the descriptive analysis, the RStudio software version 4.2.0 was used. for fitting the models. The data were submitted to ANOVA and, subsequently, the presupposition of normality of the residues was verified by the normality test in the Shapiro-Wilk frequentist statistics, this assumption being violated [55]. The ANOVA test is used to test the equality of three or more population means, based on the analysis of sample variances [56].

The hypothesis tested in the ANOVA is that the population means of the treatments do not differ from each other, with a given significance level of 5%, which can be represented as follows:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_a$, where a represents the total number of treatments in the trial and μ_i represents the population mean of the i -th treatment, $i=1, \dots, a$.

Therefore, as the assumption of normality of the residues was violated, we then applied the Kruskal-Wallis test, which is the alternative non-parametric method to the one-way ANOVA [57], being used in cases where the assumptions required by the ANOVA are not serviced. The non-parametric test is a method that compares two or more independent samples of equal or

different sizes after applying non-parametric tests, we apply the Nemenyi multiple comparison test in order to verify which of the factors differ from each other [58].

5. Conclusions

Studies have shown that many genes involved in the endocrine system are driven by microRNAs, and changes in microRNA expression levels have supported tumor processes. More than 95% of thyroid carcinomas are derived from follicular cells, their behavior varies from the indolently growing well-differentiated papillary and follicular carcinomas (PTC and FTC, respectively) to the extremely aggressive undifferentiated carcinoma (UC). Let us consider the importance of descriptive studies that tend to understand the main clinical characteristics that affect nodular thyroid disease, as well as the recognition of the post-transcriptional mechanisms regulated by these small RNA, contribute to the clinical diagnosis, corroborating the therapeutic decision not only in cases of indeterminate thyroid nodules, as well as understanding nodular disease in general.

Acknowledgments: The authors thank the participants who gave your time and effort to participate in the study, Hamashia, J.C.

Supplementary materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/>

Funding: This study was financed in part by the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel – Brazil (CAPES) – Finance Code 001.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Haugen, B. R., Alexander, E. K., Bible, K. C., Doherty, G. M., Mandel, S. J., Nikiforov, Y. E., Pacini, F., Randolph, G. W., Sawka, A. M., Schlumberger, M., Schuff, K. G., Sherman, S. I., Sosa, J. A., Steward, D. L., Tuttle, R. M., & Wartofsky, L. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*, **2016**, 26(1), 1–133.
- Cabanillas, M. E., McFadden, D. G., Durante, C. Thyroid cancer. *Lancet (London, England)*, **2016**, 388(10061), 2783–2795.
- Moon, P.K.; Chakoma, T.; Ma, Y.; Megwalu, U.C. Thyroid Cancer Incidence, Clinical Presentation, and Survival Among Native Hawaiian and Other Pacific Islanders. *Otolaryngol Head Neck Surg*, **2022**.
- Vaccarella, S.; Dal Maso, L.; Laversanne, M.; Bray, F.; Plummer, M.; Franceschi, S. The Impact of Diagnostic Changes on the Rise in Thyroid Cancer Incidence: A Population-Based Study in Selected High-Resource Countries. *Thyroid*. **2015**, 25(10):1127-36.
- Krasner, M.S.; Epstein, R.M.; Beckman, H.; Suchman, A.L.; Chapman, B.; Mooney, C.J.; Quill, T.E.; Association of an educational program in mindful communication with burnout, empathy, and attitudes among primary care physicians. *Jama*. **2009**, 23;302(12):1284-93.
- Patel A, Kaur H, Xess I, Michael JS, Savio J, Rudramurthy S, Singh R, Shastri P, Umabala P, Sardana R, Kindo, A.; Capoor, M.R.; Mohan, S.; Muthu, V.; Agarwal, R.; Chakrabarti, A. A multicentre observational study on the epidemiology, risk factors, management and outcomes of mucormycosis in India. *Clin Microbiol Infect*. **2020**, 26(7): 944.e9-944.e15.
- Davies, L.; Morris, L.G.; Haymart, M.; Chen, A.Y.; Goldenberg, D.; Morris, J.; Ogilvie, J.B.; Terris, D.J.; Nettekville, J.; Wong, R.J.; Randolph, G. AACE Endocrine Surgery Scientific Committee. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Disease State Clinical Review: The Increasing Incidence of Thyroid Cancer. *Endocr Pract*. **2015** Jun;21(6):686-96.
- Agrawal, N. et al. Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell*, **2014**, v. 159, n. 3, p.676-690.
- Ricarte-Filho, J.C.M.; Kimura, E.T. O microRNA LET-7 apresenta função supressora de tumor em carcinoma papilífero da tireoide. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. **2006**. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

10. Cox, M. M.; Doudna, J. A.; O'donnell, M. *Biologia Molecular – Princípios e Técnicas*, 1ªed. Artmed, **2012**.
11. Brosius, J.; Raabe, C. A. What is an RNA? A top layer for RNA classification. *RNA. Biology*, **2016**, v. 13, n. 2, p. 140-144.
12. Zaha, A.; Ferreira, H. B.; Passaglia, L. M. P. (Org.). *Biologia molecular básica*, 5. ed. Porto Alegre: Artmed, **2014**.
13. Waters, L. S.; Storz, G. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*, **2009**, v. 136, n. 4, p. 615-628.
14. Winkler, W. C. *Riboswitches* and the role of noncoding RNAs in bacterial metabolic control. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2005**.
15. Han, Y.; Liu, L.; Fang, N.; Yang, R.; Zhou, D. Regulation of pathogenicity by noncoding RNAs in bacteria. *Future. Microbiol*, **2013**, v. 8, n. 5, p. 579-591.
16. Azhikina, T. L.; Ignatov D. V., Salina, E. G.; Fursov, M. V.; Kaprelyants, A. S. Role of Small Noncoding RNAs in Bacterial Metabolism. *Biochemistry*, Moscow, 2015v. 80, n. 13, p. 1633-1646.
17. Hüttenhofer, A.; Schattner, P.; Polacek, N. Non-coding RNAs: hope or hype? *Trends in genetics: TIG*, **2005**, 21(5), 289–297.
18. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **2004**, v. 116, n. 2, p. 281-297.
19. Wahid, F.; Shehzad, A.; Khan, T.; Kim, Y.Y. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, v. 11, p. 1231-1243.
20. Zhang, B.; Pan, X.; Cobb, G.P.; Anderson, T.A. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol*, 2006, v. 302, n. 1, p. 1-12.
21. Farazi, T.A.; Hoell, J.I.; Morozov, P.; Tuschl, T. MicroRNAs in human cancer. *Adv. Exp. Med. Biol*, **2013**, v. 774, p. 1-20.
22. Nikiforov, Y. E. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Mod. Pathol*, **2008**, v. 21 Suppl 2: S37-43.
23. Nikiforov, Y.E.; Biddinger, P.W.; Thompson, L.D (eds). Patologia diagnóstica e genética molecular da tireoide. Lippincott Williams & Wilkins, *Filadélfia*, **2012**.
24. Calin, G. A.; Dumitru, C. D.; Shimizu, M.; Bichi, R.; Zupo, S.; Noch, E.; Aldler, H.; Rattan, S.; Keating, M.; Rai, K.; Rassenti, L.; Kipps, T.; Negrini, M.; Bullrich, F; Croce, C.M. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **2002**, v. 99, n. 24, p. 15524-15529.
25. Liu, L.; Ben-Shlomo, H.; Xu, Y.X.; Stern, M.Z.; Goncharov, I.; Zhang, Y.; Michaeli, S. "The trypanosomatid signal recognition particle consists of two RNA molecules, a 7SL RNA homologue and a novel tRNA-like molecule". *The Journal of Biological Chemistry*, **2003**. v. 278, n. 20, p. 18271–18280.
26. Brow, Da.; Guthrie, C. "Spliceosomal RNA U6 é notavelmente conservado de levedura a mamíferos". *Nature*, **1988**, v. 334, n. 6179, p. 213–8.
27. Kalvari, I.; Argasinska, J.; Quinones-Olvera, N. et al. Rfam 13.0: shifting to a genome-centric resource for non-coding RNA families. *Nucleic Acids Res*, **2018**, v. 46, n. D1, p. D335-D342.
28. Roman, Benjamin R.; Morris, Luc G.; Davies, Louise. The thyroid cancer epidemic, *Current Opinion In Endocrinology & Diabetes And Obesity*, **2017**, v. 24, n. 5, p.332-336.
29. Elsherbini, N., Kim, D. H., Payne, R. J., Hudson, T., Forest, V. I., Hier, M. P., Payne, A. E., & Puztaszeri, M. P. EIF1AX mutation in thyroid tumors: a retrospective analysis of cytology, histopathology and co-mutation profiles. *Journal of otolaryngology - head & neck surgery = Le Journal d'oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale*, **2022**, 51(1), 43.
30. French, K.E.; Nikitski, A. V.; Yip, L.; Nikiforova, M. N.; Nikiforov, Y. E.; Carty, S. E. Clinicopathological features and outcomes of thyroid nodules with EIF1AX mutations. *Endocrine-related cancer*, **2022**, 29(8), 467–473.
31. Gargano, S. M.; Badjatia, N.; Nikolaus, Y.; Peiper, S. C.; Wang, Z. X. Characterization and Clinical Significance of EIF1AX Mutations and Co-Mutations in Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules: A 5-Year Retrospective Analysis. *Acta medica academica*, **2021**, 50(1), 4–12.
32. Li, Y.; Guo, L.; Ying, S.; Feng, G. H.; Zhang, Y. (2020). Transcriptional repression of p21 by EIF1AX promotes the proliferation of breast cancer cells. *Cell proliferation*, **2020**, 53(10), e12903.
33. Simões-Pereira, J.; Moura, M. M.; Marques, I. J.; Rito, M., Cabrera, R. A.; Leite, V.; Cavaco, B. M. The role of EIF1AX in thyroid cancer tumourigenesis and progression. *Journal of endocrinological investigation*, **2019**, 42(3), 313–318.

34. Nag, N., Lin, K. Y., Edmonds, K. A., Yu, J., Nadkarni, D., Marintcheva, B., Marintchev, A. eIF1A/eIF5B interaction network and its functions in translation initiation complex assembly and remodeling. *Nucleic acids research*, **2016**, 44(15), 7441–7456.
35. Scholz, S. L.; Möller, I.; Reis, H.; Süßkind, D.; van de Nes, J. A. P.; Leonardelli, S.; Schilling, B.; Livingstone, E.; Schimming, T.; Paschen, A.; Sucker, A.; Murali, R.; Steuhl, K. P.; Schadendorf, D.; Westekemper, H.; Griewank, K. G. Frequent GNAQ, GNA11, and EIF1AX Mutations in Iris Melanoma. *Investigative ophthalmology & visual science*, **2017**, 58(9), 3464–3470.
36. Robertson, A. G.; Shih, J.; Yau, C.; Gibb, E. A.; Oba, J.; Mungall, K. L.; Hess, J. M.; Uzunangelov, V.; Walter, V.; Danilova, L.; Lichtenberg, T. M.; Kucherlapati, M.; Kimes, P. K.; Tang, M.; Penson, A.; Babur, O.; Akbani, R.; Bristow, C. A.; Hoadley, K. A.; Iype, L.; Woodman, S. E. Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer cell*, **2017**, 32(2), 204–220.e15.
37. Anbalagan, D.; Yap, G.; Yuan, Y.; Pandey, V.K.; Lau, W.H, et al. Annexin-A1 Regulates MicroRNA-26b* and MicroRNA-562 to Directly Target NF- κ B and Angiogenesis in Breast Cancer Cells. *Plos One*, **2014**, v. 9, n. 12, p. e114507.
38. Zaballos, M. A.; Santisteban, P. Key signaling pathways in thyroid cancer. *The Journal of endocrinology*, **2017**, v. 235, n. 2, p. R43–R61.
39. Zhang, Z. J.; Xiao, Q.; Li, X. Y. NF- κ B-Activated miR-574 Promotes Multiple Malignant and Metastatic Phenotypes by Targeting BNIP3 in Thyroid Carcinoma. *Molecular cancer research: MCR*, **2020**, v. 18, n. 7, p. 955–967.
40. Qi, Y.; Tian, X.; Liu, J.; Han, Y.; Graham, A. M.; Simon, M. C.; Penninger, J. M.; Carmeliet, P.; LI, S. BNIP3 and AIF cooperate to induce apoptosis and cavitation during epithelial morphogenesis. *The Journal of cell biology*, **2012**, 198(1), 103–114.
41. Stella Di Stadio, C.; Faraonio, R.; Federico, A.; Altieri, F.; Rippa, E.; Arcari, P. GKN1 expression in gastric cancer cells is negatively regulated by miR-544a. *Biochimie*, **2019**, 167, 42–48.
42. Zavesky L., Jandakova E., Turyna R., Langmeierova L., Weinberger V., Minar L. Supernatant versus exosomal urinary microRNAs. Two fractions with different outcomes in gynaecological cancers. *Neoplasma*. **2016**, 63(1):121–132.
43. Abell, Bm.; Pool, M.R.; Schlenker, O.; Sinning, I.; High, S. A partícula de reconhecimento de sinal medeia o direcionamento pós-traducional em eucariotos. *O jornal EMBO*, **2004**, v. 23, n. 14, p. 2755–2764.
44. Garcia, A.C. In Silico Prediction for ncRNAs in Prokaryotes. In: MUKHTAR, S. (eds) Modeling Transcriptional Regulation. *Methods in Molecular Biology*, vol 2328. Humana, New York, NY, **2021**.
45. Nawrocki, E. P.; Kolbe, D. L.; Eddy, S. R. Infernal 1.0: inference of RNA alignments. *Bioinformatics*, **2009**, v. 25, n. 10, p. 1335–1337.
46. Nawrocki, E. P.; Eddy, S. R. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. *Bioinformatics*, **2013**, v. 29, n. 22, p. 2933–2935.
47. griffiths-Jones S. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods. Mol. Biol*, **2006**, v. 342, p. 129–138.
48. Kozomara, A.; Griffiths-Jones, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic. Acids. Res*, **2014**, v. 42.
49. Bruni, R.; Cesarone, F.; Scozzari, A.; Tardella, F. "No arbitrage and a linear portfolio selection model," *Economics Bulletin, Access Econ*, **2013**,v. 33, n. 2, p. 1247–1258.
50. Ogle, D.; Wheeler, P.; Dinno, A. Simple Fisheries Stock Assessment Methods. [S.l.]: *The Comprehensive R Archive Network*, **2019**.
51. Matloff, N. Probability and statistics for data science. Boca Raton: *CRC Press*, **2019**.
52. Fraser, Das. Introdução a Bartlett (1937) Propriedades de Suficiência e Testes Estatísticos. In: Kotz, S., Johnson, NL (eds) *Descobertas em Estatística. Série Springer em Estatística. Springer*, Nova York, NY, **1992**.
53. Sokal, R.R.; Rohlf, F.J. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. 3ª Edição, WH Freeman and Co., Nova York, **1995**.
54. Field, A. *Descobrimdo Estatísticas Usando SPSS*. 3ª Edição, Sage Publications Ltd., Londres, **2009**.
55. Shapiro, S.S; Wilk, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, **1965**, v. 52, n. 3–4, p. 591–611.
56. Montgomery, Douglas, C.; Runger, George, C. *Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros*. LTC: Rio de Janeiro, **2003**.

57. Kruskal, W.H.; Wallis, W.A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*. **1952**, v.47, n.260, p. 583-621.
58. Nemenyi, P. Distribution-Free Multiple Comparisons. **1963**.

APENDICE 3: ARTIGO – BIOSIGNALIZAÇÃO DO CANCER DE TIREOIDE

Biossinalização do câncer de tireoide

Thyroid cancer bios signaling

Señalización del bios del cáncer de tiroides

Recebido: 06/02/2022 | Revisado: 12/02/2022 | Aceito: 19/02/2022 | Publicado: 01/03/2022

Amanda Carvalho Garcia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2314-5774>
Universidade Federal do Paraná, Brasil
E-mail: amanda.ufpr@gmail.com

Teresa Cristina Cavalcanti

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8555-6547>
Universidade Federal do Paraná, Brasil
E-mail: tecava@yahoo.com.br

Luiz Martins Collaço

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3215-1650>
Universidade Federal do Paraná, Brasil
E-mail: lmcollaco@uol.com.br

Hans Graf

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8671-1556>
Universidade Federal do Paraná, Brasil
E-mail: hansgraf@bighost.com.br

Resumo

Câncer de tireoide integra subtipos que estão envolvidos em vias sinalização que resultam nas atividades biológicas, como diferenciação, proliferação, na ausência de doença e sobrevivência celular. O BRAF é um gene que codifica a proteína quinase/treonina que integra a via de sinalização MAPK\ERK, pois sinais RAF são ativados pela quinase MAPK\ERK e ativa ERK\receptores. Na revisão integrativa atual aborda os conceitos dos mecanismos da biossinalização envolvidos no câncer de tireoide. A metodologia utilizada fundamentou-se em revisar os princípios contextuais da sinalização que ocorre nos tipos de câncer de tireoide, como os fatores epidemiológicos, etiológicos e fisiológicos. Esta revisão integrativa da literatura objetiva atualizar e mostrar a importância da compreensão sobre a biossinalização do câncer de tireoide, que visa destacar o papel dos genes envolvidos em cada tipo de neoplasia maligna da tireoide. estudos proporcionam o engajamento criação de painéis de perfil de mutação genética, que evidencia fatores científicos que ajudem na compreensão da complexidade etiológica do câncer de tireoide.

Palavra-chave: Sinalização; Câncer; Tireoide; MAPK; BRAF.

Abstract

Thyroid cancer integrates subtypes that are involved in signaling pathways that result in biological activities, such as differentiation, proliferation, in the absence of disease, and cell survival. BRAF is a gene that encodes the protein kinase/threonine that integrates the MAPK\ERK signaling pathway, as RAF signals are activated by the MAPK\ERK kinase and activates ERK\receptors. The current integrative review addresses the concepts of biosignaling mechanisms involved in thyroid cancer. The methodology used was based on reviewing the contextual principles of signaling that occurs in types of thyroid cancer, such as epidemiological, etiological and physiological factors. This integrative literature review aims to update and show the importance of understanding the biosignaling of thyroid cancer, which aims to highlight the role of genes involved in each type of malignant thyroid neoplasm. studies provide the engagement creation of genetic mutation profile panels, which evidence scientific factors that help in understanding the etiological complexity of thyroid cancer.

Keywords: Signalization; Cancer; Thyroid; MAPK; BRAF.

Resumen

El cáncer de tiroides integra subtipos que están involucrados en vias de señalización que dan como resultado actividades biológicas, como diferenciación, proliferación, en ausencia de enfermedad y supervivencia celular. BRAF es un gen que codifica la proteína quinasa\treonina que integra la vía de señalización MAPK\ERK, ya que las señales RAF son activadas por la quinasa MAPK\ERK y activa los receptores ERK. La revisión integradora actual aborda los conceptos de los mecanismos de bioseñalización involucrados en el cáncer de tiroides. La metodología utilizada se basó en revisar los principios contextuales de señalización que se dan en los tipos de cáncer de tiroides, como son los factores epidemiológicos, etiológicos y fisiológicos. Esta revisión integrativa de la literatura tiene como objetivo actualizar y mostrar la importancia de comprender la bioseñalización del cáncer de tiroides, que tiene como objetivo resaltar el papel de los genes involucrados en cada tipo de neoplasia maligna de tiroides. Los estudios brindan la participación en la

creación de paneles de perfiles de mutaciones genéticas, que evidencian factores científicos que ayudan a comprender la complejidad etiológica del cáncer de tiroides.

Palabras clave: Señalización; Cáncer; Tiroides; MAPK; BRAF.

1. Introdução

O carcinoma de tireoide origina-se de única célula alterada por lesões dos genes que controlam a proliferação celular, podendo ser atribuídas características a células do parênquima tireoidiano (Hegedus, 2004). O câncer de tireoide é o 5º câncer mais prevalente em mulheres americanas dos Estados Unidos, pois a sua incidência entre 1% a 4% em relação as demais neoplasias malignas (Siegel et al., 2015; Haroon et al., 2019).

Segundo dados divulgados pelo Instituto Nacional do Cancer (INCA), o carcinoma papilífero de tireoide entre 50% e 80% dos casos, algo visto em comparação aos casos de carcinoma folicular que se estima 15% a 20% dos casos e o de células de Hürthle, além disso, os carcinomas pouco diferenciados ou indiferenciados representam cerca de 10% dos casos (INCA, 2022).

As células foliculares originam o câncer diferenciado de tireoide (CDT) e as células parafoliculares ou C que gera o carcinoma medular de tireoide (CMT) (Colin et al., 2013; Noone et al., 2017). Já os carcinomas diferenciados da tireoide (CDT) integra as neoplasias papilar e folicular: carcinoma papilífero da tireoide (PTC), o carcinoma folicular da tireoide (FTC), e o carcinoma de células de Hürthle cuja prevalência de 90 a 95% das neoplasias malignas de tireoide (Lee et al., 2021).

O carcinoma medular da tireoide (CMT) é responsável por 3% a 5% de todas as neoplasias malignas da tireoide (Cote et al., 2015; Hou, He e Chute, 2020). Na maioria dos casos de carcinomas anaplásicos são considerados mais agressivos e mais resistentes ao tratamento, ao contrário dos diferenciados e medulares que aderem com certa facilidade ao tratamento, conforme o comportamento do tumor. O carcinoma de tireoide possui uma incidência a cerca de 3% no mundo e o carcinoma anaplásico da tireoide é responsável por menos de 1% de todos os cânceres de tireoide (Gallardo et al., 2020).

O carcinoma da tireoide sendo o papilífero e o folicular originados pelo epitélio folicular, que apresentam células epiteliais cuboides dispostas em camada única e secretam coloide nos interior dos foliculos conforme ação do hormônio tireoidiano (Lee et al., 2022). Quando ocorre a perda da diferenciação celular, o tumor torna-se menos diferenciado e isso resulta na maior agressividade, o que dificulta a terapia convencional e prognóstico (Lee et al., 2022).

Nos casos de carcinomas diferenciados da tireoide (CDT) quando progride para dediferenciação celular, sendo o carcinoma diferenciado (insular) ou indiferenciado (anaplásico), resulta num imenso desafio de segmento terapeutico (Wiseman et al., 2003 a, b; Landa et al., 2016).

Nesta revisão bibliográfica abordou-se um levantamento sobre os conceitos dos mecanismos da biossinalização envolvidos no cancer de tireoide.

2. Metodologia

Para a elaboração do estudo a metodologia empregada fundamentou-se em revisar os princípios contextuais da sinalização que ocorre nos tipos de câncer de tireoide, como os fatores epidemiológicos, etiológicos e fisiológicos. Esta revisão integrativa da literatura objetiva atualizar e mostrar a importância da compreensão sobre a biossinalização do câncer de tireoide, que visa destacar o papel dos genes envolvidos em cada tipo de neoplasia maligna da tireoide. O presente trabalho é uma revisão de literatura, na qual foi realizada uma busca bibliográfica nas bases de dados Publicações Médicas (PubMed) e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) que relatavam os temas propostos de 2000 a 2022. Os descritores elegíveis utilizados foram: “câncer de tireoide”, “vias de sinalização” e “genes”. Os critérios de inclusão foram artigos que abordassem o tema da presente revisão de literatura, sem restrição de idioma, artigos de estudo in vitro, in vivo, relato de caso, revisão de literatura e livros cuja literatura proveria melhores evidências para este trabalho. Primeiramente, foram selecionados de acordo com os títulos dos trabalhos e

posteriormente analisados os resumos. Trabalhos que não apresentaram metodologia detalhada no resumo ou não correspondessem ao tema proposto foram excluídos, dessa forma, 48 artigos que se enquadravam na proposta do tema, para leitura na íntegra.

3. Resultados e discussão

3.1 Fatores estimulantes da proliferação celular tireoidiana

Os fatores de risco avaliados baseiam-se e dados clínicos e anatomopatológicos que em análises multivariadas, que revelam sua independência pelo prognóstico da doença (Lania et al., 2006; Lim et al., 2017). Os tumores considerados benignos eventualmente podem apresentar um comportamento mais agressivo (Zaballos e Santisteban, 2017). Para isso, estudos moleculares que buscam a identificação de genes expressos na adesão e disseminação celular, a expressão de oncogenes e antioncogenes (Wiseman et al., 2003 a, b; Landa et al., 2016).

O hormônio tireotrófico da hipófise (TSH), o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento transformacional (TGF- α) e fator de crescimento semelhantes a insulina (IGF) Como também, fator de crescimento fibroblasto (BFGF), gonadotropina coriônica humana (hCG), hormônio de crescimento (GH) e o hormônio de crescimento do hepatócito (HGF) (Kimura, Matsuo e Ricarte-Filho, 2007). Esses fatores podem codificar receptores específicos na célula, que uma vez ativados modificam e transmitem o sinal a outras partes da célula através de diversas vias de transdução, como da adenilciclase, proteoquinase, tirosina-quinase e cascata da fosfolipase C (Hoogen et al., 2018).

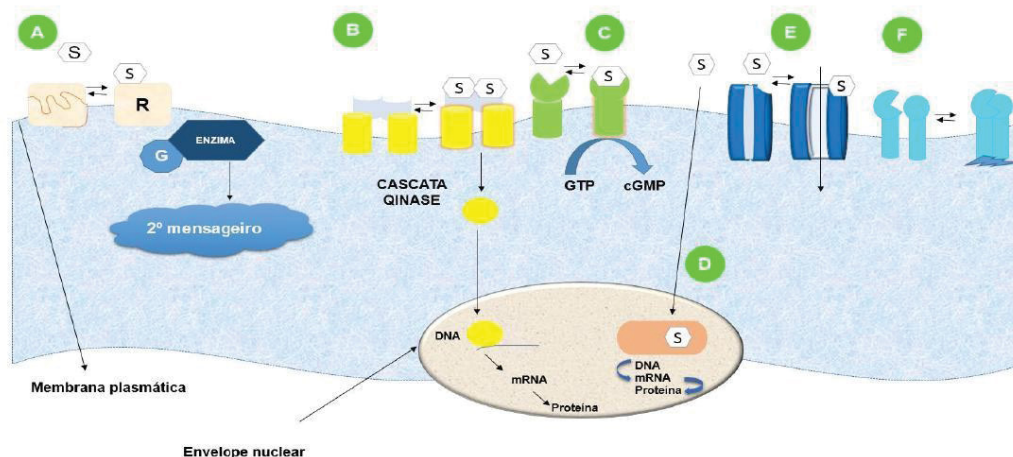
As proteínas normais codificadas pelos genes estimuladores atuam na membrana celular, no citoplasma e no núcleo. Onde a ação de receptores de fatores, tais como, proteínas envolvidas na transmissão de sinais dentro das células (mensageiros secundários), bem como proteínas reguladoras nucleares. Os oncogenes promovem o crescimento celular autônomo nas células cancerosas e suas contrapartes celulares não mutadas (proto-oncogenes) (Kopnin, 2000; Gerdes, 2002). Os oncogenes são originados através da mutação nos proto-oncogenes, caracterizadas pelo crescimento celular na ausência de sinais promotores de crescimento normais, originando produtos oncoproteínas (Nikiforov, 2008; Nikiforov et al., 2011; Yi et al., 2017).

A proliferação celular fisiológica ocorre: 1. Ligação de um fator de crescimento ao seu receptor específico; 2. Ativação transitória e limitada do receptor do fator de crescimento, o qual ativa diversas proteínas transdutoras de sinal no folheto interno da membrana plasmática; 3. Transmissão de sinal através do citosol para o núcleo por meio dos segundos mensageiros, ou pela cascata de moléculas transdutoras de sinal; 4. Indução e ativação dos fatores nucleares, reguladores que iniciam a transcrição do DNA; 5. Entrada e progressão da célula no ciclo celular, resulta na divisão celular (Nikiforov, 2008).

Os proto-oncogenes agem no controle do crescimento celular, onde mutações, rearranjos estruturais ou amplificação genéticas, podem provocar a perda do poder regulador da proliferação celular, resultando na desordem do crescimento celular (Nikiforov, 2008; Nikiforov, Nikiforova, 2011; Yi et al., 2017). Apenas um alelo do gene estimulado é suficiente para a formação do oncogene. Os genes supressores perdem seu poder inibidor, ocasionando na inativação de dois alelos (antioncogenes) (Kopnin, 2000; Gerdes, 2002).

As três classes de oncogenes uma vez ativadas na iniciação e progressão dos tumores tireoidianos, são eles: proteína G (liga ao GTP), receptores de tirosina-quinase e proteínas nucleares (Figura 1).

Figura 1 – Transdutores de sinal: A) receptor associado a proteína G, ocorre a interação do ligante externo (S) extracelular ao receptor (R), que ativa a proteína intracelular ligante de GTP (G), que regulada por uma enzima, o que resulta num segundo mensageiro. B) receptor tirosina-quinase a ligante ativa atividade tirosina-quinase através da autofosforilação. C) receptor guanilil-ciclase ocorre a interação do ligante (S) com o domínio extracelular resultando num segundo mensageiro intracelular uma guanosina trifosfato (GTP) para monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). D) receptor nuclear ligantes específicos (S), como hormônios estrogênio, altera a expressão de genes específicos. E) canal iônico na membrana plasmática possui comportas que abrem e se fecham, em resposta a interação do ligante (S) ou pelo potencial de membrana. F) receptor de adesão a molécula liga-se na matriz extracelular resultando na mudança da conformação do citoesqueleto.



Fonte: Autores (2022).

4. Receptores Associadas a Proteína G

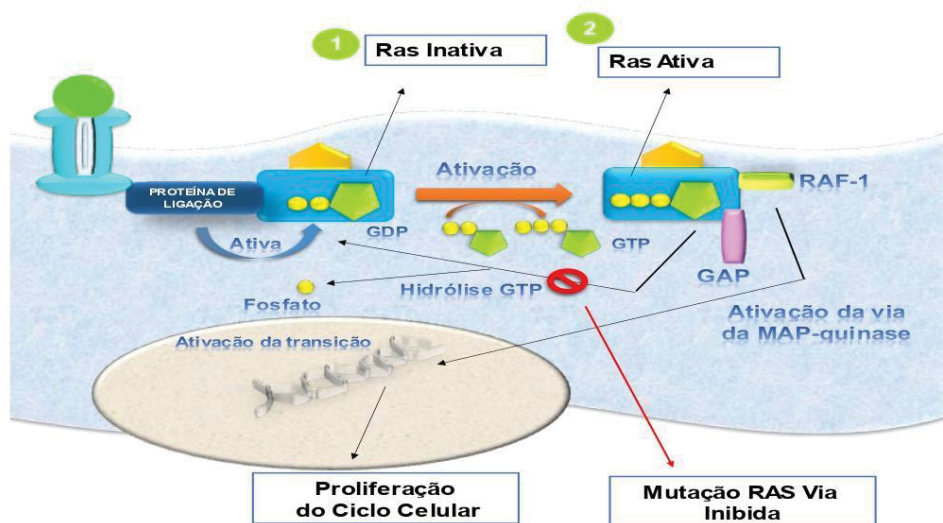
A Ras integra a família de proteínas G pequenas que se ligam a nucleotídeos permeiam várias transduções de sinal, como por exemplo, a regulação da expressão genica pela insulina através da cascata de MAP-quinases (Afzal, 2020). Os oncogenes ras é uma classe que pertencente à família (H-ras, N-ras, K-ras) proteínas de alto peso molecular. As mutações ocorrem nos códons 12, 13 e 61, são encontrados em vários tipos de tumores tireoidianos, benignos ou malignos e em lesões hiperplásicas não neoplásicas (Zaballos e Santisteban, 2017).

O gene RAS possui um papel importante nas cascatas de sinalização posteriores aos receptores de fatores de crescimento, via de sinalização MAPK, a via AKT e a via RAL GDS (Zaballos et al., 2017). As mutações no RAS representam 40 a 50% de prevalência dos casos carcinoma folicular de tireoide (Lee et al., 2021).

As proteínas RAS dependem de duas reações, sendo a primeira a troca de nucleotídeos (GDP por GTP) que ativa a proteína RAS, proporcionando a fosforilação processo pelo qual ocorre a adição de um grupo fosfato na guanosina difosfato, sendo este tornar-se a proteína hidrofóbica apolar e hidrofílica polar. E a hidrólise de GTP que converte RAS ativa, ligada ao GTP, em sua forma inativa, ligada GDP, esses processos são regulados extrinsecamente por outras proteínas (Shaul et al., 2007; Bos et al., 2007; Zaballos et al., 2017). As proteínas normais são catabolizadas pelas proteínas ativadoras da GTPase (GAP), ligam-se ao RAS ativa que aumentam atividade de GTPase em 1.000 vezes levando ao término da tradução de sinal. O GAP funciona como

freios que controlam a atividade da RAS (Zaballos e Santisteban, 2017). Onde a RAS mutada fica aprisionada em sua forma ativada de ligação GTP e a célula é forçada a ficar em um estado continuamente ativado de proliferação (Figura 2).

Figura 2 – Ativação e inativação da proteína Ras. 1) Proteínas Ras Ativa – quando proteína Ras é ativada pela GTPase (GAPs) resultando na fosforilação (adição de grupo fosfato) da GTP (guanosina trisfosfato), e na ativação da via da MAP-quinase que ativa a proliferação celular. 2) Proteínas Ras Inativa – quando ocorre a hidrólise de um grupo fosfato do GTP pela ação da GTPases retornando ao estado GDP (guanosina difosfato). A inibição da hidrólise do GTP ocorre a mutação RAS ativando a proliferação anormal.

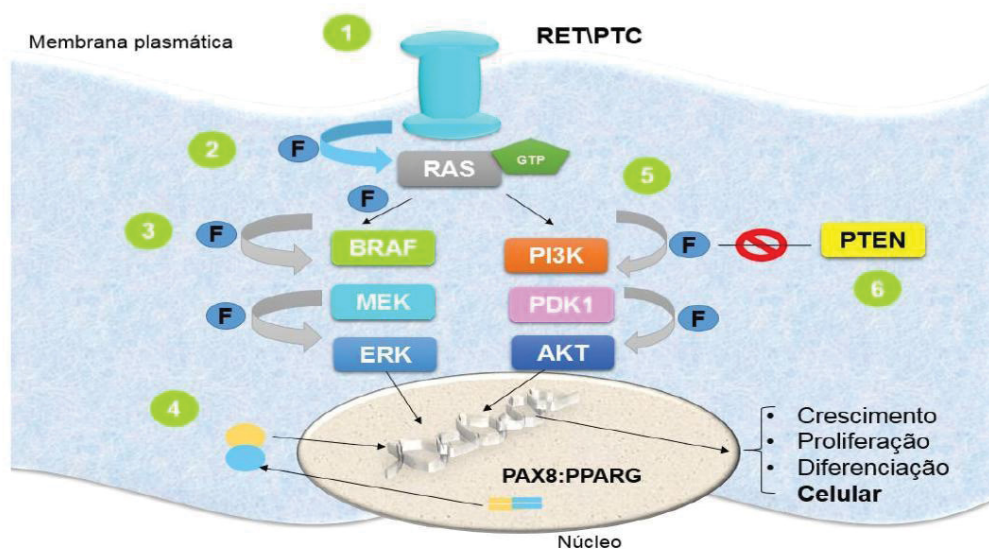


Fonte: Autores (2022).

5. Carcinoma Papilar

Em cada variante de carcinomas tireoidianos há variações genéticas. Em carcinoma tireoidiano papilar (PTC), a via de sinalização MAP-quinase é a principal na célula folicular tireoidiana que responde por estímulos de diferentes fatores de crescimento ou alteração constituída do gene RET, o qual ativa a cascata RAF\RAS\RET (Abdullah et al., 2019; Li et al., 2019). A ativação de efetores ao longo da via de sinalização MAPK, está relacionada a transformação maligna da tireoide (NIKIFOROV, 2008). As mutações pontuais ativadoras em BRAF representam 45% das alterações genéticas mais frequentes, em seguida de 20% do rearranjo do gene RET\PTC (*rearranged in transformation papillary thyroid carcinoma*), caracterizam a maioria dos carcinomas papilares (Hussain et al., 2015; Bautista, Knippler e Ringel, 2021). Já a ativação do gene RAS em PCT é menos frequente, em relação aos carcinomas foliculares, que apresentam prevalência das mutações RAS e na via de sinalização PI-3K/AKT (Figura 3).

Figura 3 – 1) Carcinoma papilar podendo ocorrer a translocação ou inversão. 2) ocorre mutações pontuais em carcinoma folicular e anaplásico. 3) ocorre mutações pontuais em carcinoma papilar. 4) ocorre translocações em carcinoma folicular. 5) ocorre mutações pontuais e amplificações em carcinoma folicular e anaplásico. 6) ocorre mutações pontuais em carcinoma folicular e anaplásico. Essas alterações genéticas resultam no crescimento, na proliferação e diferenciação celular.



O rearranjo RET/PTC, a proteína codificada pelo gene RET, é um receptor transmembrana da família tirosina-quinase (Fusco et al., 1987). O gene RET possui 21 exons, localizado na posição cromossômica 10q11-2, a proteína RET glicosilada 170 kDa é composta por 3 domínios: a primeira é domínio extracelular com uma região distal caderina-like na 4ª posição, possui uma região justa de membrana rica em cisteína, um domínio transmembrana hidrofóbica e a terceira é o domínio intracelular de atividade tirosina-quinase C (Maciel, 2002).

O proto-oncogene RET está envolvido na regulação do crescimento, na diferenciação e na migração de células de origem da crista neural. Os ligantes *glial cell-line derivial neurophilic fator* (GDNF) pertence a superfamília TGFβ, expressos a fusão do proto-oncogene RET (Maciel 2002; (Zaballos e Santisteban, 2017). A proteína oncogênica RET/PTC apresenta domínio N-terminal doada por um dos segmentos gênicos, que confere ao oncogene a propriedade de oligomerização, com a porção C-terminal do receptor tirosina-quinase RET, que perde os domínios extracelular e transmembrana, porém, retém a função tirosina-quinase do receptor, mantendo a ativação constitutiva da cascata de sinalização MAP-quinase intracelular. O rearranjo RET/PTC1 e RET/PTC3 são os mais observados em PTC, porém outras recombinações genéticas já foram descritas (Nikiforov, 2008; Lin e al., 2010; Zaballos e Santisteban, 2017).

Após a ligação ao receptor RET desencadeia a dimerização, o qual ativa a atividade quinase do receptor, ocorrendo a autofosforilação de resíduos de tirosinas dando início a sinalização intracelular, pela interação de efetores específicos nos locais de tirosinas fosforiladas (Nikiforov, 2008; Cantara et al., 2010).

O gene RET é expresso em células de linhagem neural, células C da tireoide e na medula adrenal, porém, não há expressão em células epitelial de tireoide normal. Em carcinoma medular de tireoide há alta prevalência da mutação no gene RET. O rearranjo do gene RET no PTC, origina-se da inversão intracromossômica ou da translocação intercromossômica, o que resulta

no rearranjo RET\PTC1 (Fusco et al., 1987). Esta translocação de RET\CPT representa 7% dos casos o que difere da mutação RAS (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014; Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2013).

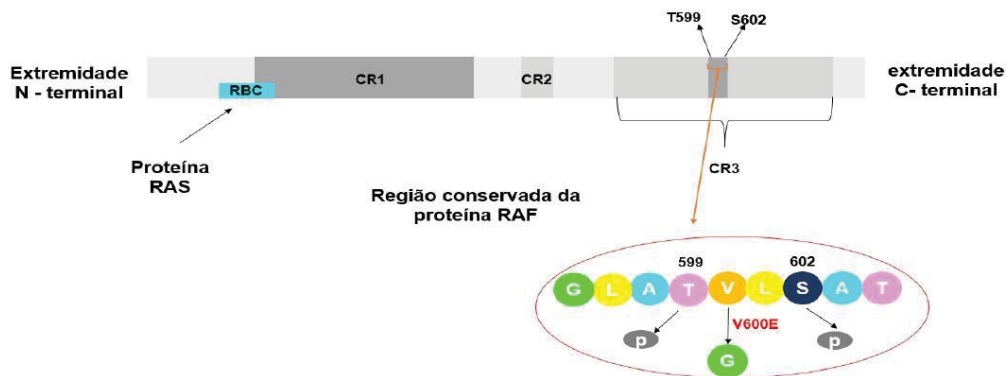
Na inversão paracêntrica do cromossomo 10, permeada pela recombinação ilegítima entre RET e o gene H4 que está 30 megabases distantes (Celetti et al., 2004). Apesar da distância linear ser grande entre eles, a recombinação RET e H4, promovida pelas proximidades no núcleo. O loci RET e H4 no núcleo interfásico pelo menos 1 par com justaposição de RET e H4, representa 35% nas células tireoidianas humanas normais, 21% em linfócitos de sangue periférico e 6% em células epiteliais de mama (Celetti et al., 2004).

A configuração espacial nuclear do RET e H4 é uma base para a geração do rearranjo RET\PTC induzida pela radiação, o que gera a quebra da dupla fita de cada gene envolvido. A radiação ionizante predispõe a carcinogênese da célula folicular tireoidiana, podendo ocorrer o evento RET\PTC, tanto em crianças ou em adultos (Celetti et al., 2004).

A mutação que ocorre no gene BRAF é somática, o que leva ativação constitutiva da reação quinase pela substituição da valina para ácido glutâmico no aminoácido 599 (V599E) (Maciel, Kimura e Cerutti, 2005). Essa mutação ocorre exclusivamente em PTC e tem prevalência seletiva para a forma clássica e a variante de células altas (Hussain et al., 2017). As formas agressivas PTC pouco diferenciados e carcinoma anaplásicos com focos de lesão papilifera tem BRAF^{V599E} sugere participação de BRAF na progressão de agressividade tumoral (Nikiforov, 2011).

Nos mamíferos apresentam as três isoformas da proteína RAF (ARAF, BRAF e CRAF) são expressos em diferentes tecidos (Robinson e Cobb, 1997). A isoforma CRAF está expressa em todas as células, já a isoforma BRAF está expressa em células hematopoiéticas, sistema nervoso, testículos e com predominância nas células foliculares tireoidianas. A proteína RAF possuem três regiões conservadas: CR1 e CR2 com N-terminal cuja função é regulatória, porque a região RBS da extremidade CR1, é onde ocorre a ligação da proteína RAS, e a extremidade CR3 possui C-terminal de domínio quinase (Figura 4) (Hussain et al., 2015).

Figura 4 - Na mutação BRAF ocorre a substituição do aminoácido valina (V) na posição 600 em cor laranja, pelo aminoácido o ácido glutâmico (G) em cor esverdeada, configurando a transversão T1999A no nucleotídeo do exon 15.



Fonte: Modificado de HUSSAIN et al., (2015).

Isoforma BRAF possui alta afinidade MEK-1 e MEK-2 é mais eficiente na fosforilação de MEK do que nas isoformas RAF (Robinson e Cobb, 1997; Maciel, 2002). A mutação BRAF^{V599E} a troca de aminoácidos ativa a proteína desestabilizando a forma inativa, resultando na fosforilação constitutiva dos aminoácidos adjacentes, propiciando uma capacidade oncogênica. Estudos em *in vitro* descrevem que a isoforma BRAF com mutação V600E tem atividade quinase basal elevada e sustenta a via

MAP-quinase e induz a transformação celular (Mitsutake et al., 2005), e não se propõe aos oncogenes RAS ou RET\CPT (Kimura et al. 2003, Soares et al. 2003)

A mutação BRAF^{V600E} representa 80% dos casos de carcinoma papilífero de tireoide (Abdullah et al., 2019). Já nos casos de carcinoma folicular da tireoide e em tumores benignos cuja mutação é ausente em sua maioria, porém a mutação BRAF pode estar presente nos casos de microcarcinomas papilares podendo resultar o início da proliferação tumoral da tireoide (Nikiforova et al. 2003).

Algumas mutações pontuais dos genes RAS podem ser encontradas em 30% dos casos em câncer humano na sua totalidade, como por exemplo, a isoforme NRAS pode ser observado em CFT presente em tumores benignos e malignos (Moura, Covaca e Leite, 2021).

6. Carcinoma Folicular

Em carcinomas foliculares ocorre mutações pontuais que ativam a via de sinalização PI-3K\AKT, resultando na ativação do gene RAS e PIK3CA, provocando a inativação do gene supressor de tumor o PTEN, o qual desempenha um papel de regulador negativa nessa via (Zaballos et al., 2017). Cerca de 10% dos casos de CFT observar-se ativação da PI3K. O aumento das mutações de RAS e PIK3CA favorece a progressão de adenomas foliculares benignos para carcinomas foliculares, como também, para carcinomas anaplásicos, devido a translocação no receptor gama (γ) que uma vez ativado via proxissima PAX8 (PPAR γ) cuja prevalência de 30 a 35% em CFT (Raman et al., 2014; Landa et al. al. 2016).

Mutações somáticas ou deleções em PTEN, são menos frequentes nas em tumores bem diferenciados (Dahia et al. 1997, Halachmi et al. 1998, Hsieh et al. 2000), porém, com a evolução molecular pode-se observar que a translocação na 10q23, o que resulta na fusão do gene homeo-box pareado PAX8, cuja importância no desenvolvimento da tireoide, com o gene PPAR γ 1 que é um receptor ativado por proliferadores de peroxissoma. Essa fusão PAX8:PPAR γ 1 (*peroxissomo proliferator-activated receptor gamma 1*) produz um receptor genético nuclear de hormônios onde ativa o crescimento celular, proliferação e diferenciação. Essa translocação atinge cerca de 20 a 60% dos casos de câncer de tireoide (YEH ET AL., 1999).

O gene supressor de tumor PTEN é uma fosfatase dupla e específica a qual está relacionada a várias desordens tireoidianas, como o bócio multinodular, adenoma da tireoide e carcinoma. Além disso, mutação na linhagem germinativa do PTEN causadora da síndrome de Cowden, desencadeia a uma desordem de no crescimento de tumores hamartomas (Lima et al., 2012). Os mecanismos epigenéticos como as alterações na via MAPK que resultam na redução na expressão da proteína e a hipermetilação do promotor PTEN, proporcionando a perda da expressão de PTEN em tumores de tiroide (Alvarez-Nunez et al. 2006).

Por outro lado, a busca pelo conhecimento dos eventos desencadeados pelo gene PTEN em tireoide, gera muita incerteza, pois ainda não está completamente elucidado os mecanismos.

7. Carcinoma Anaplásicos

São carcinomas indiferenciados do epitélio folicular tireoidiano, de alta agressividade que perdeu em sua maioria ou totalidade o tecido de origem (Carvalho e Graf, 2005), porque são difíceis de serem diferenciados. As desordens moleculares são oriundas das mutações no gene RAS ou PIK3CA, porém, podem surgir de neoplasias já existentes que possuem fatores genéticos, como a inativação da *p53* ou pela ativação da β -catenina (Saini et al., 2018).

Na maioria dos casos de carcinoma anaplásico de tireoide (CAT) está presente mutações no gene supressor tumoral o *p53* cerca de 50% a 80% (Hou et al., 2007; Santarpia et al., 2008; Nikiforova et al., 2013). Em relação a mutação RAS é observado cerca de 20% a 40% dos casos de CAT (Carling T et al., 2014).

O carcinoma anaplásico de tireoide é podem invadir outros tecidos como gordura, esôfago, traqueia e laringe, mas na fase de metástase atinge os pulmões, ossos e cérebro, representa 70% dos casos (Saini et al., 2018; Bible et al., 2021).

8. Carcinoma Medular

Nos carcinomas tireoidianos medulares é tumor neuroendócrino, decorrentes das células C que produzem calcitonina (Moura, Covaca e Leite, 2021). Considerado um tumor neuroendócrino raro cerca de 2 a 4% dos casos de câncer de tireoide, onde observa-se mutações germinativas RET arranjadas o proto-oncogene *Transfection (RET)* representa 50% dos casos (Okafor et al., 2021). Além disso, ocorrem em neoplasias endócrinas múltiplas do tipo II (MEN-2), que estão associadas as mutações nas células germinativas do proto-oncogene RET, e não nas translocações RET/PTC que são rearranjos cromossômicas. (Bim et al., 2019). Na maioria das vezes são vistos em cânceres tireoidianos medulares esporádicos não familiares cerca de 70% dos casos (Barletta JA, Nosé V, Sadow, 2021).

As mutações de RET estão envolvidos com as síndromes de neoplasia endócrina múltipla (MEN) tipo 2 MEN2A e MEN2B e carcinoma medular de tireoide familiar (CMFT), sendo que 70 mutações RET estão envolvidos, porém devido a indeterminada relação entre genótipo e fenótipo resultante do amplo leque multivariado das correlações clínicas inseridas nas diferentes famílias que apresentam essa mutação, além de dificultar tomada terapêutica integrada as síndromes (MEN) (Wells et al., 2013; Ceolin et al., 2019). Além disso, pode ocorrer novos rearranjos envolvendo o gene RET em carcinoma papilífero de tireoide CPT (Staubitz et a., 2019).

9. Considerações Finais

Estudos que integram as neoplasias de tireoide e a sinalização celular associadas a fatores genéticos, vem ampliando o conhecimento acerca das neoplasias tireoidianas. As vias de sinalização celular envolvem receptores de membrana celular que desencadeando estímulos para o meio extracelular, resultando na ativação ou inativação de uma determinada via. Compreender que os subtipos de cânceres de tireoide estão envolvidos em com algum tipo de mutação, sendo somática, germinativa, rearranjo ou translocação, reflete na importância da abordagem do diagnóstico molecular. Assim, esses estudos proporcionam o engajamento criação de painéis de perfil de mutação genética, que evidencia fatores científicos que ajudem na compreensão da complexidade etiológica do câncer de tireoide. Importante ressaltar que o presente estudo apresentou algumas limitações, devido a falta de abrangência de estudos que detalhassem com veemência de amplo detalhe as vias de sinalização do câncer de tireoide,

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Finanças 001 e ao Hamashia, J.C pelo apoio total.

Referências

- Abdullah, M. I., Junit, S. M., Ng, K. L., Jayapalan, J. J., Karikalan, B., & Hashim, O. H. (2019). Papillary Thyroid Cancer: Genetic Alterations and Molecular Biomarker Investigations. *International journal of medical sciences*, 16(3), 450–460. <https://doi.org/10.7150/ijms.29935>
- Afzal M. S. (2020). G proteins: binary switches in health and disease. *Central-European journal of immunology*, 45(3), 364–367. <https://doi.org/10.5114/ceji.2020.101271>
- Barletta, JA, Nosé, V., & Sadow, PM (2021). Genômica e Epigenômica do Carcinoma Medular de Tireóide: Da Doença Esporádica às Manifestações Familiares. *Patologia endócrina*, 32 (1), 35-43. <https://doi.org/10.1007/s12022-021-09664-3>.
- Bautista, L., Knippler, C. M., & Ringel, M. D. (2020). p21-Activated Kinases in Thyroid Cancer. *Endocrinology*, 161(8), bqaa105. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa105>.
- Bim, LV, Navarro, F., Valente, F., Lima-Junior, JV, Delcelo, R., Dias-da-Silva, MR, Maciel, R., Galante, P., & Cerutti, JM (2019). Cópias retropostas do gene RET: um evento somaticamente adquirido no carcinoma medular de tireoide. *BMC medical genomics*, 12 (1), 104. <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0552-1>
- Cancer Genome Atlas Research Network (2014). Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*, 159(3), 676–690. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.050>

- Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein, JN, Collisson, EA, Mills, GB, Shaw, KR, Ozenberger, BA, Ellrott, K, Shmulevich, I, Sander, C., & Stuart, JM (2013). O projeto de análise Pan-Cancer do Atlas do Genoma do Câncer. *Genética da natureza*, 45 (10), 1113-1120. <https://doi.org/10.1038/ng.2764>
- Cantara, S., Capezzone, M., Marchisotta, S., Capuano, S., Busonero, G., Toft, P., Di Santo, A., Caruso, G., Carli, A. F., Briili, L., Montanaro, A., & Pacini, F. (2010). Impact of proto-oncogene mutation detection in cytological specimens from thyroid nodules improves the diagnostic accuracy of cytology. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 95(3), 1365-1369. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-2103>
- Celetti, A., Cerrato, A., Merolla, F., Vitagliano, D., Vecchio, G., & Grieco, M. (2004). H4(D10S170), um gene frequentemente rearranjado com RET em carcinomas papilares de tireoide: caracterização funcional. *Oncogene*, 23 (1), 109-121. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206981>
- Ceolin, L., Duval, M., Benini, AF, Ferreira, CV, & Maia, AL (2019). Carcinoma medular de tireoide além da cirurgia: avanços, desafios e perspectivas. *Câncer endócrino*, 26 (9), R499-R518. <https://doi.org/10.1530/ERC-18-0574>
- Cohen, Y., Xing, M., Mambo, E., Guo, Z., Wu, G., Trink, B., Beller, U., Westra, W. H., Ladenson, P. W., & Sidransky, D. (2003). BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(8), 625-627. <https://doi.org/10.1093/jnci/95.8.625>
- Colin, I. M., Deneff, J. F., Lengelé, B., Many, M. C., & Gérard, A. C. (2013). Recent insights into the cell biology of thyroid angiofollicular units. *Endocrine reviews*, 34(2), 209-238. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1015>
- Cote, G. J., Grubbs, E. G., & Hofmann, M. C. (2015). Thyroid C-Cell Biology and Oncogenic Transformation. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer*, 204, 1-39. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22542-5_1
- Duh, QY, & Grossman, RF (1995). Fatores de crescimento da tireoide, vias de transdução de sinal e oncogenes. *As clínicas cirúrgicas da América do Norte*, 75 (3), 421-437. [https://doi.org/10.1016/s0039-6109\(16\)46631-4](https://doi.org/10.1016/s0039-6109(16)46631-4)
- Fusco, A., Grieco, M., Santoro, M., Berlingieri, MT, Pilotti, S., Pierotti, MA, Della Porta, G., & Vecchio, G. (1987). Um novo oncogene em carcinomas papilares de tireoide humanos e suas metástases linfonodais. *Nature*, 328 (6126), 170-172. <https://doi.org/10.1038/328170a0>
- Gerdes AM (2002). Cancer genetic. En oversigt over onkologisk molekylærbiologi set i relation til det humane genom [Genética do câncer. Uma revisão da biologia molecular oncológica vista em relação ao genoma humano]. *Ugeskrift para laeger*, 164 (22), 2865-2871.
- Carvalho, GA., Graf H. (2005). Anaplastic thyroid carcinoma. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 49 (5).
- Haroon Al Rasheed, M. R., & Xu, B. (2019). Molecular Alterations in Thyroid Carcinoma. *Surgical pathology clinics*, 12(4), 921-930. <https://doi.org/10.1016/j.path.2019.08.002>
- Hegedus L. (2004). Clinical practice. The thyroid nodule. *The New England journal of medicine*, 351(17), 1764-1771. <https://doi.org/10.1056/NEJMp031436>
- Hou, P., Liu, D., Shan, Y., Hu, S., Studeman, K., Condouris, S., Wang, Y., Trink, A., El-Naggar, A. K., Tallini, G., Vasko, V., & Xing, M. (2007). Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(4), 1161-1170. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1125>
- Hou, Y., He, X., & Chute, D. J. (2020). Paraganglioma-like medullary thyroid carcinoma: A case report and literature review. *Diagnostic cytopathology*, 48(6), 559-563. <https://doi.org/10.1002/dc.24403>
- Hussain, MR, Baig, M., Mohamoud, HS, Ulhaq, Z., Hoessli, DC, Khogeer, GS, Al-Sayed, RR, & Al-Aama, JY (2015). Gene BRAF: Dos cânceres humanos às síndromes de desenvolvimento. *Revista saudita de ciências biológicas*, 22 (4), 359-373. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.10.002>
- Instituto Nacional de Câncer (2022). Câncer de tireoide <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-tireoide>
- Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu, et al. - High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*, 2003, 63(7):1454-1457.
- Kimura, ET., Matsuo, S. E., & Ricarte-Filho, J. C. (2007). TGFbeta, activina e sinalização SMAD em câncer de tireoide [TGFbeta, activin and SMAD signalling in thyroid cancer]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 51(5), 683-689. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302007000500005>
- Kopnin B. P. (2000). Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry. Biokhimiia*, 65(1), 2-27.
- Landa, I., Ibrahimipasic, T., Boucai, L., Sinha, R., Knauf, J. A., Shah, R. H., Dogan, S., Ricarte-Filho, J. C., Krishnamoorthy, G. P., Xu, B., Schultz, N., Berger, M. F., Sander, C., Taylor, B. S., Ghossein, R., Ganly, I., & Fagin, J. A. (2016). Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *The Journal of clinical investigation*, 126(3), 1052-1066. <https://doi.org/10.1172/JCI85271>
- Lania, AG, Mantovani, G., & Spada, A. (2006). Mecanismos da doença: Mutações de proteínas G e receptores acoplados à proteína G em doenças endócrinas. *Prática clínica da natureza. Endocrinologia e metabolismo*, 2 (12), 681-693. <https://doi.org/10.1038/ncpendmet0324>
- Lee, K., Anastasopoulou, C., Chandran, C., & Cassaro, S. (2021). Thyroid Cancer. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Lí, AY, McCusker, MG, Russo, A., Scilla, KA, Gittens, A., Arensmeyer, K., Mehra, R., Adamo, V., & Rolfo, C. (2019). Fusões RET em tumores sólidos. *Revisões de tratamento do câncer*, 81, 101911. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101911>
- Lim, H., Devesa, SS, Sosa, JA, Check, D., & Kitahara, CM (2017). Tendências na incidência e mortalidade por câncer de tireoide nos Estados Unidos, 1974-2013. *JAMA*, 317 (13), 1338-1348. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.2719>
- MACIEL RMB. (2002). Molecular Thyroid Tumorigenesis: Implications for The Clinical Practice. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 46 (4); doi.org/10.1590/S0004-27302002000400009.

- Lin, P.Y., Yu, S.L. e Yang, P.C. (2010). MicroRNA no câncer de pulmão. *Jornal britânico de câncer*, 103 (8), 1144-1148. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605901>.
- Moura, M.M., Cavaco, B.M., & Leite, V. (2015). Proto-oncogene RAS em carcinoma medular de tireoide. *Câncer relacionado ao endócrino*, 22 (5), R235-R252. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0070>
- Nikiforov YE (2008). Carcinoma de tireóide: vias moleculares e alvos terapêuticos. *Patologia moderna: um jornal oficial dos Estados Unidos e da Academia Canadense de Patologia, Inc.*, 21 Suppl 2 (Suppl 2), S37-S43. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.10>
- Nikiforov, Y.E., & Nikiforova, M.N. (2011). Genética molecular e diagnóstico de câncer de tireóide. *Revisões da natureza. Endocrinologia*, 7 (10), 569-580. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.142>
- Nikiforova, M.N., Wald, A.I., Roy, S., Durso, M.B., & Nikiforov, Y.E. (2013). Painel de sequenciamento de próxima geração direcionado (ThyroSeq) para detecção de mutações no câncer de tireoide. *O Jornal de endocrinologia clínica e metabolismo*, 98 (11), E1852-E1860. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2292>
- Noone, A. M., Cronin, K. A., Altekruze, S. F., Howlader, N., Lewis, D. R., Petkov, V. I., & Penberthy, L. (2017). Cancer Incidence and Survival Trends by Subtype Using Data from the Surveillance Epidemiology and End Results Program, 1992-2013. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 26(4), 632-641. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-16-0520>
- Okafor, C., Hogan, J., Raygada, M., Thomas, B. J., Akshintala, S., Glod, J. W., & Del Rivero, J. (2021). Update on Targeted Therapy in Medullary Thyroid Cancer. *Frontiers in endocrinology*, 12, 708949. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.708949>
- Park, S.Y., Kim, H.I., Kim, J.H., Kim, J.S., Oh, Y.L., Kim, S.W., Chung, J.H., Jang, H.W. e Kim, T.H. (2018). Significado prognóstico da extensão extratireoidiana macroscópica invadindo apenas os músculos da alça no carcinoma diferenciado de tireoide. *The British Journal of Surgery*, 105 (9), 1155-1162. <https://doi.org/10.1002/bjs.10830>
- Raman, P., & Koenig, R. J. (2014). Pax-8-PPAR- γ fusion protein in thyroid carcinoma. *Nature reviews. Endocrinology*, 10(10), 616-623. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.115>
- Saini, S., Tulla, K., Maker, A. V., Burman, K. D., & Prabhakar, B. S. (2018). Therapeutic advances in anaplastic thyroid cancer: a current perspective. *Molecular cancer*, 17(1), 154. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0903-0>
- Shaul, Y. D., & Seger, R. (2007). The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(8), 1213-1226. <https://doi.org/10.1016/j.bbancr.2006.10.005>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(1), 5-29. <https://doi.org/10.3322/caac.21254>
- Staubitz, J.I., Schad, A., Springer, E., Rajalingam, K., Lang, H., Roth, W., Hartmann, N., & Mùsholt, T.J. (2019). Novos rearranjos envolvendo o gene RET em carcinoma papilífero de tireoide. *Genética do câncer*, 230, 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2018.11.002>
- Hoogen, V.D., D. J., Meijer, H., Seidl, M. F., & Govers, F. (2018) The Ancient Link between G-Protein-Coupled Receptors and C-Terminal Phospholipid Kinase Domains. *mBio*, 9(1), e02119-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02119-17>
- Wells, S.A., Jr, Pacini, F., Robinson, B.G., & Santoro, M. (2013). Neoplasia endócrina múltipla tipo 2 e carcinoma medular de tireoide familiar: uma atualização. *O Jornal de endocrinologia clínica e metabolismo*, 98 (8), 3149-3164. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1204>
- Wiseman, S. M., Loree, T. R., Hicks, W. L., Jr, Rigual, N. R., Winston, J. S., Tan, D., Anderson, G. R., & Stoler, D. L. (2003). Anaplastic thyroid cancer evolved from papillary carcinoma: demonstration of anaplastic transformation by means of the inter-simple sequence repeat polymerase chain reaction. *Archives of otolaryngology-head & neck surgery*, 129(1), 96-100. <https://doi.org/10.1001/archotol.129.1.96>
- Wiseman, S. M., Loree, T. R., Rigual, N. R., Hicks, W. L., Jr, Douglas, W. G., Anderson, G. R., & Stoler, D. L. (2003). Anaplastic transformation of thyroid cancer: review of clinical, pathologic, and molecular evidence provides new insights into disease biology and future therapy. *Head & neck*, 25(8), 662-670. <https://doi.org/10.1002/hed.10277>
- Yi, H. S., Chang, J. Y., Kim, K. S., & Shong, M. (2017). Oncogenes, mitochondrial metabolism, and quality control in differentiated thyroid cancer. *The Korean journal of internal medicine*, 32(5), 780-789. <https://doi.org/10.3904/kjim.2016.420>
- Zaballos, M. A., & Santisteban, P. (2017). Key signaling pathways in thyroid cancer. *The Journal of endocrinology*, 235(2), R43-R61. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0266>

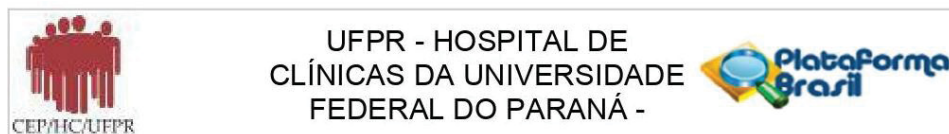
APENDICE 4 – mRNAs alvos do mir-562

Gene	Gene Description	HGNC ID
EYA1	EYA transcriptional coactivator and phosphatase 1	HGNC:3519
MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	HGNC:7029
PSEN1	presenilin 1	HGNC:9508
ZDHHC21	zinc finger DHHC-type palmitoyltransferase 21	HGNC:20750
PDE3B	phosphodiesterase 3B	HGNC:8779
GLCE	glucuronic acid epimerase	HGNC:17855
MLANA	melan-A	HGNC:7124
THAP1	THAP domain containing 1	HGNC:20856
ZFAND4	zinc finger AN1-type containing 4	HGNC:23504
POLDIP2	DNA polymerase delta interacting protein 2	HGNC:23781
C9orf78	chromosome 9 open reading frame 78	HGNC:24932
ZNF449	zinc finger protein 449	HGNC:21039
ZC3H10	zinc finger CCCH-type containing 10	HGNC:25893
TSPAN3	tetraspanin 3	HGNC:17752
SLC23A1	solute carrier family 23 member 1	HGNC:10974
LRRC58	leucine rich repeat containing 58	HGNC:26968
LATS2	large tumor suppressor kinase 2	HGNC:6515
CASP3	caspase 3	HGNC:1504
REXO2	RNA exonuclease 2	HGNC:17851
TMEM245	transmembrane protein 245	HGNC:1363
KAT7	lysine acetyltransferase 7	HGNC:17016
FOXP3	forkhead box N3	HGNC:1928
COL4A1	collagen type IV alpha 1 chain	HGNC:2202
ZBED3	zinc finger BED-type containing 3	HGNC:20711
ACTRT3	actin related protein T3	HGNC:24022
ZNF622	zinc finger protein 622	HGNC:30958
FICD	FIC domain protein adenyltransferase	HGNC:18416
FGF2	fibroblast growth factor 2	HGNC:3676
CCNT1	cyclin T1	HGNC:1599
SLC2A3	solute carrier family 2 member 3	HGNC:11007
EIF1AX	eukaryotic translation initiation factor 1A X-linked	HGNC:3250
TRMO	tRNA methyltransferase O	HGNC:30967
RPL4	ribosomal protein L4	HGNC:10353
TCF23	transcription factor 23	HGNC:18602
PSAT1	phosphoserine aminotransferase 1	HGNC:19129
PPIL1	peptidylprolyl isomerase like 1	HGNC:9260
EIF4H	eukaryotic translation initiation factor 4H	HGNC:12741
NHSL2	NHS like 2	HGNC:33737
WDR97	WD repeat domain 97	HGNC:26959
MPLKIP	M-phase specific PLK1 interacting protein	HGNC:16002

HAUS3	HAUS augmin like complex subunit 3	HGNC:28719
SLC9A7	solute carrier family 9 member A7	HGNC:17123
MED13	mediator complex subunit 13	HGNC:22474
RALGAPB	Ral GTPase activating protein non-catalytic subunit beta	HGNC:29221
BASP1	brain abundant membrane attached signal protein 1	HGNC:957
SNX5	sorting nexin 5	HGNC:14969
FRAT2	FRAT regulator of WNT signaling pathway 2	HGNC:16048
TRIM59	tripartite motif containing 59	HGNC:30834
CBY1	chibby family member 1, beta catenin antagonist	HGNC:1307
SOX6	SRY-box transcription factor 6	HGNC:16421
RECK	reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs	HGNC:11345
PTPDC1	protein tyrosine phosphatase domain containing 1	HGNC:30184
FOXO1	forkhead box O1	HGNC:3819
CYP26B1	cytochrome P450 family 26 subfamily B member 1	HGNC:20581
REST	RE1 silencing transcription factor	HGNC:9966
MAP1B	microtubule associated protein 1B	HGNC:6836
EIF4G2	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	HGNC:3297
PGBD4	piggyBac transposable element derived 4	HGNC:19401
CAMK1D	calcium/calmodulin dependent protein kinase ID	HGNC:19341
NTMT1	N-terminal Xaa-Pro-Lys N-methyltransferase 1	HGNC:23373
SIGLEC9	sialic acid binding Ig like lectin 9	HGNC:10878
ANGEL1	angel homolog 1	HGNC:19961
CYB5A	cytochrome b5 type A	HGNC:2570
PTAFR	platelet activating factor receptor	HGNC:9582
INTU	inturned planar cell polarity protein	HGNC:29239
IKZF3	IKAROS family zinc finger 3	HGNC:13178
DSTYK	dual serine/threonine and tyrosine protein kinase	HGNC:29043
RBFOX1	RNA binding fox-1 homolog 1	HGNC:18222
ASB16	ankyrin repeat and SOCS box containing 16	HGNC:19768
RGS17	regulator of G protein signaling 17	HGNC:14088
RPL37	ribosomal protein L37	HGNC:10347
GTF2H2C	GTF2H2 family member C	HGNC:31394
LRRRC27	leucine rich repeat containing 27	HGNC:29346
ICA1L	islet cell autoantigen 1 like	HGNC:14442
GTF2H2	general transcription factor IIH subunit 2	HGNC:4656
DCP1A	decapping mRNA 1A	HGNC:18714
SPIC	Spi-C transcription factor	HGNC:29549
SLC1A5	solute carrier family 1 member 5	HGNC:10943
PLPP3	phospholipid phosphatase 3	HGNC:9229
PDCD4	programmed cell death 4	HGNC:8763
PURB	purine rich element binding protein B	HGNC:9702
NMNAT1	nicotinamide nucleotide adenyltransferase 1	HGNC:17877

BLOC1S3	biogenesis of lysosomal organelles complex 1 subunit 3	HGNC:20914
TAF1D	TATA-box binding protein associated factor, RNA polymerase I subunit D	HGNC:28759
ORAI2	ORAI calcium release-activated calcium modulator 2	HGNC:21667
ACAD8	acyl-CoA dehydrogenase family member 8	HGNC:87
ISG20L2	interferon stimulated exonuclease gene 20 like 2	HGNC:25745
GPN2	GPN-loop GTPase 2	HGNC:25513
CREM	cAMP responsive element modulator	HGNC:2352
NRIP1	nuclear receptor interacting protein 1	HGNC:8001
NDUFS3	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S3	HGNC:7710
EIF5A2	eukaryotic translation initiation factor 5A2	HGNC:3301
RCC2	regulator of chromosome condensation 2	HGNC:30297
EXO5	exonuclease 5	HGNC:26115
CCDC152	coiled-coil domain containing 152	HGNC:34438
XPNPEP3	X-prolyl aminopeptidase 3	HGNC:28052
WWC1	WW and C2 domain containing 1	HGNC:29435
ESS2	ess-2 splicing factor homolog	HGNC:16817
KCTD20	potassium channel tetramerization domain containing 20	HGNC:21052
NEMP2	nuclear envelope integral membrane protein 2	HGNC:33700
SFN	stratifin	HGNC:10773
C11orf98	chromosome 11 open reading frame 98	HGNC:51238
C3	complement C3	HGNC:1318
CDC14B	cell division cycle 14B	HGNC:1719
ECHDC3	enoyl-CoA hydratase domain containing 3	HGNC:23489
GJC1	gap junction protein gamma 1	HGNC:4280
GMEB1	glucocorticoid modulatory element binding protein 1	HGNC:4370
KIF3A	kinesin family member 3A	HGNC:6319
MARVELD3	MARVEL domain containing 3	HGNC:30525
MSRB2	methionine sulfoxide reductase B2	HGNC:17061
PROSER2	proline and serine rich 2	HGNC:23728
RABL3	RAB, member of RAS oncogene family like 3	HGNC:18072
SLC43A2	solute carrier family 43 member 2	HGNC:23087
SPIB	Spi-B transcription factor	HGNC:11242
THAP6	THAP domain containing 6	HGNC:23189
TLR10	toll like receptor 10	HGNC:15634
TNFAIP8L1	TNF alpha induced protein 8 like 1	HGNC:28279
TOR1AIP1	torsin 1A interacting protein 1	HGNC:29456
TPMT	thiopurine S-methyltransferase	HGNC:12014
TXNL4A	thioredoxin like 4A	HGNC:30551
TNFSF10	TNF superfamily member 10	HGNC:11925
SEC14L6	SEC14 like lipid binding 6	HGNC:40047

ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE microRNAs E IDENTIFICAÇÃO DA MUTAÇÃO BRAFV600E EM PUNÇÕES CITOPATOLÓGICAS DE TIREÓIDE DA CATEGORIA BETHESDA III E IV.

Pesquisador: Hans Graf

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 84075318.2.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa:

Data do Envio: 01/07/2019

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.527.405

Apresentação da Notificação:

Trata-se de um relatório parcial de um estudo prospectivo com pacientes do ambulatório do Serviço de Endocrinologia e Metabologia de Hospital de Clínicas (SEMPR).

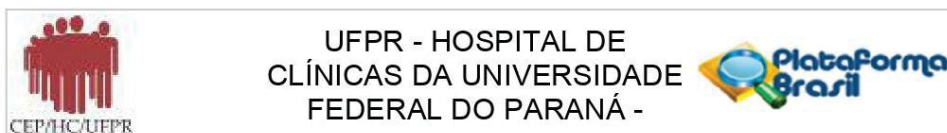
Foram selecionados até o momento 60 amostras de punção aspirativa de tireoide, dentro do critério de inclusão Bethesda III e IV. Por ser um estudo prospectivo, conforme a entrada de casos Bethesda III e IV, estão em seguimento.

Os pesquisadores relatam atrasos na compra de reagente, devido a falta de fomento e também relatam a inclusão de casos alguns Bethesda II, VI e V para controle negativo e positivo nos ensaios experimentais, que foi relatado através de uma emenda.

Objetivo da Notificação:

Apresentar relatório parcial

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.527.405

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem relato de alterações em relação ao projeto original

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Notificação adequada

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

termos presentes

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Notificação aprovada

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da Notificação. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivados.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	relatorio.doc	01/07/2019 14:13:03	Hans Graf	Postado
Envio de Relatório Parcial	Parcial.pdf	01/07/2019 14:15:16	Hans Graf	Postado

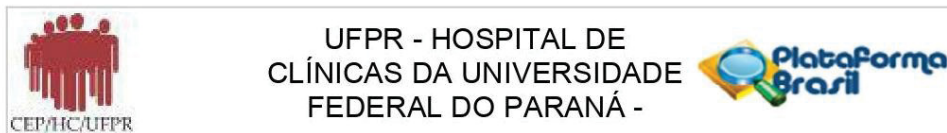
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.527.405

CURITIBA, 23 de Agosto de 2019

Assinado por:
maria cristina sartor
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO E LIVRE ESCLARECIMENTO



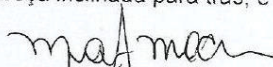
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Dr. Hans Graf, Dra. Teresa Cristina Santos Cavalcanti, Dr. Luiz Martins Collaço e Amanda Carvalho Garcia, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando (o Senhor, a Senhora, você) com diagnóstico inicial para doença nodular de tireoide a participar de um estudo intitulado “CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE microRNAs E IDENTIFICAÇÃO DA MUTAÇÃO BRAF^{V600E} EM PUNÇÕES CITOPATOLÓGICAS DE TIREOIDE DA CATEGORIA BETHESDA III E IV”.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a frequência da mutação do gene *BRAF* e identificar sequências curtas de RNAs em amostras colhidas por punção aspirativa com agulha fina de pacientes com doença nodular tireoidiana de etiologia a esclarecer e avaliar a contribuição adicional que a pesquisa poderá trazer na detecção em casos ditos indeterminados. A glândula tireoide está localizada na frente do pescoço, logo acima da linha do pescoço e tem a forma de uma borboleta, com dois lóbulos em ambos os lados do pescoço ligado por uma faixa estreita de tecido. Nódulos ou anormalidades no corpo são muitas vezes detectados por exames de imagem. No entanto, nem sempre é possível dizer a partir desses exames de imagem se um nódulo é benigno (não-cancerosos) ou maligno. A punção por agulha fina da tireoide, envolve a remoção de algumas células da tireoide, um procedimento menos invasivo e examiná-los posteriormente sob um microscópio para determinar um diagnóstico.

Caso você participe da pesquisa, será necessário ceder uma das lâminas das punções de tireoide, durante os dias que vier ao ambulatório de procedimentos de punção de tireoide no Serviço de Endocrinologia e Metabologia da Universidade Federal do Paraná – SEMPR. Para tanto você deverá comparecer no ambulatório de procedimentos de punção de tireoide – no Serviço de Endocrinologia e Metabologia da Universidade Federal do Paraná para consultas de procedimentos de punções de tireoide com o médico (a) endocrinologista e com pesquisadora que é doutoranda em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná.

Alguns riscos podem relacionados ao estudo podem ser: Durante o procedimento, você vai deitar sobre suas costas com um travesseiro sob seus ombros, sua cabeça inclinada para trás, e seu pescoço estendido.


MARIA TEREZA MOCELIN
 Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
 em Saúde Humana do HC UFPR
 Matrícula 7492

Rubricas: Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____ Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____



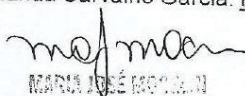
Esta posição faz com que seja mais fácil para o endocrinologista para acessar a glândula tireoide. Você pode sentir alguma pressão sobre o pescoço do transdutor do equipamento de ultrassom e um leve desconforto quando a agulha é inserida para alcançar as células da tireoide. Você será solicitado a permanecer imóvel e não tossir, falar, engolir ou fazer um som apenas durante a inserção da agulha fina. Instruções dos cuidados posteriores podem variar, mas geralmente você pode retomar suas atividades normais, como se nada houvesse ocorrido. O local da punção dificilmente pode ficar dolorido, geralmente é relatado apenas um desconforto durante o procedimento.

Os benefícios esperados com essa pesquisa são: auxiliar no diagnóstico inicial na avaliação da doença nodular da tireoide, reduzir a necessidade de cirurgia da tireoide, proporcionar prognóstico satisfatório nos achados citológicos indeterminados da tireoide, como também compreender as alterações celulares a nível molecular. No entanto, você poderá contribuir para o avanço do conhecimento científico desta classificação ditas atípicas de resultado indeterminado.

Os pesquisadores Prof. Dr. Hans Graf e Amanda Carvalho Garcia, responsáveis pelo estudo, poderão ser contados pelo telefone fixo (41) 2141-1730, (segunda às sextas-feiras das 8:00 às 16:00), telefone celular (41) 991992924 (24 horas) ou pelos e-mails hansgraf@bigghost.com.br e amanda.ufpr@gmail.com para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações caso queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP/HC/UFPR pelo Telefone 3360-1041. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado.

As informações relacionadas ao estudo poderão conhecidas por pessoas autorizadas o Dr. Hans Graf, Dra. Teresa Cristina Santos Cavalcanti, Dr. Luiz Martins Collaço e Amanda Carvalho Garcia. No entanto, se qualquer informação for


 MARIA JOSÉ ROSOLEN
 Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
 em Seres Humanos do HC/UFPR
 Matrícula 7452

Rubricas:
 Participante da Pesquisa e /ou responsável
 legal _____
 Pesquisador Responsável ou quem aplicou o
 TCLE _____



divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que **a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.**

As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Garantimos o ressarcimento e indenização, garantia de esclarecimento, sigilo e liberdade de recusa, caso houver. Você terá a garantia de que problemas como: desconforto do procedimento da punção por agulha fina decorrentes do estudo serão tratados no ambulatório no ambulatório de procedimentos de punção de tireoide – no Serviço de Endocrinologia e Metabologia da Universidade Federal do Paraná. Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios e os tratamentos alternativos. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento no ambulatório de procedimentos de punção de tireoide – no Serviço de Endocrinologia e Metabologia da Universidade Federal do Paraná. Eu fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema dos relacionados no item ao desconforto da punção aspirativa por agulha fina. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Nome e Assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal)
Local e data.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do Participante

(Nome e Assinatura do Pesquisador ou quem aplicou o TCLE)
Local e data.

mej mca
MARTA DE MOURA
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
em Saúde Humana do UFPR
Protocolo 7402

ANEXO 1 – PROTOCOLO PAAF


PROTOCOLO DE PAAF DE TIREÓIDE
EXAME N°
Elementos Tireoidianos:

Colóide:	<input type="checkbox"/> Ausente Presente: <input type="checkbox"/> Escasso <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Abundante <input type="checkbox"/> Aquoso <input type="checkbox"/> Espesso <input type="checkbox"/> "Bubble gum"
Células Foliculares:	<input type="checkbox"/> Ausentes Presentes: <input type="checkbox"/> Discreto <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Acentuado Atipia: <input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Presente Arranjo: <input type="checkbox"/> Dissociadas <input type="checkbox"/> Lençóis em Monocamada <input type="checkbox"/> Macrofolículos <input type="checkbox"/> Papilas <input type="checkbox"/> Trabéculas <input type="checkbox"/> Microfolículos <input type="checkbox"/> Outro: _____
Células Oxifílicas Oncocíticas:	<input type="checkbox"/> Ausentes Presentes: <input type="checkbox"/> Discreto <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Acentuado Atipia: <input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Presente Arranjo: <input type="checkbox"/> Dissociadas <input type="checkbox"/> Lençóis em Monocamada <input type="checkbox"/> Macrofolículos <input type="checkbox"/> Papilas <input type="checkbox"/> Trabéculas <input type="checkbox"/> Microfolículos <input type="checkbox"/> Outro: _____
Células C Parafoliculares	
Características Celulares	<input type="checkbox"/> Pseudoinclusões <input type="checkbox"/> "Grooving" <input type="checkbox"/> Nucléolos <input type="checkbox"/> Grânulos metacromáticos <input type="checkbox"/> Outras: _____
Outros tipos celulares	

Células Inflamatórias:

Macrófagos:	<input type="checkbox"/> Ausentes Presentes: <input type="checkbox"/> Discreto <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Acentuado <input type="checkbox"/> Arranjo Especial Rosetóide <input type="checkbox"/> Histiócitos com atividade macrofágica <input type="checkbox"/> Células gigantes multinucleadas
Linfócitos:	<input type="checkbox"/> Ausentes Presentes: <input type="checkbox"/> Discreto <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Acentuado <input type="checkbox"/> Monótonos/Atípicos <input type="checkbox"/> Estádios Variados
Plasmócitos:	<input type="checkbox"/> Ausentes <input type="checkbox"/> Presentes
Neutrófilos:	<input type="checkbox"/> Ausentes <input type="checkbox"/> Presentes

Outros Achados:

Estroma Denso:	<input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Presente
Necrose:	<input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Presente
Calcificação:	<input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Presente

Diagnóstico:

Categoria _____ do Sistema de Bethesda

Nota:

Protocolo idealizado por:

Dra. Teresa Cristina Santos Cavalcanti, Dr. Arthur Coneliani Gentili, Dr. Fabricio Machado Marques, Dr. Mauricio Lirani Antonello