



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

SINDEVAL JOSÉ DA SILVA

**NOVA PLATAFORMA DIAGNÓSTICA PARA AUXILIAR NA DETECÇÃO DO
CÂNCER DE TIREÓIDE**

UBERLÂNDIA - MG
2017

SINDEVAL JOSÉ DA SILVA

**NOVA PLATAFORMA DIAGNÓSTICA PARA AUXILIAR NA DETECÇÃO DO
CÂNCER DE TIREÓIDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito obrigatório para obter o título de Doutor.

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento de biomarcadores para doenças crônico-degenerativas e infecciosas.

Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Co-orientadores: Dr. Paulo Tannús Jorge
Dra. Carolina Fernandes Reis

**UBERLÂNDIA - MG
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586n
2017 Silva, Sindeval José da,
Nova plataforma diagnóstica para auxiliar na detecção do câncer de
tireóide / Sindeval José da Silva. - 2017.
f. : il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.
Coorientadores: Paulo Tannús Jorge e Carolina Fernandes Reis.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Tireóide - Câncer - Teses. 3.
Citometria de fluxo - Teses. 4. Marcadores biológicos de tumor - Teses.
I. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962- II. Jorge, Paulo Tannús. III. Reis,
Carolina Fernandes. IV. Universidade Federal de Uberlândia. Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. V. Título.

SINDEVAL JOSÉ DA SILVA

**NOVA PLATAFORMA DIAGNÓSTICA PARA AUXILIAR NA DETECÇÃO DO
CÂNCER DE TIREÓIDE**

Uberlândia, 31 de março de 2017.

Resultado: _____

Banca Examinadora

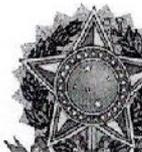
Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (Orientador)
Universidade Federal de Uberlândia - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Prof. Dr. Luiz Carlos Conti de Freitas (Membro)
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP

Dr. Rogério Costa Tiveron (Membro)
Hospital Helio Angotti – Uberaba-MG

Prof. Dr. Thulio Marquez Cunha (Membro)
Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola (Membro)
Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de Tese de Doutorado Nº 004/PPCSA

Área de concentração: Ciências da Saúde

Linha de Pesquisa 3: Fisiopatologia das doenças e agravos à saúde.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Aplicações da nanobiotecnologia em doenças infecciosas, parasitárias e crônico-degenerativas. Discente: **Sindeval José da Silva** - Matrícula nº **11213CSD013**. Título do Trabalho: "**Nova plataforma diagnóstica para a detecção do câncer de tireóide.**"

Às 14:00 horas do dia 31 de março do ano de 2017, no anfiteatro do Bloco 8B - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Luiz Carlos Conti de Freitas (USP), Rogério Costa Tiveron (Hospital Hélio Angotti - Uberba), Thúlio Marquez Cunha (UFU), Adriano Mota Loyola (UFU) e Luiz Ricardo Goulart Filho (UFU) - orientador do discente. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho apresentou a Comissão Examinadora e o discente, agradeceu a presença do público e concedeu ao discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra aos examinadores que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, em sessão secreta, em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato aprovado () reprovado. Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor(a). O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 18:30 horas. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho _____

Prof. Dr. Luiz Carlos Conti de Freitas _____

Prof. Dr. Rogério Costa Tiveron _____

Prof. Dr. Thúlio Marquez Cunha _____

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola _____

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1-	Coleta da amostra tireoidiana. A- Espécime cirúrgico, localização do nódulo para coleta do fragmento. B- Fragmento coletado dividido ao meio.	26
FIGURA 2-	Fluxograma da nova plataforma diagnóstica baseada em citometria de fluxo, sua execução temporal e interpretação dos resultados.	28
FIGURA 3-	Histogramas com taxa de marcação pelo CaT12 em cultura celular TPC-1. Comparação de positividade de células controle com as células marcadas. A- Carcinoma de tireóide (TPC-1) marcação extracelular (membrana). B- Carcinoma de tireóide (TPC-1) marcação intracelular (citoplasma).	34
FIGURA 4-	Comparação de marcação com peptídeo CaT12 em três pacientes. Para cada paciente foram feitos dois experimentos idênticos com a única diferença de terem as células fixadas ou não fixadas antes da marcação com CaT12.	35
FIGURA 5-	Comparação de marcação com peptídeo CaT12 em pacientes com dois fragmentos (benigno e maligno) em uma mesma pessoa.	36
FIGURA 6-	Perfil de marcação do CaT12. A- Comparação dos grupos benigno e maligno. P= Teste <i>Mann Whitney</i> . B- Porcentagem de células positivas nos grupos nódulos hiperplásicos, bócio, adenoma, Neoplasia folicular não invasiva com padrão nuclear tipo papilífero (NIFTP), Carcinoma papilífero de tireoide (CPT) e carcinoma papilífero variante folicular (CPVF). P=Teste ANOVA.	38
QUADRO 1	Sistema Bethesda para classificação citopatológica da tireóide: risco estimado e manejo clínico recomendado.	29

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Positividade para o peptídeo CaT12 em citometria de fluxo nos diferentes subtipos histológicos de biópsias de tireóide, de acordo com os <i>cut-offs</i> estabelecidos pela curva ROC e baseada nos escores de positividade para os grupos classificados como maligno e benigno.	37
TABELA 2-	Parâmetros diagnósticos para o peptídeo CaT12 em três diferentes <i>cut-offs</i> .	37
TABELA 3-	Comparações entre os resultados do anátomo-patológico (AP) pós-cirúrgico e citometria de fluxo, com revisão AP pós-cirúrgico. Distribuição nas Categorias Bethesda, Amostras, Classificação, Resultados e Comentários.	40
TABELA 4-	Comparações entre as porcentagens de acerto entre PAAF, AP do fragmento e citometria de fluxo com o peptídeo CaT12 com revisão do AP pós-cirúrgico.	41
TABELA 5-	Dados clínicos utilizados para o teste Wilcoxon-Mann-Whitney (<i>Wilcoxon rank-sum test</i>).	41
TABELA 6-	Comparação do desempenho do exame Anátomo-Patológico e o marcador molecular CaT12 na discriminação entre benignos e malignos por meio do teste Mann-Whitney (<i>Wilcoxon rank-sum test</i>).	43
TABELA 7-	Teste da concordância entre os métodos de diagnóstico Anátomo-patológico e por meio de TAU de Kendall.	44
TABELA 8-	Avaliação de desempenho do teste diagnóstico.	45
TABELA 9-	Teste de Normalidade de D'Agostino-Pearson.	46
TABELA 10-	Correlação de Spearman entre Marcador Molecular CaT12 e indicadores de malignidade, idade e tempo de evolução.	47
TABELA 11-	Comparações entre CaT12 e diferentes marcadores utilizados para o diagnóstico do Carcinoma Papilífero de Tireóide conforme apresentados na literatura.	50
TABELA 12-	Comparação do marcador CaT12 com outros testes diagnósticos.	52

LISTA DE ABREVIATURAS

AP - Anátomo-Patológico

AV – Análise de Variância

BAG-US - Biópsia com Agulha Grossa Guiada por Ultrassom

BD - Becton Dickinson

BSA - Albumina do Soro Bovino

CDT - Carcinomas Diferenciados da Tireoide

CF- Citometria de Fluxo

CMT- Carcinoma Medular da Tireoide

CPC- Carcinoma Papilífero Clássico

CPVF- Carcinoma Papilífero Variante Folicular

CPT- Carcinoma Papilífero da Tireoide

ERK- Quinase Reguladas por Sinal Extracelular

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

FL - Fluoresceína

FRAG- Fragmento

HC-UFU - Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

MAPK - Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

NIFTP - Neoplasia Folicular não Invasiva com Padrão Nuclear Papilífero

IC - Intervalo de Confiança

PAAF-US - Punção Aspirativa com Agulha Fina Guiada por Ultrassom

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

PBS - Tampão Fosfato Salino

RCF - Força Centrifuga Relativa

RNA_m – Micro RNA

RPMI 1640 - Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute

rPAAF-US - Punção Aspirativa com Agulha Fina Guiada por Ultrassom de Repetição

SBRCT- Sistema Bethesda para Resultado Citológico de Tireoide

SCCP-HCUFU – Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERT- Telomerase Reversa Transcriptase

TPC-1 - Cultura de Células Tireoidianas

US\$ - Dólar Americano

USA - United State of American

US- Ultrassom ou Exame de Ultrassonografia

VPN - Valor Preditivo Negativo

VPP - Valor Preditivo Positivo

LANB-INGEB - Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica

‘ Quando as teias de aranha se juntam elas podem amarrar um leão ’

Provérbio Africano

DEDICATÓRIAS

Primeiramente a Deus, por iluminar os meus caminhos, presente em circunstâncias difíceis e concedendo força para que eu continuasse minha jornada.

À minha família que sempre foi presente, compreensiva e paciente oferecendo apoio e ajuda nos momentos de necessidade.

Aos funcionários que se mostraram sempre à disposição.

Aos meus colegas de trabalho por compartilharem seus conhecimentos e pela dedicação no cuidado de pessoas portadoras de câncer.

Aos pacientes pelo altruísmo, pois mesmo com as angústias e sofrimentos que o diagnóstico de câncer acarreta, e sabedores que não teriam benefícios com esta pesquisa aceitaram participar dela.

Aos meus orientadores por terem auxiliado em todas as etapas deste projeto, estando a disposição sempre que necessário, oferecendo seus conhecimentos a fim de que eu pudesse concluir essa tese.

RESUMO

A punção aspirativa com agulha fina guiada por ultrassom (PAAF-US) é o principal método propedêutico através do exame citológico de nódulos tireoidianos. Contudo, 10 a 30% dos casos apresentam como resultados amostras inadequadas ou indeterminadas, requerendo nova PAAF-US ou biópsia com agulha grossa dirigida por US (BAG-US). No presente trabalho avaliamos a performance do marcador CaT12, previamente identificado como marcador de tumores tireoidianos malignos, para auxiliar na detecção de carcinomas em fragmentos de nódulos tireoidianos através da Citometria de Fluxo. O resultado obtido foi comparado com o anátomo-patológico, e testes diagnósticos foram feitos para avaliar a capacidade do marcador em identificar os tecidos contendo malignidade. Análises prévias de citometria de fluxo do marcador com linhagens tumorais foram otimizadas e indicaram que a marcação externa sem permeabilização celular era adequada para a detecção do tumor. Posteriormente, avaliou-se o processamento das biópsias, que foram submetidas à digestão com colagenase para posterior marcação e detecção. Foram coletadas 29 amostras de portadores de nódulos tireoidianos submetidos a PAAF-US com estratificação Bethesda. Após detecção de células tumorais, estabeleceu-se os *cut-offs* utilizados para os valores de positividade do CaT12, e os parâmetros diagnósticos foram sensibilidade de 86,67% e especificidade de 78,57%, com acurácia 82,76%, acima da apresentada nos exames anátomo-patológicos pós-cirúrgicos 75,8% e das PAAFs com 53,5%. Nossos resultados sugerem que a nova tecnologia poderá ser usada na análise de material aspirado tanto por PAAF-US quanto por BAG-US, sem depender dos parâmetros citológicos ou histológicos e podem significar uma mudança de paradigmas para o diagnóstico do câncer de tireoide.

Palavras-Chave: Câncer de Tireoide. Biomarcador CaT12. Tumor Papilar, Citometria de Fluxo.

ABSTRACT

Ultrasound-guided Fine Needle Aspiration (USG-FNA) followed by cytological examination is a common procedure performed for diagnosis of thyroid nodules. However, 10 to 30% of the cases present indeterminate results, requiring the use of US-guided core needle biopsies. In the present work we evaluated the performance of the CaT12 biomarker, previously identified as a marker of malignant thyroid tumors, to aid in the detection of carcinomas in fragments of thyroid nodules through Flow Cytometry. Results were compared with histopathological analyses, and diagnostic tests were performed to evaluate the marker's ability to distinguish malignant tissues. Previous flow cytometric analyzes of the marker with tumor cell lines were optimized and indicated that cell labeling without permeabilization was adequate for tumor detection. Subsequently, the biopsies were processed and submitted to digestion with collagenase prior to labeling and detection. Twenty-nine samples from patients with thyroid nodules submitted to USG-FNB were collected. After detection of tumor cells, cut-off value was calculated and positivity was established. Diagnostic parameters present sensitivity of 86.67%, specificity of 78.57%, and accuracy of 82.76%, much higher than the accuracy presented by the histopathology (75.8%), and USG-FNB (53.5%) analysis. Our results suggest that the novel technology can be used in the analyses of biopsies without depending on cytological or histological parameters, and may lead us to a paradigm shift for the diagnosis of thyroid cancer.

Keywords: Thyroid Cancer. Biomarker. Papillary Tumor. Flow Citometry.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.	OBJETIVOS	23
	3.1 Objetivo Geral	23
	3.2 Objetivos Específicos	23
4.	MATERIAL E MÉTODOS	24
	4.1. Aspectos Éticos	24
	4.2. Desenho do Estudo	24
	4.3. Marcador CaT12	25
	4.4. Amostras biológicas	25
	4.4.1. Cultivo de linhagens celulares	25
	4.4.2. Fragmentos de tecidos	25
	4.5. Definição do local de marcação pela citometria de fluxo	26
	4.5.1. Marcação de citoplasma celular	26
	4.5.2. Marcação de membrana celular	27
	4.5.3. Processamento das amostras	27
	4.5.3.1. Amostras a fresco e fixadas	27
	4.5.3.2. Diferentes amostras obtidas de um mesmo paciente	28
	4.6. Classificação para resultados de exames citológicos e histopatológico da tireoide	28
	4.6.1. Sistema Bethesda	28
	4.6.2. Classificação Histológica	29
	4.6.3. Revisão dos resultados do anátomo-patológico	29
	4.7. Análise Estatística	30
	4.7.1. Cálculo do tamanho da amostra, poder e nível de significância do estudo	30
	4.7.2. Estatística GraphPrism 5.0	31

4.7.3.	Wilcoxon-Mann-Whitney (Wilcoxon rank-sum test)	31
4.7.4.	Coeficiente de correlação TAU de Kendall (τ)	32
4.7.5.	Sensibilidade, especificidade, acurácia e índices associados	33
4.7.6.	Correlações clínico-patológicas	33
5.	RESULTADOS	34
5.1.	Cálculo do n amostral	34
5.2.	Padronização do teste CaT12	34
5.2.1.	Marcação do CaT12 em células TPC-1	34
5.2.2.	Padronização do processamento de amostras	35
5.2.3.	Perfil de marcação do CaT12 em amostras benigna e maligna de uma mesma pessoa	35
5.3.	CaT12 como marcador de malignidade	36
5.4.	Resultado da classificação citológica e histopatológica	39
5.5.	Correlações CaT12 com aspectos clinico-patológicos	39
6.	DISCUSSÃO	48
7.	CONCLUSÃO	53
8.	REFERÊNCIAS	54
9.	ANEXOS	60
	Anexo 1- Parecer de Aprovação do CEP	60
	Anexo 2- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	61
	Anexo 3- Instrumento de Coleta de Dados	62

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas houve um aumento na incidência do câncer tireoidiano (GHARIB et. al., 2016; HAUGEN et. al., 2016; KIM et. al., 2016; UDELSMAN; ZHANG, 2014), a maioria dos casos diagnosticados é de tumores menores que 1 cm (GHARIB et. al., 2016; HAUGEN et. al., 2016; KIM et. al., 2016; ROSÁRIO et. al., 2013; UDELSMAN; ZHANG, 2014;). Mais de 64000 novos casos de câncer da tireoide foram diagnosticados nos Estados Unidos (EUA) em 2016, com 1870 mortes associadas a essa neoplasia (SHI et. al., 2017; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Acredita-se que a elevação nas taxas de incidência deve-se ao uso rotineiro dos métodos de imagem na avaliação do pescoço (GHARIB et. al., 2016; HAUGEN et. al., 2016; KIM et. al., 2016; UDELSMAN; ZHANG, 2014).

A manifestação mais comum da doença é a presença de um nódulo assintomático de achado casual. A taxa de detecção de nódulos tireoidianos na palpação é de 5% nas mulheres e 1% nos homens que vivem em regiões com oferta adequada de iodo (HAUGEN et. al., 2016; KIM et. al., 2016). No entanto, o exame de ultrassom de alta resolução pode detectar nódulo(s) entre 19 a 68% em uma população aleatória, com alta frequência em mulheres idosas (HAUGEN et. al., 2016; KIM et. al., 2016). O desafio clínico nesse contexto é diagnosticar o câncer tireoidiano, o qual ocorre em 7-15% dos portadores de nódulos, dependendo da faixa etária, exposição a radiações ionizantes e história familiar de câncer. Os carcinomas diferenciados da tiroide (CDT) representam 90% de todos os tumores da tireoide (GHARIB et. al., 2016; UDELSMAN; ZHANG, 2014).

De acordo com Xiaoyun (2016) o principal método diagnóstico é a punção aspirativa com agulha fina guiada por ultrassom (PAAF-US) com o exame citológico do aspirado. Em 2007 foi criado o Sistema Bethesda para Resultado Citopatológico de Tireoide (SBRCT) com estratificação em seis categorias (Bethesda I-VI) e seus respectivos riscos de malignidade bem como as indicações de tratamento e acompanhamento (CRIPPA et al., 2010; LIU et al., 2016). A padronização pelo SBRCT tornou-se eficaz para tomada de decisões tanto para o médico, quanto para o paciente. No entanto, 10-30% das PAAFs-US apresentam resultado indeterminado. Porém, quando os achados citopatológicos da PAAF são correlacionados com sinais de malignidade vistos na ultrassonografia o diagnóstico torna-se mais preciso (GHARIB et. al., 2016; HAUGEN et. al., 2016; ROSÁRIO et.al., 2013). Dada a heterogeneidade das categorias B III e IV (ALEXANDER et. al., 2012; IBRAHIM; WU,

2016; KIM et. al., 2016; LIU et al., 2016; HO et al., 2014) e das análises ultrassonográficas, vários consensos de especialistas oferecem inúmeras possibilidades de condutas nestas situações (GHARIB et. al., 2016; HAUGEN et. al., 2016; ROSÁRIO et.al., 2013) tais como: 1- observar, 2- repetir a PAAF-US (rPAAF-US), 3-uso de biomarcadores (ALEXANDER et. al., 2012; AZOURY et. al., 2015; HAHN et. al., 2017; MA et. al., 2014; MEDICI et. al., 2015; NA et. al., 2017; PAULSON et. al., 2017; VALDERRABANO et. al., 2017; XING, 2016), 4- biópsia com agulha grossa (BAG) e 5- indicação cirúrgica para diagnóstico histológico definitivo (HAUGEN et. al., 2016).

Atualmente, a Biópsia com Agulha Grossa dirigida por US (BAG-US) tem se mostrado um procedimento seguro que disponibiliza importantes informações histológicas e de maior acurácia em relação a rPAAF-US, podendo reduzir os procedimentos cirúrgicos. Entretanto, este método diagnóstico apresenta limitações nas lesões com diferenciação folicular (AHN et. al., 2014; IBRAHIM; WU, 2016; JUNG et. al., 2013; KIM et. al., 2016; LEE et. al., 2015).

Com o intuito de aprimorar o diagnóstico do câncer tireoidiano, de proporcionar um acompanhamento seguro para os portadores de nódulos e evitar cirurgias desnecessárias outros métodos têm sido empregados como os testes biomoleculares. Contudo, esses marcadores tumorais utilizados em análises citológicas ou histológicas apresentam resultados limitados se usados isoladamente. Por isso, painéis com a utilização de diferentes biomarcadores mostraram-se mais eficazes (ALEXANDER et. al., 2012; AZOURY et. al., 2015; HAHN et. al., 2017; IBRAHIM; WU, 2016; KIM et al., 2017; LEE et. al., 2014; LITHWICK-YANAI et al., 2016; MA et. al., 2014; MEDICI et. al., 2015; NA et. al., 2017; PAULSON et. al., 2017; VALDERRABANO et. al., 2017; XING, 2016). No entanto, apresentam como limitações a técnica de processamento das amostras biológicas, a variabilidade inter-observador na análise dos achados e seu alto custo financeiro (KIM et al 2017).

A citometria de fluxo é um método alternativo que reduz as limitações anteriormente descritas. Esse recurso já está estabelecido para o diagnóstico e acompanhamento de doenças mieloproliferativas (ADAMCZEWSKI et al., 2015; ANGELL et al., 2016; BOROWITZ et al., 1993; STACCHINI et al., 2015).

Diante desse contexto, essa investigação vem propor o uso da citometria de fluxo na detecção de tumores tireoidianos como uma importante opção, tanto na propedêutica quanto no acompanhamento dos portadores de nódulos benignos e de câncer tireoidiano. Neste

estudo, testamos o marcador molecular CaT12, previamente identificado como marcador de tumores malignos da tireoide (REIS et al., 2013).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A taxa de incidência de câncer tireoidiano nos Estados Unidos triplicou nas últimas três décadas (IGLESIAS et al., 2017; SHI et al., 2017). Este aumento deve-se a fatores ambientais, (IGLESIAS et al., 2017) e maior taxa de sobrevivência (GHARIB et al., 2016; HAUGEN et al., 2016; ROSÁRIO et al., 2013), porém, a maioria dos estudos atribui esse aumento ao uso rotineiro dos meios de diagnóstico por imagem na avaliação do pescoço, os quais identificam nódulos menores de um centímetro, em especial o microcarcinoma papilífero (VEIGA et al., 2013). No entanto, não houve aumento nas taxas de mortalidade atribuída às neoplasias da tireoide (HAUGEN et al., 2016, SHI et al., 2017). Udelsman et al., (2014) relataram algumas implicações associadas com o diagnóstico de câncer oculto, também denominado microcarcinoma (MC) ou incidentaloma. A sua identificação resulta em intervenção cirúrgica e tratamento complementar com iodo radioativo, ambos de benefício questionável para o paciente e onerosos para o sistema de saúde. Haugen et al. (2016) relatam que, apesar da maioria dos microcarcinomas ter comportamento clínico pouco agressivo, ao longo da vida do paciente é importante ressaltar que a prevalência de MCs com alto risco de invasão, metástases e desfecho letal é de aproximadamente 10% (LI et al., 2016). Como tentativa de identificar essa variante incomum, atualmente, são utilizadas as seguintes características clinicopatológicas: extensão extra tireoidiana, invasão angio-linfática, metástases para linfonodos regionais e à distância e o estadiamento TNM. Porém, essa estratificação de risco é limitada e necessita de outras estratégias para o diagnóstico e acompanhamento seguro dos portadores desta neoplasia.

O avanço no entendimento dos mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento e propagação dos cânceres, observados nos últimos anos propiciou o surgimento de novos testes diagnósticos, de maior acurácia, capazes de estratificar os riscos dos MCs. Os mais promissores são o BRAFV^{600E} e os promotores de mutações da Telomerase Transcriptase Reversa (TERT) (LIU; XING, 2016).

Outro dilema clínico é o achado casual de nódulos tireoidianos à palpação do pescoço ou por exames de imagens, habitualmente realizados durante a investigação de outras queixas não relacionadas com a tireoide. Nessas situações recomenda-se uma

anamnese cuidadosa, testes de função tireoidiana e exame ultrassonográfico para identificar possíveis fatores de riscos para o câncer tireoidiano (GHARIB et al., 2016; HAUGEN et al., 2016; ROSÁRIO et. al., 2013).

Os portadores de nódulos tireoidianos de achado casual, frequentemente, são eutireoideos e quando apresentam alguma queixa, geralmente, não se relaciona com o nódulo. Exceto, nos casos de crescimento rápido acompanhado de sintomas compressivos, dispnéia e disfagia, associada ou não com paralisia de pregas vocais e/ou a presença de adenopatia cervical. Esses sinais e sintomas são altamente sugestivos de neoplasias malignas da tireoide. No entanto, a ausência de sintomas não permite excluir malignidade (GHARIB et al., 2016; HAUGEN et al., 2016; ROSÁRIO et. al., 2013;). Kim et al., (2016) relataram que os portadores de carcinoma papilífero sintomáticos tiveram maiores taxas de recorrência e menor sobrevida quando comparados com aqueles assintomáticos.

Atualmente, o exame de ultrassom é considerado o melhor método de imagem na avaliação da tireoide, a sensibilidade aproxima-se de 95% (ROSÁRIO et. al., 2013;). Sua utilidade não se restringe a confirmação do número e tamanho do nódulo(s) tireoidiano(s) percebido(s) à palpação. O US de alta definição identifica calcificações, vascularização intranodal (US com dopplerfluxometria), halo incompleto ou ausente, limites imprecisos, solidez, altura e a largura, ecogenicidade, extensão além da tireoide e adenopatias cervicais (GHARIB et. al., 2016; HAUGEN et. al., 2016; ROSÁRIO et. al., 2013). Estas informações possibilitam melhorias na acurácia das PAAFs-US. Entretanto, a sensibilidade e especificidade para estas caracterizações pelo o US variam grandemente em diferentes estudos (ZHANG et al., 2015). Em uma meta-análise de Remontil et al. (2015) concluíram-se que os achados isolados do US têm pouco valor, mas as associações de um ou mais achados: microcalcificações, altura maior que largura, limites imprecisos e ausência de elasticidade são sinais de riscos para a malignidade. HAUGEN et al. (2016), recomendam o uso desses critérios para selecionar o(s) nódulo(s) de maior suspeição a serem puncionados.

Aproximadamente 60% dos nódulos tireoidianos descritos pelo ultrassom são benignos (HAUGEN et. al., 2016; KIM et. al., 2016) e podem ser acompanhados de forma conservadora. A PAAF-US é o método diagnóstico de melhor custo benefício para a avaliação inicial dos nódulos tireoidianos. O procedimento quando guiado por ultrassom torna-se mais seguro, confiável e acurado. As limitações das PAAFs-US são atribuídas a: 1- habilidade do operador na coleta da amostra 2- características dos nódulos (cístico,

sólido altamente vascularizado, localizado posteriormente) e pacientes obesos têm maiores possibilidades de fornecerem amostras inadequadas para o diagnóstico, 3- a amostra pode ser adequada mas, durante o processo de confecção das lâminas, artefatos podem ser gerados e dificultarem a análise citológica 4- experiência do citologista (BHASIN et al., 2013; GHARIB et al., 2016; HAUGEN et al., 2016; ROSÁRIO et al., 2013). A partir de 2007, os resultados das amostras colhidas por PAAFs-US seguiram os critérios estabelecidos pelo SBRCT (CRIPPA et al., 2010; LIU et al., 2016). As categorias II benigna e VI maligna têm alta acurácia diagnóstica e reprodutibilidade interobservador satisfatória (HAUGEN et al., 2016; LITHWICK-YANAI et al. 2016; LIU et al., 2016; ROSÁRIO et al., 2013). No entanto, o SBRCT criou uma zona cinzenta pois, dependendo da instituição, em 10 a 40% das amostras colhidas através da PAAF-US o diagnóstico foi indeterminado (III, IV e V). BHASIN et al. (2013) realizaram um estudo multicêntrico e concluíram que a concordância entre os citologistas para os resultados indeterminados foi de apenas 50%. Estudos recentes propõem alterações no SBRCT a fim de adequá-lo as mudanças nos critérios de malignidade das neoplasias tireoidianas (IBRAHIM; WU, 2016; LIU et al., 2016; PUSZTASZERI et al., 2016; XU; GHOSSEIN, 2015). Os aspectos citomorfológicos deverão ser revistos, assim como as taxas de risco para a malignidade em cada categoria. Em relação a categoria III propõe-se a divisão da mesma em baixo e alto risco. As categorias IV e V deverão sofrer ajustes nas suas estratificações de risco devido a recente mudança que ocorreu em 2016, na classificação do CPVFC - Carcinoma Papilífero Variante Folicular Capsulado. Atualmente descrito como NIFTP - Neoplasia Folicular não invasiva com Padrão nuclear Papilífero (BALOCH et al., 2016; JEON et al., 2016; NIKIFOROV et al., 2016; PUSZTASZERI et al., 2016). As adequações propostas para o SBRCT reduzirão a zona cinzenta e, conseqüentemente, as indicações de tratamento cirúrgico e o acompanhamento dos portadores de nódulos se tornarão mais seguros. Apesar da possível redução na variabilidade das taxas de riscos das categorias IV e V essas ainda permanecerão elevadas.

Em busca do aperfeiçoamento diagnóstico, Kim et al., (2016) elaboraram um esquema de triagem para os casos indeterminados na PAAF-US. Esse esquema compara os resultados dos seguintes exames: 1- citologia com B III, 2- US com estratificação de risco, 3- BAG e 4- BRAF^{V600E}. Não foi observado impacto significativo, especialmente nos carcinomas foliculares e papilíferos variante folicular, pois a mutação do BRAF^{V600E} esteve presente em apenas 32% dos casos com estes diagnósticos. Nikorov et al. (2015),

demonstraram que o painel de marcadores moleculares, NGS multi-gene ThyroSeq v 2.1, fornece alta sensibilidade e especificidade para a detecção de câncer em nódulos tireoidianos com citologia de resultado indeterminado. Esses achados foram melhores que os resultados apresentados por Kim et al. (2016).

Lithwick-Yanai et al. (2016) desenvolveram um teste com expressão micro-RNA em esfregaços obtidos por PAAF-US de nódulos tireoidianos e com diagnóstico indeterminado. A validação foi feita em lesões benignas e malignas. Eles relatam que o método não requer o envio de tecidos frescos ou coleta em condições especiais. Seus resultados apresentaram sensibilidade e especificidade acima de 70% na identificação de neoplasias benignas e malignas. Porém, estudos adicionais serão necessários para comprovar sua real performance diagnóstica. Esses estudos reforçam as recomendações de Haugen et al. (2016): "... se os testes moleculares forem usados, os pacientes devem ser informados dos benefícios e limitações dos mesmos e sobre as possíveis consequências do tratamento e as implicações clínicas a longo prazo". Em resumo, não há um teste molecular único capaz de definir o diagnóstico de malignidade nos portadores de citologia indeterminada e resultados de longo prazo são necessários para sua implementação, no arsenal propedêutico.

Nos casos de PAAFs-US com resultados persistentemente não diagnósticos, a BAG-US pode oferecer informações adicionais (GHARIB et al., 2016). Lee et al. (2015) e Pyo et al. (2016) realizaram meta-análises sobre o desempenho da BAG-US e concluíram que a mesma tem taxa de diagnóstico conclusivo maior que a PAAF-US. Assim como no acompanhamento, a BAG-US teve melhor desempenho no diagnóstico de câncer que a PAAF-US. No entanto, Wolinski, Stangierski, Ruchala (2017), fizeram uma crítica referente às meta-análises, até então publicadas, devido ao pequeno número de artigos incluídos, poucos resultados quantitativos, ou diferenças insignificantes entre os dois procedimentos. Tais falhas podem ser explicadas pelo seu uso recente na prática médica. Os autores acima citados concluem que a BAG é uma técnica diagnóstica valiosa, com maior proporção de resultados diagnósticos do que a PAAF-US. Porém, ela uma técnica complementar à PAAF-US e não substituta.

Lee et al. (2016) examinaram a presença de mutação NRAS em 61 amostras obtidas por PAAF-US e BAG-US cujo resultado era neoplasia folicular. Não houve diferença nas taxas de identificação de malignidade entre os testes, PAAF-US e BAG-US, quando seus resultados foram comparados com o exame imunohistoquímico do espécime

cirúrgico positivo para a mutação.

A presença de lesões com diferenciação folicular nos nódulos tireoidianos acarretam uma menor acurácia na identificação de neoplasia maligna. Nos exames de amostras obtidas por PAAF-US e BAG-US no pré-operatório, é impossível a definição de malignidade, pois a caracterização da invasão vascular e/ou da cápsula tumoral é que define o diagnóstico de câncer nem sempre é fácil definir esses achados mesmo no exame anátomo-patológico (AP) pós-operatório (FLETCHER, 2012). Os resultados falso-positivos ou negativos, têm sérias implicações para os pacientes. Tratar cirurgicamente um falso positivo poderá ocasionar possíveis sequelas funcionais, estéticas e emocionais que impactam negativamente na qualidade de vida da pessoa (ASCHEBROOK-KILFOY et al., 2015). Por outro lado, se o portador de neoplasia maligna não for tratado adequadamente os riscos de morbimortalidades poderão aumentar. (GHARIB et al., 2016; HAUGEN et al., 2016; ROSÁRIO et al., 2013). Um método promissor que poderá contribuir para amenizar este dilema diagnóstico é a análise das células coletadas em citômetro de fluxo (CF).

A análise citométrica é de uso rotineiro nos diagnóstico e acompanhamento das doenças mieloproliferativas (BOROWITZ et al., 1993). Esse procedimento foi utilizado por Farsetti et al., (1990) em amostras de tecido tireoidiano obtidos por PAAF-US em portadores de doenças auto-imunes da tireoide. Revelou ser um método diagnóstico rápido, seguro, sensível e específico para caracterizar populações de células, e que pode ser usado em outras doenças da tireoide. Atualmente, diferentes estudos foram publicados mostrando a importância da CF como método auxiliar no diagnóstico e prognóstico das neoplasias tireoidianas (ANGELL et al., 2016; STACCHINI et al., 2015).

Foram identificadas células tronco tumorais por CF e PCR em tempo real por Ahn et al. (2014), a partir de espécimes cirúrgicos de portadores de CPT. Embora a origem exata das células-tronco do câncer permaneça indefinida, elas têm sido associadas com a gênese tumoral, metástase e resistência à quimioterapia.

Stacchini et al. (2015) relataram o papel crucial da CF associada a PAAF no diagnóstico de linfoma tireoidiano. Além de detectar pequenas populações de células tumorais ela ainda pode ajudar o citopatologista a caracterizar a infiltração no tecido tireoidiano. Eles acreditam que com a colaboração entre especialistas de diferentes áreas será possível, em curto espaço de tempo, obter o diagnóstico correto da maioria, se não de todos, os casos onde a infiltração linfóide é difícil de ser detectada pela citologia. Esses

achados foram corroborados pelos estudos de Adamczewski et al., (2015).

Em 2016, Angell e demais autores, propuseram o uso de ensaio diagnóstico com citometria de fluxo, baseado em células supressoras derivadas de tecido mieloide em amostra de sangue periférico no pré-operatório imediato, de portadores de nódulo tireoidiano único, maior que 1 cm e com PAAFs-US prévias. O objetivo foi avaliar o risco de malignidade e a extensão do câncer em pacientes no pré-operatório. Embora haja necessidade de validação adicional, os resultados encontrados sugerem que essa técnica seja útil nas PAAFs com citologia indeterminada e poderá estabelecer o estágio tumoral e o risco de recorrência. (ANGELL et. al., 2016)

Kim et al. (2017) utilizaram a citometria de fluxo e Western Blotting para maior esclarecimento do papel da mutação do gene BRAF em experimentos funcionais com PTC1 e células 8505c. A análise ontológica mostrou que os genes up-regulados se associam com o mecanismo de adesão e migração celular e interferem na cascata das Quinase Regulada por Sinal Extracelular (ERK) e da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK,).

Em 2013, Reis et al., selecionaram por meio da tecnologia de *Phage Display* o peptídeo CaT12 juntamente com outros 104 marcadores. Em uma pré-validação o CaT12 e CaT18 mostraram-se mais reativos e foram testados em imunohistoquímica, mas apenas o CaT12 mostrou-se funcional nesta plataforma. Sendo assim, o marcador molecular CaT12 foi testado por meio da técnica de imunohistoquímica em diferentes lesões tireoidianas o que demonstrou seu desempenho promissor na identificação dos tumores malignos da tireoide, especialmente em carcinomas papilíferos variantes clássica e folicular. O CaT12 é um peptídeo composto por uma sequência de 12 aminoácidos lineares, e funciona como um anticorpo que reconhece e se liga ao alvo, mas apesar das tentativas, o alvo deste marcador não foi identificado, alguns indícios apontam para possíveis citoqueratinas. No presente estudo o marcador CaT12 foi analisado por CF em amostras obtidas no pós-operatório imediato.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer nova plataforma diagnóstica utilizando o marcador tumoral CaT12 em fragmentos tumorais como auxiliar no diagnóstico de lesões tireoidianas.

3.2 Objetivos Específicos

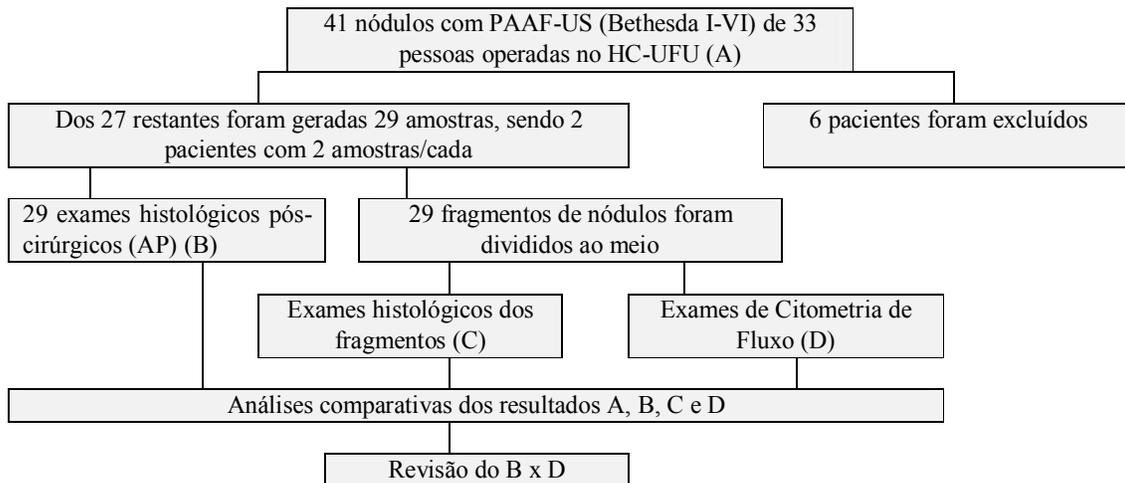
- A. Padronizar a técnica de CF em linhagem de carcinoma papilífero de tireoide TPC-1 utilizando o marcador CaT12
- B. Padronizar a técnica de CF em fragmentos tumorais de peças cirúrgicas utilizando o marcador CaT12
- C. Verificar a viabilidade de utilização das amostras fixadas com formaldeído para a marcação com CaT12
- D. Verificar o poder discriminatório de nódulos malignos e benignos utilizando CaT12 no mesmo paciente
- E. Diferenciar as lesões tireoidianas benignas das malignas utilizando o marcador CaT12
- F. Correlacionar os resultados obtidos das análises de citometria de fluxo com os dados clínicos e de exame anatomopatológico pós-operatório.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob o CAAE: 35353213.4.0000.5152 (ANEXO I), e todos os participantes foram esclarecidos a respeito dos objetivos da pesquisa pelos médicos responsáveis e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO II).

4.2 Desenho do Estudo



Os portadores de nódulos tireoidianos com indicação de tireoidectomia foram escolhidos por conveniência no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (SCCP-HCUFU). Inicialmente, trinta e três pessoas de ambos os sexos foram incluídas, todos eutireoídeos e assintomáticos. Foram colhidos os resultados de exames de ultrassom; PAAF-US, % células marcadas pelo citômetro de fluxo e exames anátomo-patológicos dos fragmentos de nódulos e dos espécimes cirúrgicos, conforme Anexo III. Amostras de tecidos de seis pessoas foram excluídas das análises citométricas, devido a problemas na calibração do equipamento. Dos vinte e sete restantes, vinte e nove fragmentos foram colhidos, sendo que em duas pessoas colheu-se duas amostras em cada uma delas.

4.3 Marcador CaT12

O peptídeo CaT12 foi selecionado através da técnica de *Phage Display* e testado para carcinoma de tireoide conforme descritos anteriormente Reis et al. (2013). Para esse trabalho o mesmo peptídeo de 12 aminoácidos foi sintetizado pela GenScript (USA Inc.) acoplado com FITC (isotiocianato de fluoresceína) para ser usado na citometria de fluxo. A quantidade do marcador CaT12 foi determinada por uma curva de diluição do peptídeo utilizando cultura de células tireoidianas (TPC-1).

4.4 Amostras biológicas

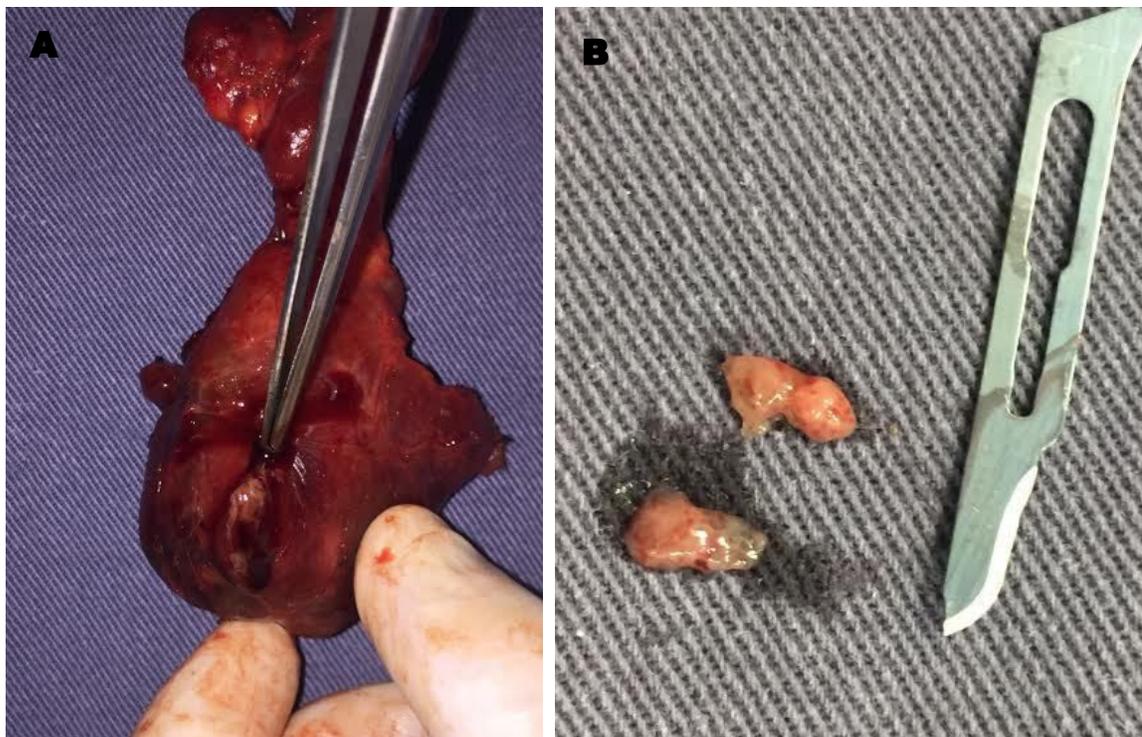
4.4.1 Cultivo de linhagens celulares

Para padronizar a técnica, o peptídeo CaT12 foi testado em culturas de células de tireoide (TPC-1). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Nutricell, Campinas-SP) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina à 37°C em estufa com atmosfera úmida contendo 5% CO₂.

4.4.2 Fragmentos de tecidos

Após a remoção completa ou parcial da tireoide, foi coletado um fragmento por secção (Figura 1) e dividido ao meio. Uma parte dos tecidos foi colocada em um frasco com formol tamponado para exame histológico, com finalidade de comprovar que a amostra era representativa. A outra parte do fragmento foi posta em meio de cultura RPMI 1640, acondicionado em recipiente com gelo e transportado imediatamente para o Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB), para análise de marcação com o peptídeo CaT12.

Figura 1- Coleta da amostra tireoidiana. A- Espécime cirúrgico, localização do nódulo para coleta do fragmento. B- Fragmento coletado dividido ao meio.



Fonte: Dos Autores

4.5 Definição do local de marcação pela citometria de fluxo

4.5.1 Marcação de citoplasma celular

Para a construção da curva de diluição do peptídeo foram usadas cultura de células TPC-1. A marcação intracelular foi feita após a contagem dessas células. Inicialmente as células foram permeabilizadas com o kit BD Cytotfix/Cytoperm (Becton Dickinson) conforme as recomendações do fabricante. Em seguida, as células foram lavadas por duas vezes com PBS/BSA 1% e marcadas com o peptídeo-FITC (10 μg /100 μL PBS/BSA 1%) por 1 hora a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas novamente com PBS/BSA 1% e ressuspensas em 100 μL de PBS/BSA 1% para análise no citômetro de fluxo.

4.5.2 Marcação de membrana celular

As amostras de tecidos coletadas foram processadas em fluxo laminar em sala de cultura de células com todos os materiais devidamente esterilizados. Os tecidos foram lavados duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS), seccionados em pequenas partes e lavados por duas vezes também com PBS. Para todos os procedimentos de lavagem as amostras eram centrifugadas por cinco minutos à 200 RCF. Posteriormente, foram incubados à 37°C com colagenase (1 mg/ml) até a completa digestão do tecido por aproximadamente 10 horas.

Após o protocolo da colagenase, as amostras foram lavadas por duas vezes com PBS/BSA 1% (PBS contendo 1% de proteína albumina de soro bovino) e separadas igualmente em dois tubos (tubo controle e tubo marcado com CaT12). No tubo controle foram acrescentados 100 µL de PBS/BSA 1% e ao tubo CaT12 eram adicionados 100 µL da solução de peptídeo -FITC (10 µg /100 µL PBS/BSA 1%). Os tubos foram incubados a 4°C por 1 hora e depois lavados duas vezes com PBS/BSA 1%. Adicionou-se 200 µL de PBS/BSA 1% e foi feita a leitura no citômetro de fluxo Accuri C6® (Becton Dickinson). Nos ensaios com células TPC-1 após tripsinizar e lavar as células, essas foram contadas (1×10^5 células por tubo) e seguiu-se o mesmo protocolo descrito anteriormente, com exceção da incubação com a colagenase.

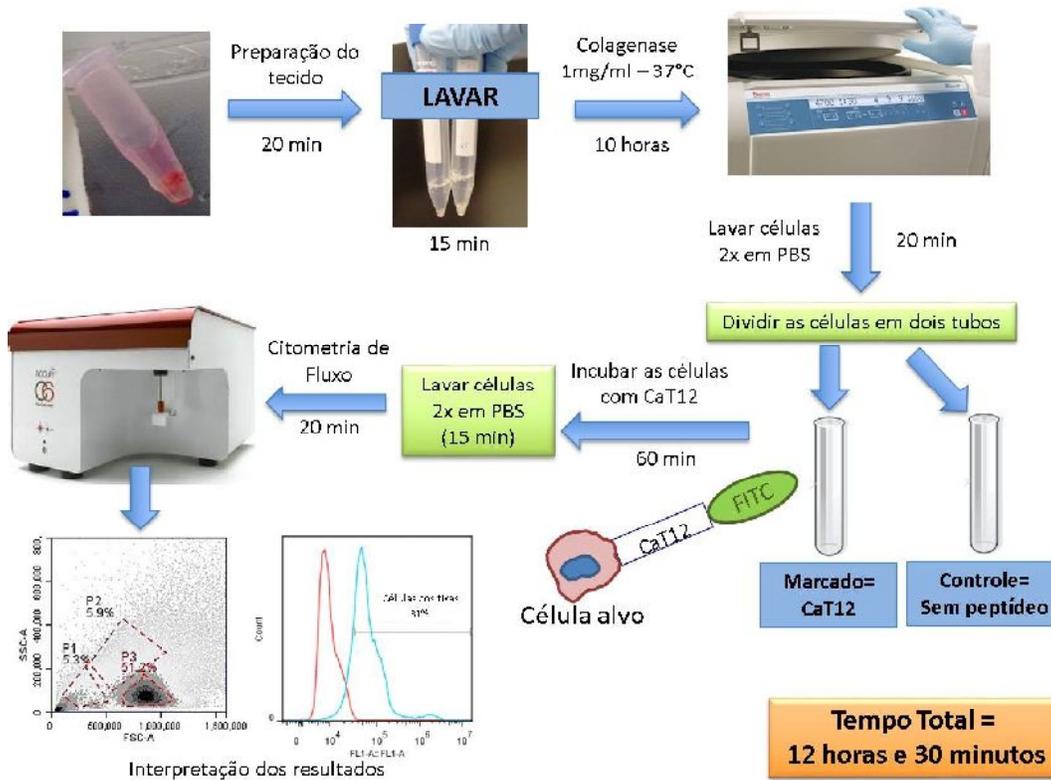
Um total de 10.000 eventos foram adquiridos de cada população de células por tubo. Para a obtenção e análise dos dados foi utilizado o software do próprio equipamento (Cytometer Software Workspace). A análise seletiva da população de células epiteliais foi estabelecida pelo histograma com combinação de fluorescência 1 (FL1) versus quantidade de células. Utilizamos a porcentagem de células para as análises comparativas entre os grupos (Figura 2).

4.5.3 Processamento das amostras

4.5.3.1 Amostras a fresco e fixadas

Duplicatas do experimento anteriormente descrito foram feitas em três amostras de pacientes diferentes, tanto com o material a fresco quanto fixado com formaldeído tamponado com PBS, para verificar se a marcação com o peptídeo CaT12 seria alterada com amostra fixada.

Figura 2 - Fluxograma da nova plataforma diagnóstica baseada em citometria de fluxo, sua execução temporal e interpretação dos resultados.



Fonte: Dos Autores

4.5.3.2 Diferentes amostras obtidas de um mesmo paciente

Em dois pacientes foram coletados fragmentos de dois nódulos diferentes, para verificar se o marcador CaT12 conseguiria distinguir o nódulo maligno do benigno.

4.6 Classificação para resultados de exames citológicos e histopatológico da tireoide

4.6.1 Sistema Bethesda

As amostras citológicas das PAAF-US neste estudo foram estratificadas seguindo os critérios do SBRCT (Quadro 1) (CRIPPA et al., 2010).

Quadro 1 – Sistema Bethesda para classificação citopatológica da tireóide: risco estimado e manejo clínico recomendado.

Categoria diagnóstica	Risco de malignidade (%)	Manejo habitual ^a
I- Não diagnóstico ou insatisfatório	1-4	PAAF guiado por US
II- Benigno	0-3	Seguimento clínico
III- Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado	5-15 ^b	Repetir a PAAF
IV- Neoplasia folicular ou suspeito para neoplasia folicular	15-30	Lobectomia
V- Suspeito para malignidade	60-75	Tireoidectomia total ou lobectomia
VI- Maligno	97-99	Tireoidectomia total ^c

(a) Manejo atual pode depender de outros fatores (p.ex. clínico e US) associado a interpretação do PAAF.

(b) Risco estimado com base nos pacientes repuncionados com achado de atipia.

(c) No caso de suspeita para lesão metastática ou interpretação de lesão suspeita de tumor metastático a cirurgia pode não ser indicada.

Fonte: Santos et. al.(2016)

4.6.2 Classificação Histológica

A classificação anátomo-patológica utilizada para os resultados dos espécimes cirúrgicos foi a preconizada pela Organização Mundial de Saúde (FLETCHER, 2012).

4.6.3 Revisão dos resultados do anátomo-patológico

A revisão do anátomo-patológico foi executada por dois patologistas de todas as amostras do espécime cirúrgico e dos fragmentos, sem conhecer o resultado da CF.

4.7 Análise estatística

4.7.1 Cálculo do tamanho da amostra, poder e nível de significância do estudo

Cohen et. al. (1998) após avaliar o poder e o nível de significância de diversos estudos, recomenda que o n-amostral deve ser calculado para se alcançar $\alpha \leq 0,05$ e poder de 80%. No entanto, para se atingir tais resultados é necessário que se considere simultaneamente o n-amostral que se deve obter, o nível de significância e o poder que se pretende atingir além da magnitude do efeito relativos à variável que está sendo investigada. Assim, se o pesquisador investiga variáveis cuja magnitude do efeito é pequena, deve-se considerar aumento no n-amostral, quando isso for possível, ou admitir níveis de α menos restritivos como $0,05 < \alpha < 0,10$ (HAIR et al., 2009).

O cálculo do n-amostral para este estudo foi feito *a priori* para se obter nível de significância máximo de 0,05, poder minimamente igual a 80% e atingir número de observações necessário e suficiente para execução do teste de Mann-Whitney (*Wilcoxon rank-sum test*).

O método usado para se estimar o n-amostral seguiu a fórmula abaixo:

$$n_{(\text{estimado para t-teste})} = \frac{n_{(\text{estimado para Wilcoxon})}}{1,097} \quad (\text{IX})$$

O cálculo preliminar para se obter o n-amostral para o teste-t foi feito com base em Abramowitz e Stegun (1965) por meio do software específico *A-priori Sample Size Calculator for Student t-Tests* (SOPER, 2017) foi usado o nível de significância (α) de 0,05, poder de 0,80 e magnitude antecipada do efeito de 0,80. O resultado obtido para teste bilateral foi de 26 observações. Desse modo, o n-amostral foi calculado por meio da fórmula supracitada resultando em minimamente 28,522 observações, o que foi arredondado de modo conservador para 29 observações.

Todos os testes foram processados por meio do software Bioestat 5.3. Os resultados cuja probabilidade de erro tipo I foi de $\alpha < 0,05$ foram considerados como significantes, e níveis $0,05 < \alpha < 0,10$ foram considerados limítrofes (HAIR et al., 2009).

4.7.2 Estatística GraphPrism 5.0

As análises de marcação foram realizadas no equipamento Accuri C6, onde foram determinados os percentuais de marcação do peptídeo CaT12 para a amostra controle e para cada paciente, sendo que o percentual marcado nos pacientes foi subtraído do percentual do controle. ANOVA com pós-teste de Bonferroni foi usada para verificar diferenças entre as médias dos percentuais de marcação entre os diferentes grupos: nódulo hiperplásico, bócio, adenoma, neoplasia folicular não invasiva com padrão nuclear papilífero (NIFTP), Carcinoma papilífero clássico (CPC) e carcinoma papilífero variante folicular (CPVF).

Diferenças entre os grupos benigno (nódulo hiperplásico, bócio, adenoma, NIFTP) e maligno (CPC e CPVF) foram verificadas usando Teste de Mann-Whitney (variáveis contínuas e análises não-paramétricas). Uso da Curva ROC (Receiver Operating Characteristics) com 29 amostras foi construída para avaliar sensibilidade, especificidade, acurácia e áreas sob a curva (AUCs) com 95% de intervalo de confiança (IC) e também para estabelecer os valores de *cut-offs*.

4.7.3 Wilcoxon-Mann-Whitney (Wilcoxon rank-sum test)

Para a avaliação mais ampla do comportamento do marcador molecular CaT12 como meio de diagnóstico foram escolhidas 8 variáveis que, de alguma forma, estão potencialmente relacionadas à casos de malignidade. Essas variáveis são: (1) idade em anos, (2) tempo de evolução em anos, (3) características do nódulo ao US: (3.1) composição, (3.2) ecogenicidade, (3.3) vascularização, (3.4) calcificações, (4) resultado do Bethesda, (5) cirurgias, (5.1) tireodectomia parcial, (5.2) tireodectomia total, (5.3) tireodectomia total com esvaziamento cervical. Foi usado o teste de Mann-Whitney o qual permite a rejeição da hipótese nula ($H_0: U_1 - U_2 = 0$) de nenhuma diferença entre os grupos avaliados quando $p\text{-valor} < \alpha$. O valor de Z é calculado por meio da fórmula:

$$(I) \quad Z = \frac{U - \mu_U}{\sigma_U}$$

Na qual μ_u , σ_u e U podem ser calculados por meio das fórmulas:

$$\mu_U = \frac{n_1 \cdot n_2}{2} \quad (II)$$

$$\sigma_U = \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2 \cdot (n_1 + n_2 + 1)}{12}} \quad (\text{III})$$

$$U = \left(n_1 \cdot n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1 \right) - \left(n_1 \cdot n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2 \right) \quad (\text{IV})$$

O p-valor é a probabilidade de se obter resultado minimamente tão extremo quando o Z encontrado e pode ser obtido por meio do dobro área abaixo da curva de densidade dos valores de U , minimamente tão extrema quando o valor de Z.

$$p - \text{valor} = 2 \cdot [1 - \Phi(z)] \quad (\text{V})$$

4.7.4 Coeficiente de correlação TAU de Kendall (τ)

Com a finalidade de avaliar por meio de um teste formal de hipóteses a associação entre os resultados dos testes de diagnóstico CaT12 e AP relativos às variáveis: (1) idade em anos, (2) tempo de evolução em anos, (3) características do nódulo ao US: (3.1) composição, (3.2) ecogenicidade, (3.3) vascularização, (3.4) calcificações, (4) resultado do Bethesda, (5) cirurgias. Os resultados foram hierarquizados e a medida da concordância entre os métodos de diagnóstico foi processada pelo Coeficiente TAU de Kendall (τ). O coeficiente TAU de Kendall avalia a associação entre duas variáveis medidas à nível ordinal e permite a rejeição da hipótese nula ($H_0: \tau=0$) de não associação quando $p\text{-valor} < \alpha$. O valor de Z é calculado por meio da fórmula:

$$Z = \frac{\tau - \mu_\tau}{\sigma_\tau} \quad (\text{VI})$$

Na qual τ e σ_τ podem ser calculados por meio das fórmulas:

(VII)

$$\tau = \frac{S}{\frac{1}{2}N(N-1)}$$

$$\sigma_{\tau} = \sqrt{\frac{2(2N+5)}{9N(N-1)}} \quad (\text{VIII})$$

O p-valor é a probabilidade de se obter resultado minimamente tão extremo quando o Z encontrado e pode ser obtido por meio da área abaixo da curva de densidade dos valores de τ , minimamente tão extrema quando o valor de Z.

4.7.5 Sensibilidade, especificidade, acurácia e índices associados

A caracterização do desempenho do marcador molecular como método de diagnóstico foi avaliada por meio do cálculo da sua: (1) sensibilidade, (2) especificidade, (3) probabilidade de erro α , (4) probabilidade de erro β , (5) valor preditivo positivo, (6) valor preditivo negativo, (7) acurácia, (8) Likelihood ratio negativa (-LR) e (9) Likelihood ratio positiva (+LR). Todos os cálculos tendo como padrão ouro o exame AP e n-amostral de 29 casos.

4.7.6 Correlações clínico-patológicas

Para a busca de correlações entre os resultados do marcador molecular em estudo e as variáveis: (1) idade em anos, (2) tempo de evolução em anos, (3) características do nódulo ao US (3.1- composição, 3.2- ecogenicidade, 3.3- vascularização, 3.4- calcificações), e (4) resultado do Bethesda. Todas as variáveis foram avaliadas preliminarmente por meio do teste de normalidade de D'Agostino Pearson para verificação do pré-requisito de normalidade e escolha do teste adequado para busca de correlações. Em face dos resultados obtidos optamos pela busca de correlações por meio do teste de correlação Rhô de Spearman (ρ). O teste de correlação de Spearman é uma prova não paramétrica de busca de correlações lineares que admite pequenas fugas da linearidade. O coeficiente ρ de Spearman avalia a correlação entre duas variáveis dispostas em postos ordenados em duas séries: x e y. Por meio dos valores de Rhô (ρ) e p-valor obtidos nesse teste podemos identificar a existência ou não de correlação entre as variáveis, bem como sua magnitude e sentido.

5. RESULTADOS

5.1 Cálculo do n amostral

O resultado obtido para teste bilateral para o cálculo do n amostral foi de 28,55 observações, o qual foi arredondado de modo conservador para 29 observações. A população era composta por 21 mulheres e 6 homens e as médias de idades eram 49,6 anos e 55 anos respectivamente.

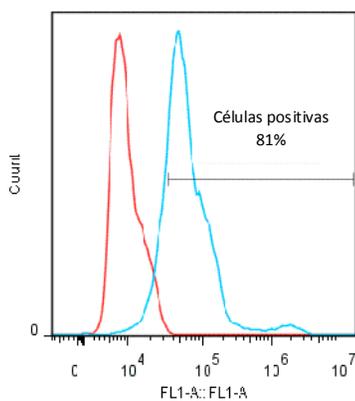
5.2 Padronização do teste CaT12

5.2.1 Marcação do CaT12 em células TPC-1

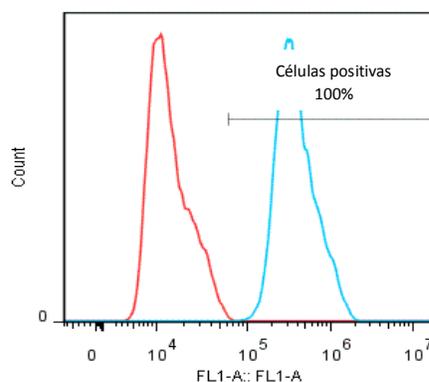
De acordo com a curva de diluição do peptídeo CaT12, a melhor concentração de uso foi 10 μ g de peptídeo em 100 μ L PBS/BSA 1%. A marcação intracelular (100%) foi maior que a extracelular (81%) nas células TPC-1 (Figura 3).

Figura 3- Histogramas com taxa de marcação pelo CaT12 em cultura celular TPC-1. Comparação de positividade de células controle com as células marcadas. A- Carcinoma de tireóide (TPC-1) marcação extracelular (membrana). B- Carcinoma de tireóide (TPC-1) marcação intracelular (citoplasma).

A TPC-1: Marcação de membrana



B TPC-1: Marcação citoplasmática

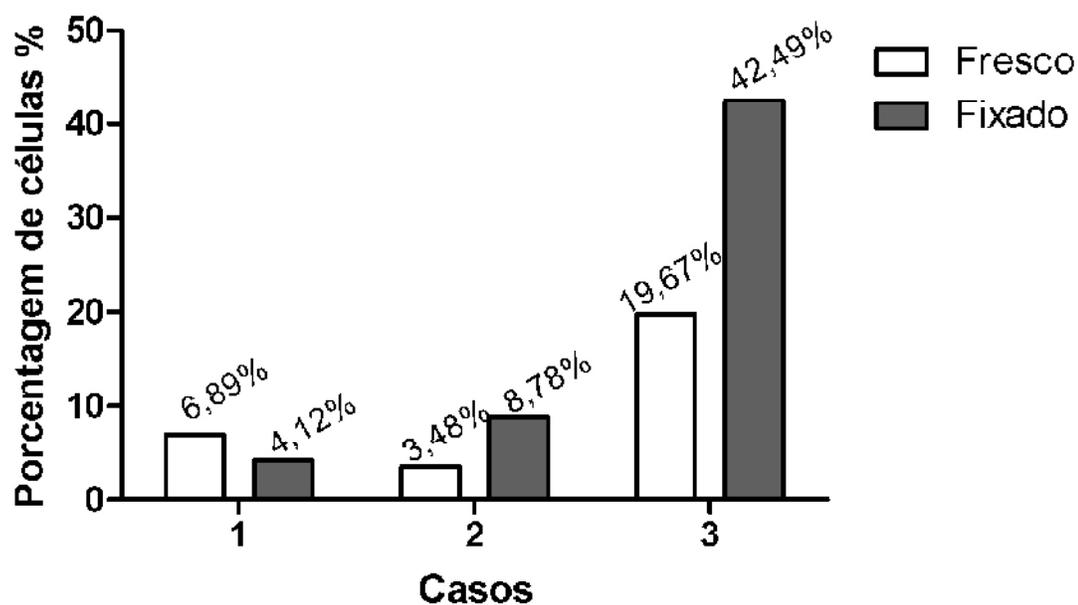


Fonte: Dos autores

5.2.2 Padronização do processamento das amostras

Verificamos que para o uso do marcador CaT12 não seria possível fixar as células para depois fazer a marcação e aquisição de eventos, pois os resultados de marcação eram diferentes mesmo considerando a mesma amostra (Figura 4).

Figura 4- Comparação de marcação com peptídeo CaT12 em três pacientes. Para cada paciente foram feitos dois experimentos idênticos com a única diferença de terem as células fixadas ou não fixadas antes da marcação com CaT12.

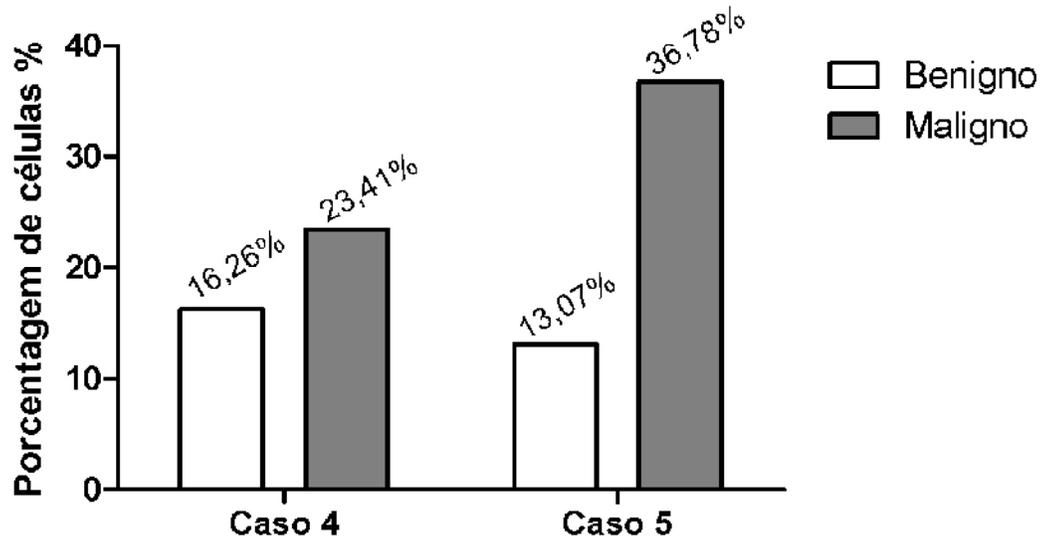


Fonte: Dos Autores

5.2.3 Perfil de marcação do CaT12 em amostras benigna e maligna de uma mesma pessoa

Em dois casos foram obtidas duas amostras de dois diferentes nódulos tireoidianos de uma mesma pessoa. Observamos que houve diferença entre as amostras do mesmo portador, conforme a Figura 5.

Figura 5- Comparação de marcação com peptídeo CaT12 em pacientes com dois fragmentos (benigno e maligno) em uma mesma pessoa.



Fonte: Dos Autores

5.3 CaT12 como marcador de malignidade

A porcentagem de positividade para cada grupo analisado pode ser visualizada na Tabela 1 e Figura 6. O CaT12 foi capaz de diferenciar os grupos ($P=0,0010$; Figura 6-B), bem como os grupos benigno e maligno ($P=0,0028$; Figura 6-A). O pós-teste de Múltipla Comparação de Bonferroni demonstrou que o CaT12 conseguiu diferenciar os grupos CPVF de NIFTP, CPVF de nódulo hiperplásico, CPVF e adenoma, conforme a Figura 6-B ($P < 0,05$). O uso da Curva ROC, com 29 amostras apresenta margem de erro de 18,19%, definiu os valores de *cut-offs* utilizados para estabelecer a positividade do CaT12 na Tabela 1. Os parâmetros diagnósticos demonstraram 100% de especificidade quando utilizado o *cut-off* $>26,76$ com $P=0,0002$ e Acurácia 82,76% (Tabela 2), contudo para que o teste diagnóstico possua maior sensibilidade utilizou-se o *cut-off* >22 obtendo uma acurácia semelhante, mas aumentou significativamente a sensibilidade para 86,67%, com menor índice de falsos negativos, o que é mais desejável na análise propedêutica.

Tabela 1 - Positividade para o peptídeo CaT12 em citometria de fluxo nos diferentes subtipos histológicos de biópsias de tireóide, de acordo com os *cut-offs* estabelecidos pela curva ROC e baseada nos escores de positividade para os grupos classificados como maligno e benigno.

<i>Cut-off</i>	NH		Bócio		Adenoma		NIFTP		CPT		CPVF		CMT	
	P/N	%	P/N	%	P/N	%	P/N	%	P/N	%	P/N	%	P/N	%
>22,00	2/7	28,6	0/2	0	0/3	0	0/3	0	6/9	66,7	4/4	100	1/1	100
>23,88	1/7	14,3	0/2	0	0/3	0	0/3	0	4/9	44,4	4/4	100	1/1	100
>26,76	0/7	0	0/2	0	0/3	0	0/3	0	4/9	44,4	4/4	100	1/1	100

Fonte: Dos autores

Abreviações: *Cut-offs* acima do valor calculado significa malignidade. NH= nódulo hiperplásico, NIFTP= neoplasia folicular não invasiva com padrão nuclear papilífero; CPT= carcinoma papilífero de tireóide; CPVF= carcinoma papilífero variante folicular; CMT carcinoma medular de tireóide; P= número de pacientes positivos; N = número total de pacientes; % = Porcentagem de positivos.

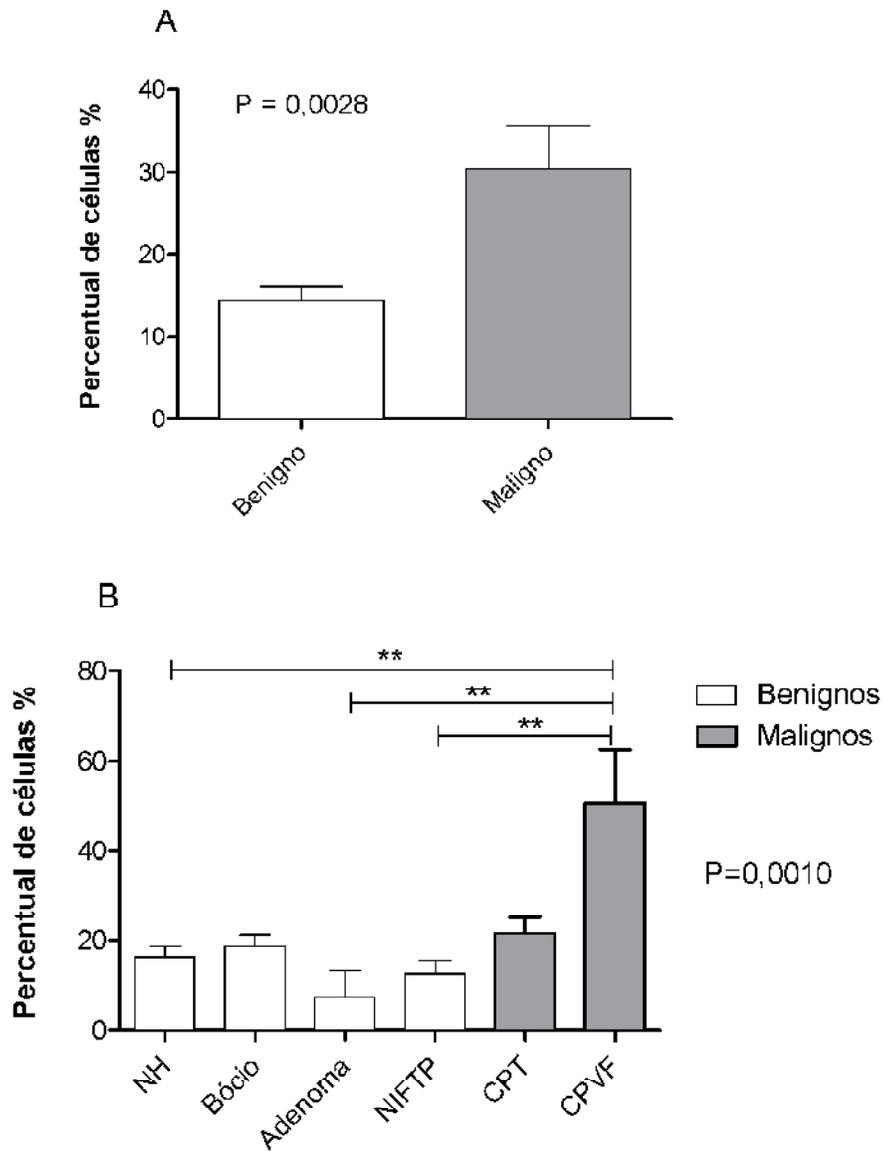
Tabela 2 - Parâmetros diagnósticos para o peptídeo CaT12 em três diferentes *cut-offs*.

<i>Cut-off</i>	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Acurácia (%)	Valor de P	<i>Odds Ratio</i>
>22,00	86,67	78,57	82,76	0,0001	53,33
>23,88	64,29	93,33	79,31	0,0017	25,20
>26,76	64,29	100,00	82,76	0,0002	53,55
PAAF x AP	100,00	7,14	53,57	1,0000	3,22
FRAG x AP	92,86	60,00	75,86	0,0052	19,50

Fonte: Dos autores

Abreviações: PAAF= Punção aspirativa de agulha fina; AP= Anátomo-patológico após a cirurgia; FRAG= Fragmento retirado na cirurgia. Valor de P do teste exato de Fisher.

Figura 6- Perfil de marcação do CaT12. A- Comparação dos grupos benigno e maligno. P= Teste *Mann Whitney*. B- Porcentagem de células positivas nos grupos nódulos hiperplásicos, bócio, adenoma, Neoplasia folicular não invasiva com padrão nuclear tipo papilífero (NIFTP), Carcinoma papilífero de tireoide (CPT) e carcinoma papilífero variante folicular (CPVF). P=Teste ANOVA.



Fonte: Dos Autores

Na Tabela 3 demonstramos a comparação entre os diagnósticos encontrados no pós-cirúrgico e fragmento, e citometria de fluxo de acordo com a categorias Bethesda. Essa comparação nos permitiu demonstrar que a citometria de fluxo foi mais comparável aos resultados do anátomo-patológico pós-cirúrgico, com maiores índices de acerto do que a análise patológica restrita ao fragmento.

5.4 Resultado da classificação citológica e histopatológica

Os resultados citológicos encontrados nas PAAFs-US seguiram a seguinte distribuição Bethesda: I- 3(10,34%); II- 1(3,44%); III- 3(10,34%); IV- 11(37,93%); V- 5(17,24%); VI- 6(20,68) conforme Tabela 3.

Os resultados anátomo-patológicos pós-operatórios foram: nódulo hiperplásico- 7 (24,17%); bócio- 2(6,89%); adenoma- 3(10,34%); NIFTP-3 (10,34%); CPC-9 (31,03%); CPVF-4 (13,79%); CMT-1 (3,44%).

Na Tabela 4 comparamos os resultados de Bethesda, CF, anátomo-patológico dos fragmentos e espécime cirúrgico com a revisão do anátomo.

5.5 Correlações CaT12 com aspectos clinico-patológicos

O desempenho do exame anátomo patológico (padrão ouro) foi comparado ao desempenho do marcador molecular CaT12 (*cut-off* >22%) na capacidade de diferenciar os grupos de indivíduos com diagnósticos de malignidade quanto às variáveis: (1) idade em anos, (2) tempo de evolução em anos, (3) características do nódulo ao US: (3.1) composição, (3.2) ecogenicidade, (3.3) vascularização, (3.4) calcificações, (4) resultado do Bethesda, (5) cirurgias (Tabela 5). Para processar essas comparações foi usado o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (*Wilcoxon rank-sum test*). O mesmo teste foi usado para comparar o desempenho do padrão ouro de diagnóstico (AP) com o desempenho do marcador molecular CaT12 na identificação de malignidade (Tabela 6).

Tabela 3 – Comparações entre os resultados do anátomo-patológico (AP) pós-cirúrgico e citometria de fluxo, com revisão AP pós-cirúrgico. Distribuição nas Categorias Bethesda, Amostras, Classificação, Resultados e Comentários.

Categorias Bethesda (N)	Amostras	Classificação	Resultado*	Comentário após revisão (AP)
Bethesda I (3)	Anátomo-Patológico Pós-Cirúrgico	(S) (M)	0	-
		Benigno	3	-
	Anátomo-Patológico Fragmento	(S) (M)	1(S)	FP (NIFTP**)
		Benigno	2	-
	Citometria de Fluxo	(S) (M)	0	-
Benigno		3	-	
Bethesda II (1)	Anátomo-Patológico Pós-Cirúrgico	(S) (M)	1(M)	FP (NIFTP)
		Benigno	0	-
	Anátomo-Patológico Fragmento	(S) (M)	0	-
		Benigno	1	-
	Citometria de Fluxo	(S) (M)	0	-
Benigno		1	-	
Bethesda III (3)	Anátomo-Patológico Pós-Cirúrgico	(S) (M)	0	-
		Benigno	3	-
	Anátomo-Patológico Fragmento	(S) (M)	1 (S)	FP (AD)
		Benigno	2	-
	Citometria de Fluxo	(S) (M)	1 (S)	FP (NH)
Benigno		2	-	
Bethesda IV (11)	Anátomo-Patológico Pós-Cirúrgico	(S) (M)	5 (M)	1 FP (AD)
		Benigno	6	-
	Anátomo-Patológico Fragmento	(S) (M)	3(S) 4(M)	1 FP (NH)
		Benigno	4	-
	Citometria de Fluxo	(S) (M)	5 (M)	1 FP (NH) *
Benigno		6	-	
Bethesda V (5)	Anátomo-Patológico Pós-Cirúrgico	(S) (M)	5	1FP (NIFTP)
		Benigno	0	-
	Anátomo-Patológico Fragmento	(S) (M)	1 (S) 3 (M)	-
		Benigno	1	1 FN (CPC)
	Citometria de Fluxo	(S) (M)	3	-
Benigno		2	1 FN (CPC)	
Bethesda VI (6)	Anátomo-Patológico Pós-Cirúrgico	(S) (M)	6	-
		Benigno	0	-
	Anátomo-Patológico Fragmento	(S) (M)	6	-
		Benigno	0	-
	Citometria de Fluxo	(S) (M)	4	-
Benigno		2	2 FN (CPC)	

Fonte: Dos autores

Abreviações: (S)= suspeito, (M)= maligno, NH= nódulo hiperplásico, NIFTP= neoplasia folicular não invasiva com padrão nuclear papilífero; CPC= carcinoma papilífero clássico, FP= falso positivo, FN= falso negativo.

* Os carcinomas foram estratificados em papilífero, folicular e medular, sem estratificação de suas variantes. * apesar de não ser concordante com AP o resultado permitiu a indicação cirúrgica

** A classificação do NIFTP foi considerada como benigna, conforme Nikiforov et. al. (2016)

Tabela 4 – Comparações entre as porcentagens de acerto entre PAAF, AP do fragmento e citometria de fluxo com o peptídeo CaT12 com revisão do AP pós-cirúrgico.

N	Bethesda	PAAF	Frag.	CaT12	AP
3	I	—	100%	100%	77%
1	II	0%	100%	100%	0%
3	III	33%	77%	77%	100%
11	IV	54%	91%	91%	91%
5	V	80%	80%	60%	80%
6	VI	100%	100%	66%	100%

Fonte: Dos autores

Abreviações: PAAF= punção aspirativa de agulha fina; FRAG= fragmento de tumor; AP= anátomo patológico; N= n amostral.

Tabela 5 – Dados clínicos utilizados para o teste Wilcoxon-Mann-Whitney (*Wilcoxon rank-sum test*).

Paciente	Cirurgia	Idade (anos)	Tempo Evolução (meses)	Características do nódulo ao US				PAAF		Citometria de fluxo	AP Fragmento	AP espécime cirúrgico REVISADO
				Composição	Ecogenicidade	Vascularização/ Chammass	Calcificações	Bethesda	Citologia	CaT12 (% células marcadas)		
1	TT	64	84	Misto		III		III	IND	6,89	NH	NH
2	TT EC	33	72	sólido	Hipoecóica	LII	Presentes	VI	CP	3,48	CPT	CPT
3	TT	48		sólido	Isoecóica	IV	Ausentes	V	CP	15,1	DF	NIFTP
4	TT E	86								16,26	Bócio	Bócio
4	TT D	86	3	Misto	Isoecóica	III	Ausentes	IV	T FOL	23,41	CPT	CPT
5	TT D	31	2	sólido	Isoecóica	III	Ausentes	IV	T FOL	36,78	CPVF	CPVF
5	TT E	31	2		Hipoecóica	III		III	IND	13,07	Adenoma	Adenoma
6	TT	27	24	sólido	Hipoecóica	III	Presentes	IV	T FOL	32,37	CPVF	CPVF

7	TT	57	2	sólido	Hipoecóica	III	Presentes	VI	CP	85,01	CPVF	CPVF
8	TP E	62	4	sólido	Hipoecóica	IV	Ausentes	IV	T FOL	15,68	NH	NH
9	TT	35	2		Isoecóica	III		IV	T FOL	1,96	Suspeito	Adenoma
10	TP E	24	12	sólido	Hiperecóica	III	Ausentes	IV	T FOL	12,8	NH	NH
11	TT	41	7					V	CP	29,79	CPT	CPT
12	TTEC	28	3	sólido	Hiperecóica	IV	Micro	V	CP	6,55	CPT	CPT
13	TP D	61	84	sólido		III	Macro	IV	T FOL	18,78	Suspeito	Adenoma
14	TT	80	46	sólido		IV	Presentes	VI	CP	29,17	CPT	CPT
15	TT EC	26	4	sólido	Hipoecóica	!!!	Presentes	V	CP	22,92	CP	CPT
16	TP D	64	48	Misto	Isoecóica	III		II	Bócio	4,02	Bócio	NIFTP
17	TP D	47	1	sólido	Isoecóica	III	Ausentes	IV	T FOL	18,93	NH	NH
18	TT	35	2	sólido	Hipoecóica	III	Presentes	VI	CA	29,57	CMT	CMT
19	TT	51	25	Misto	Isoecóica	III	Ausentes	VI	CP	31,65	CPVF	CPC
20	TT	37	36	sólido	Hipoecóica	LII	Ausentes			11,8	Suspeito	NIFTP
21	TP	79	3	Misto	Isoecóica		Presentes			21,19	Suspeito	Bócio
22	TP D	56		Sólido	Hipoecóica	III	Micro	III	IND	22,51	NH	NH
23	TP E	56		sólido	Hipoecóica	IV	Ausentes	VI	CP	15,44	CPT	CPT
24	TP E	43	12	Misto	Hiperecóica		Macro	IV	T FOL	13,09	Suspeito	NH
25	TP E	52	2	sólido	Hipoecóica	II	Micro	IV	T FOL	48,04	CPT	CPVF
26	TT	67	1	sólido	Hipoecóica	IV	Ausentes	V	Suspeito	31,31	NH	CPT
27	TP D	69	3	sólido	Isoecóica	III	Ausentes	IV	T FOL	24,35	NH	NH

Fonte: Dos autores

Abreviações: US= ultrassonografia; PAAF= punção aspirativa de agulha fina; AP= anátomo patológico; TT= tireoidectomia total; TT EC= tireoidectomia total com esvaziamento cervical; E= esquerda; D= direita; TP E= tireoidectomia parcial esquerda; TP D= tireoidectomia parcial direita; IND= Indeterminado; CP= carcinoma papilífero; T FOL= tumor folicular; CA= carcinoma; NH= nódulo hiperplásico, NIFTP= neoplasia folicular não invasiva com padrão nuclear papilífero; CPT= carcinoma papilífero de tireóide; CPC= carcinoma papilífero clássico; CPVF= carcinoma papilífero variante folicular; CMT carcinoma medular de tireóide; DF= Diferenciação folicular.

Tabela 6 - Comparação do desempenho do exame Anátomo-Patológico e o marcador molecular CaT12 na discriminação entre benignos e malignos por meio do teste Mann-Whitney (*Wilcoxon rank-sum test*).

	Anátomo-Patológico					CaT12 (<i>cut-off point 22%</i>)				
	Benigno x Maligno					Benigno x Maligno				
	n-amostal		p-valor	U	Z(U)	n-amostal		p-valor	U	Z(U)
Benigno	Maligno	Benigno				Maligno				
Anátomo-Patológico						16	13	0.0013*	35.5	3.0039
	15	14	0.0013*	36	3.0114					
Idade	15	14	0.1685	83	0.9602	16	13	0.3794	97	0.3070
Tempo de evolução	12	13	0.2073	63	0.8159	13	12	0.0869***	53	1.3598
Composição	12	13	0.2232	64	0.7615	13	12	0.2748	67	0.5983
Ecogenicidade	11	10	0.2631	46	0.6338	12	9	0.3094	47	0.4975
Vascularização	12	13	0.3721	72	0.3264	13	12	0.1996	62.5	0.8431
Calcificações	10	13	0.0236**	33	1.9846	11	12	0.0583***	40.5	1.5694
Bethesda	14	14	0.0003*	24	3.4001	15	13	0.0734***	66	1.4511
Cirurgia	15	14	0.0064*	48	2.4877	16	13	0.1673	82	0.9648

Fonte: Dos autores

* resultados significantes ao nível de $\alpha < 0.01$

** resultados significantes ao nível de $\alpha < 0.05$

*** resultados significantes ao nível de $0.05 < \alpha < 0.10$

Os resultados mostraram que ambos os métodos de diagnóstico (CaT12 e anátomo patológico) não identificaram diferenças entre os grupos de indivíduos com diagnóstico de malignidade e benignidade com relação às variáveis: (1) idade em anos ($P_{AP}=0,1685$; $P_{CaT12}=0,3794$), (3.1) composição ($P_{AP}=0,2232$; $P_{CaT12}=0,2748$), (3.2) ecogenicidade ($P_{AP}=0,2631$; $P_{CaT12}=0,3094$), (3.3) e vascularização ($P_{AP}=0,3721$; $P_{CaT12}=0,1996$). Ambos os métodos de diagnósticos encontraram diferenças significantes ao comparar os grupos de indivíduos com diagnóstico de malignidade e benignidade com relação às variáveis: (3.4) calcificações ($P_{AP}=0,0236$; $P_{CaT12}=0,0583$) e (4) resultado do Bethesda ($P_{AP}=0,0003$; $P_{CaT12}=0,0734$). Das variáveis analisadas, apenas as variáveis: (2) tempo de evolução em anos ($P_{AP}=0,2073$; $P_{CaT12}=0,0869$) e (5) cirurgia ($P_{AP}=0,0064$; $P_{CaT12}=0,1673$), mostrou comportamento não consonante entre os dois métodos de diagnóstico (Tabela 6).

A capacidade do marcador molecular CaT12 (*cut-off* > 22%) de distinguir o grupo de indivíduos identificados com diagnóstico de malignidade pelo exame anátomo-patológico também foi testada bem como a capacidade do exame AP em apontar os indivíduos identificados com diagnóstico de malignidade pelo CaT12 (*cut-off* > 22%) ($P_{AP}=0,0013$; $P_{CaT12}=0,0013$), ambos os resultados que reforçam a concordância entre os dois métodos de diagnóstico.

O grau de associação entre os dois métodos de diagnóstico foi verificado formalmente por meio de teste de hipótese e, para tal, a concordância entre os resultados apontados pelo método CaT12 e AP nos testes de Wilcoxon-Mann-Whitney em cada uma das 8 variáveis foi avaliada pelo Coeficiente de correlação TAU de Kendall (τ) (Tabela 7). O resultado apresentou $\tau=0,75$ e $p\text{-valor}=0,0047$ confirmando formalmente elevado e significativo grau de concordância entre os dois métodos de diagnóstico.

Tabela 7 - Teste da concordância entre os métodos de diagnóstico Anátomo-patológico e por meio de TAU de Kendall.

Anátomo-patológico x CaT12	
n-amostrai	8
$\tau(x,y)$	0.75
$Z\tau(x,y)$	2.5981
p-valor	0.0047*

Fonte: Dos Autores

*resultado significativo ao nível de $\alpha < 0.01$

A caracterização do marcador molecular CaT12 como método de diagnóstico de câncer tireoidiano foi feita por meio do cálculo de sua sensibilidade (86,67%), especificidade (78,57%), probabilidade de erro tipo I (α) (21,43%), probabilidade de erro tipo II (β) (13,33%), valor preditivo positivo (81,25%), valor preditivo negativo (84,62%), acurácia (82,76%) e Likelihood ratio negativa (-LR) (4,04%) e Likelihood ratio positiva (+LR) (0,17%) (Tabela 8). Dessa forma, os resultados obtidos na caracterização clássica do desempenho do marcador molecular em estudo corroboraram para a confirmação de seu ótimo desempenho como método de diagnóstico de câncer tireoidiano.

Tabela 8 - Avaliação de desempenho do teste diagnóstico.

	Valor
Sensibilidade	86.67 %
Especificidade	78.57 %
Falsos-positivos (erro tipo I)	21.43 %
Falsos-negativos (erro tipo II)	13.33 %
Valor preditivo positivo	81.25 %
Valor preditivo negativo	84.62 %
Acurácia	82.76 %
-LR (Likelihood Ratio) negativa	4.04 %
+LR (Likelihood Ratio) positiva	0.17 %

Fonte: Dos Autores

Na busca de correlações entre os resultados do marcador molecular em estudo e as variáveis (1) Idade em anos, (2) tempo de evolução em anos, (3.1) composição, (3.2) ecogenicidade, (3.3) vascularização, (3.4) calcificações, (4) resultado do Bethesda. Todas as variáveis foram avaliadas preliminarmente por meio do teste de normalidade de D'Agostino Pearson para verificação do pré-requisito de normalidade e escolha do teste adequado para busca de correlações (Tabela 9). Das 7 variáveis selecionadas, apenas não apresentaram normalidade as variáveis: (2) tempo de evolução em anos ($P < 0,0001$), (3.1) composição ($P = 0,0055$) e (3.2) ecogenicidade ($P < 0,0001$). Os resultados do marcador molecular CaT12 também foram submetidos ao mesmo teste de normalidade ($P < 0,0001$) sendo encontrado afastamento significativo da normalidade.

Tabela 9 - Teste de Normalidade de D'Agostino-Pearson.

	(% células marcadas)	Idade (anos)	Tempo de Evolução (anos)	Composição	Ecogenicidade	Vascularização	Calcificações	Bethesda
n-amostal	29	29	25	25	21	25	23	28
G1	2.1474	0.3324	1.553	-1.2967	-1.9233	0.4348	-0.4747	0.004
G2	7.2417	-0.9043	1.2396	-0.3537	2.0847	0.4901	-0.5404	-0.3593
Zg1	4.7415	0.9663	3.6382	-3.1651	-4.024	1.1882	-1.2506	0.0116
Zg2	3.5576	1.1594	1.3612	0.6234	1.7895	0.7563	0.7856	0.6463
K2	35.1389	2.2779	15.0896	10.4064	19.3951	1.9839	2.1811	0.4178
Graus de liberdade	2	2	2	2	2	2	2	2
p	< 0.0001	0.3202*	< 0.0001	0.0055	< 0.0001	0.3709*	0.336*	0.8115*

Fonte: Dos Autores

* Distribuição de probabilidades norma

Em face dos resultados supracitados optamos pela busca de correlações por meio do teste de correlação Rhô de Spearman (ρ) (Tabela 10). Houve correlação significativa ao nível de $0,05 < \alpha < 0,10$ (HAIR et al.; 2009) entre CaT12 e as variáveis: (2) tempo de evolução em anos, ($P=0,0667$) e (4) resultado do Bethesda ($P=0,1046$), e não foram encontradas correlações significantes entre CaT12 e as demais variáveis envolvidas nesse estudo. A correlação encontrada entre o tempo de evolução em anos e os resultados do CaT12 foram de média magnitude e sentido inverso ($\rho= -0,3724$), o que denota a existência de uma associação moderada entre o percentual de células marcadas e o tempo de evolução em sentido inverso, quanto maior o tempo de evolução menor o percentual de células marcadas. A correlação encontrada entre os resultados do Bethesda e o percentual de células marcadas foi de média magnitude e sentido direto ($\rho= -0,3132$), o que evidencia associação moderada entre o percentual de células marcadas e os resultados do Bethesda em sentido direto, quanto maior os valores de Bethesda maior o percentual de marcação.

Tabela 10- Correlação de Spearman entre Marcador Molecular CaT12 e indicadores de malignidade, idade e tempo de evolução.

	ρ de Spearman	p-valor	n-amostal
Idade	0.1563	0.4182	29
Tempo de evolução	-0.3724	0.0667*	25
Composição	0.1948	0.3597	25
Vascularização	-0.1733	0.4074	25
Calcificações	0.2675	0.2172	23
Ecogenicidade	0.0551	0.8126	21
Bethesda	0.3132	0.1046*	28

Fonte: Dos Autores

* nível de significância $0.05 < \alpha < 0.10$

6- DISCUSSÃO

Apresentamos nessa investigação uma nova plataforma diagnóstica baseada em citometria de fluxo que quebra paradigmas e aprimora sensivelmente a precisão do exame. Utilizamos o marcador CaT12 por ter se mostrado eficiente na análise de 232 nódulos tireoidianos, com 91,2% de sensibilidade e 85,1% de especificidade para separar nódulos malignos de benignos (REIS et. al., 2013).

Nesse estudo, o cálculo amostral executado é referendado por não diferir do perfil epidemiológico de grandes séries publicadas (HAUGEN et. al., 2016; LEE et. al., 2015), que incluem sexo, idade, sintomatologia e resultados de ultrassom, PAAF-US e anátomo-patológico.

É importante enfatizar que apesar dos achados do exame de ultrassom identificarem os nódulos suspeitos, a PAAF-US ser dirigida ao alvo de maior risco, e os pacientes serem estratificados pelo Sistema Bethesda, 10 a 30% dos exames citológicos são inconclusivos (NIKIFOROV et. al., 2016; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Dentre os pacientes analisados nessa investigação 20,68% possuíam amostra inadequada ou atípicas de significado indeterminado. Dentre as amostras analisadas, após três PAAF-US, 37,93% foram classificadas como tumores foliculares, 17,24% suspeitos e 20,68% com diagnóstico de câncer.

O grau de correlação entre a PAAF-US e os achados do US aumenta a sensibilidade do exame citológico (GHARIB et. al., 2016; HAUGEN et. al., 2016; REMONTI et. al., 2015; ZHANG et. al., 2015). Nesse estudo, a correlação encontrada entre os resultados do Bethesda e o percentual de células marcadas pelo CaT12 foi de média magnitude e sentido direto ($\rho=0,3132$). Essa associação moderada entre o percentual de células marcadas e os resultados do Bethesda pode ser explicada pela falta de padronização dos laudos de ultrassonografia.

Para as lesões com diferenciação folicular, Bethesda IV, o CaT12 demonstrou que em 90,9% dos casos, os resultados da citometria foram compatíveis com a revisão dos exames histológicos, o que comprova a eficiência do teste, pois foi capaz de diferenciar benignos de malignos conforme mostrado na Tabela 11. Em estudos retrospectivos que compararam os testes PAAF, BAG e AP pós-cirúrgico, a prevalência das lesões na BAG foram 77,8% benignas, 20,3% câncer e 1,8% não foram diagnosticados, resultados compatíveis com os obtidos pelo AP pós-cirúrgico. Por outro lado, a frequência na PAAF foi de 35,2% benignos, 16,8% câncer e 48,6% os resultados foram não diagnósticos. Em estudos prospectivos

comparando BAG, PAAF e AP, a BAG mostrou-se mais precisa na abordagem dessas lesões, reduzindo para 3,1% o número de casos não diagnosticados, e 23,6% indeterminadas especialmente aquelas lesões com diferenciação folicular, pois os critérios de malignidade são atribuídos pela invasão da cápsula e/ou vasos tumorais somente possíveis de serem identificadas no anátomo-patológico (HAHN et. al., 2017; IBRAHIM; WU, 2016; KIM et. al., 2016; MEDICI et. al., 2015; VALDERRABANO et. al., 2017; XU; GHOSSEIN, 2015). Essa limitação, também, ocorreu na análise histológica feita nos fragmentos dos casos estudados.

Os casos de NIFTP, que até recentemente faziam parte do CPVF capsulado e atualmente são consideradas lesões benignas (BIZZARRO et. al., 2016; HAHN et. al., 2017; JEON et. al., 2016; USTUN et. al., 2014), os três casos que foram identificados pelo marcador CaT12, devido a taxa de marcação celular estar abaixo de 22% enquanto que, nos APs dos espécimes cirúrgicos 2 tiveram os diagnósticos de cânceres. Após a revisão histológica confirmou-se tratar de NIFTP para os dois falso-positivos. Esses achados demonstram que o uso desse marcador poderá auxiliar os métodos diagnósticos já existentes (HAHN et. al., 2017; IBRAHIM; WU, 2016; LEE et. al., 2014; MEDICI et. al., 2015; VALDERRABANO et. al., 2017). Por outro lado, o marcador apresenta como vantagens a capacidade de identificar estruturas celulares alteradas e necessita de uma amostra menor.

O desempenho do CaT12 como teste diagnóstico foi muito bom, pois proporcionou uma acurácia de 82,76%, com sensibilidade de 86,67% e especificidade de 78,57%. Esses valores se tornam mais impactantes quando o desempenho do CaT12 analisado por citometria de fluxo é comparado ao desempenho dos outros marcadores analisados por imunohistoquímica. Os valores de especificidade, sensibilidade e acurácia do CaT12 por citometria de fluxo foram superiores aos outros marcadores, exceto para o marcador CD56, que apresentou os valores superiores em uma análise (DUNDEROVIC et al., 2015). Tais parâmetros diagnósticos, aparentemente, não se mantiveram homogêneos em outra investigação (CEYRAN et al., 2015), pois embora tenha mantido a alta especificidade, a sensibilidade foi de apenas 58,2% e o mais importante, identificou 60% das lesões benignas conforme Tabela 11.

Tabela 11– Comparações entre CaT12 e diferentes marcadores utilizados para o diagnóstico do Carcinoma Papilífero de Tireóide conforme apresentados na literatura.

Marcador	Deteção de CPT	SEN (%)	ESP (%)	AC (%)	Referência
CaT12 positivo (CF)	88,90	86,67	78,57	82,76	*
CaT12 positivo (IHC)	91,17	91,18	85,12	NI	(REIS et al., 2013)
CK19 positivo (IHC)	87,10	NI	NI	NI	(ZHU et al., 2010)
	84,20	84,2	36,70	72,70	(CEYRAN et al., 2015)
	86,20	75,41	70,89	NI	(DUNDEROVIC et al., 2015)
	96,30	96,30	40,40	75,10	(LIU et al., 2015)
Galectina-3 positivo (IHC)	91,60	NI	NI	NI	(ZHU et al., 2010)
	65,30	65,30	93,30	75,80	(CEYRAN et al., 2015)
	92,00	88,52	64,56	NI	(DUNDEROVIC et al., 2015)
HBME-1 positivo (IHC)	95,50	NI	NI	NI	(ZHU et al., 2010)
	71,30	71,30	78,80	73,90	(CEYRAN et al., 2015)
	75,90	71,31	84,81	NI	(DUNDEROVIC et al., 2015)
	85,30	85,30	62,80	76,60	(LIU et al., 2015)
CD56 negativo (IHC)	91,10	91,10	91,70	91,30	(CEYRAN et al., 2015)
	74,70	58,20	92,41	NI	(DUNDEROVIC et al., 2015)
Tireoperoxidase negativo (IHC)	88,00	88,00	86,20	87,30	(LIU et al., 2015)
e-caderina positivo (IHC)	86,10	63,30	86,10	77,60	(CEYRAN et al., 2015)
	92,10	61,70	92,10	80,70	(CEYRAN et al., 2015)

Fonte: Dos Autores

Abreviações: CPT=Carcinoma Papilífero de Tireóide; CF= Citometria de fluxo; IHC= imunohistoquímica; SEN = sensibilidade; ESP = especificidade; AC = acurácia; NI = não informado. *Resultados obtidos nessa investigação.

A capacidade do marcador molecular CaT12 (*cut-off* > 22%) de distinguir o grupo de indivíduos identificados com diagnóstico de malignidade pelo exame AP, também, foi testada, bem como a capacidade do exame AP em apontar os indivíduos identificados com diagnóstico de malignidade pelo CaT12 (*cut-off* > 22%) ($P_{AP}=0,0013$; $P_{CaT}=0,0013$). Ambos os resultados reforçam a concordância entre os dois métodos de diagnóstico (Tabela 6). Esses achados são superiores aos descritos na literatura. Houve correlação de moderada magnitude entre o peptídeo CaT12 e as variáveis tempo de evolução e resultado Bethesda (Tabela 6). Em relação ao tempo de evolução a correlação foi em sentido negativo, ou seja, quanto maior o tempo menor o percentual de células marcadas. A explicação desse achado pode ser devido ao uso dos diferentes consensos os quais recomendam a observação dos nódulos com poucos sinais sugestivos de malignidade (BALOCH et. al., 2016; HAHN et. al., 2017; IBRAHIM; WU, 2016; KIM et. al., 2016; MEDICI et. al., 2015; VALDERRABANO et. al., 2017; XU; GHOSSEIN, 2015). Quanto ao resultado Bethesda o sentido foi direto, quanto maior o percentual de marcação maior, a classificação Bethesda. Essa correlação pode contribuir nas lesões de padrão folicular, bem como na identificação dos NIFTPs atualmente estratificados como suspeitos para câncer nos exames citológicos (NIKIFOROV et. al., 2016).

Quando comparamos a plataforma CF com outros métodos utilizados recentemente como expressão gênica, PCR multiplex e sequenciamento de nova geração observamos que o custo da CF foi menor, mas o uso dessas novas tecnologias deve ser sempre associado ao contexto clínico, ultrassonográfico e achados citológicos (Tabela 12).

Tabela 12- Comparação do marcador CaT12 com outros testes diagnósticos.

TESTE	CaT12	Afirma ^a	ThyGenX ^b	ThyroMIR ^b	ThyroSeq ^c
Método	Citometria de Fluxo	Expressão RNAm	PCR multiplex	Expressão microRNA	Sequenciamento next generation
Resultado	+ / -	Benigno/suspeito	Mutação de gene específico/translocação	+ / -	Mutação de gene específico/translocação
Amostra	Fragmento Tumoral	2 PAAFs	1 PAAF c/ 50ng de material celular	Idem Thygenx	1-2 gotas
Força	Marca CPVF e CPT	Alto VPN	Alto VPP	Bom valor VPP, bom VPN quando combinado c/ Thygenx	Alto VPP e VPN
Limitações	Dados limitados para validação	Baixo VPP	Baixo VPN	Dados limitados para validação	Dados limitados para validação
Custo	US\$ 50	US\$ 4875 ^d (GEC e MTC) US\$ 975 MTC US\$ 475 BRAF	US\$ 1675 ^d	US\$ 3300 ^d	US\$ 3200 ^d

Fonte: Dos Autores; Dados das empresas Afirma, ThyGenX, ThyroMYR e ThyroSeq foram obtidos em ZHANG; LIN, 2016.

Abreviações: MTC = Carcinoma medular da Tireóide; BRAF = gene humano que produz uma proteína chamada B-Raf; GEC = *Gene Expression Classifier*; CPVF = Carcinoma Papilífero variante folicular; CPT = carcinoma papilífero de tireóide; PAAF = punção aspirativa com agulha fina; VPN e VPP = valores preditivos negativo e positivo.

a= Veracyte Inc, São Francisco, Califórnia.

b= Interpace Diagnostics, uma subsidiária PDI Inc, Parsippany, New Jersey.

c= ThyroSeq v2 é comercialmente oferecido por CBL PATH, Rye Brook, New York, enquanto o teste é feito e interpretado na Divisão de Patologia Molecular e Genômica do Centro médico da Universidade de Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania.

d= Dados derivados de NISHINO, 2016.

7- CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a nova plataforma diagnóstica, baseada em citometria de fluxo com o uso do marcador CaT12, poderá alterar significativamente a rapidez e precisão do diagnóstico do câncer de tireoide, tanto em material aspirado por PAAF-US quanto por BAG-US, sem depender apenas dos parâmetros citológicos ou histológicos e, conseqüentemente, poderá reduzir as angústias dos portadores de nódulos e dos profissionais que lidam com esses casos. Além disso, poderá reduzir os custos para o sistema de saúde, devido ao melhor resultado propedêutico. As perspectivas futuras apontam para o teste do marcador em amostras de rPAAF-US e BAG-US para demonstrar seu poder de auxiliar no diagnóstico precoce, já que o marcador não depende de fatores como invasão capsular e padrão nuclear para determinar malignidade.

REFERÊNCIAS

ABRAMOWITZ, M.; STEGUN, I. A. (Ed). **Handbook of Mathematical Functions**. New York, NY: Dover, 1965.

ADAMCZEWSKI, Z.; STASIOŁEK, M.; DEDECJUS, M.; et. al. Flow cytometry in the differential diagnostics of Hashimoto's thyroiditis and MALT lymphoma of the thyroid. **Endokrynologia Polska**, v. 66, n. 1, p. 73-78, 2015.

AHN, S. H.; HENDERSON, Y. C.; WILLIAMS, M. D.; et. al. Detection of Thyroid Cancer Stem Cells in Papillary Thyroid Carcinoma. **Clinical Endocrinology & Metabolism.**, v. 99, n. 2, p. 536-544, 2014.

ALEXANDER, E. K.; KENNEDY, G. C.; BALOCH, Z. W.; et. al. Preoperative Diagnosis of Benign Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology. **New England Journal of Medicine**, v. 367, p. 705-715, 2012.

ANGELL, T. E.; LECHNER, M. G.; SMITH, A. M.; et. al. Circulating Myeloid-Derived Suppressor Cells Predict Differentiated Thyroid Cancer Diagnosis and Extent. **Thyroid**, v. 26, n. 3, p. 381-9, 2016.

ASCHEBROOK-KILFOY, B.; JAMES, B.; NAGAR, S.; et. al. Risk Factors for Decreased Quality of Life in Thyroid Cancer Survivors: Initial Findings from the North American Thyroid Cancer Survivorship Study. **Thyroid**, v. 25, n. 12, p. 1313-1321, 2015.

AZOURY, S. C.; AUFFORTH, R.; HE, M.; et. al. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction-based detection of thyroid-specific gene expression in fine-needle aspirate for thyroid cancer recurrence evaluation: a case report and review of the literature. **Head Neck**, v. 37, E165-168, 2015.

BALOCH, Z. W.; SEETHALA, R. R.; FAQUIN; W. C.. et. al. Noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features (NIFTP): A changing paradigm in thyroid surgical pathology and implications for thyroid cytopathology. **Cancer Cytopathology**, v. 124, p. 616-620, 2016.

BHASIN, T. S.; MANNAN, R.; MANJARI M.; et. al. Reproducibility of 'The Bethesda System for reporting Thyroid Cytopathology: A MultiCenter Study with Review of the Literature. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 6, p. 1051-1054, 2013.

BIZZARRO, T.; MARTINI, M.; CAPODIMONTI, S.; et. al. Young investigator challenge: The morphologic analysis of noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features on liquid-based cytology: Some insights into their identification. **Cancer**, v. 124, p. 699-710, 2016.

BOROWITZ, M. J.; GUENTHER, K. L.; SHULTS, K. E.; et. al. Immunophenotyping of Acute Leukemia by Flow Cytometric Analysis: Use of CD45 and Right-Angle Light Scatter to Gate on Leukemic Blasts in Three-Color Analysis. **American Journal Clinical Pathology.**, v. 100, n. 5, p. 534-540, 1993.

CEYRAN, A. B.; ŞENOL, S.; ŞİMŞEK, B. Ç.; et. al. Role of cd56 and e-cadherin expression in the differential diagnosis of papillary thyroid carcinoma and suspected follicular-patterned lesions of the thyroid: the prognostic importance of e-cadherin. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 4, p. 3670-3680, 2015.

COHEN, J. **Statistical Power for the Behavioral Sciences**, 2 ed., Hillsdale, NJ., Lawrence Erlbaum Publishing, 1998.

CRIPPA, S.; MAZZUCHELLI, L.; CIBAS, E. S.; ALI, S. Z. **The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: Definitions, Criteria and Explanatory Notes**. USA: Springer, 2010.

DUNĐEROVIĆ, D.; LIPKOVSKI, J. M.; BORIČIĆ, I.; et. al. Defining the value of CD56, CK19, Galectin 3 and HBME-1 in diagnosis of follicular cell derived lesions of thyroid with systematic review of literature. **Diagnostic Pathology**, v. 10, p. 196, 2015.

FARSETTI, A.; PONTECORVI, A.; ANTONOZZI, I.; et al. Cytofluorometric analysis of lymphocyte subsets in thyroid aspirates from patients with autonomously functioning nodules. **Clinical Endocrinology (Oxf)**, v. 32, p. 729-738, 1990.

FLETCHER, C. D. M.. **Diagnostic Histopathology of Tumors**. China: Elsevier Sanders, ed. 4, v. 2, p. 1177-1272, 2012.

GHARIB, H.; PAPINI, E.; GARBER, J. R.; et. al. American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Associazione Medici Endocrinologi Medical Guidelines for Clinical Practice for the Diagnosis and Management of Thyroid Nodules-2016 Update. **Endocrine Practice**, v. 22, p. 622-639, 2016.

HAHN, S. Y.; SHIN, J. H.; LIM, H. K.; et. al. Preoperative differentiation between noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features (NIFTP) and non-NIFTP. **Clinical Endocrinology (Oxf)**, 2017.

HAIR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Multivariate Data Analysis**, 6 ed., Pearson Education Publishing. 2009.

HAUGEN, B. R.; ALEXANDER, E. K.; BIBLE, K. C.; et. al. 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, p. 1-133, 2016.

HO, A. S.; SARTI, E. E.; JAIN, K. S.; et. al. Malignancy rate in thyroid nodules classified as Bethesda category III (AUS/FLUS), **Thyroid**, v. 24, p. 832-839, 2014.

IBRAHIM, A. A.; WU, H. H. Fine-Needle Aspiration Cytology of Noninvasive Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma Is Cytomorphologically Distinct From the Invasive Counterpart. **American Journal Clinical Pathology**, v. 146, p. 373-377, 2016.

IGLESIAS, M. L.; SCHMIDT, A.; GHUZLAN, A. A.; et. al. Radiation exposure and thyroid cancer: a review. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, feb. 2017.

JEON, M. J.; SONG, D. E.; JUNG, C. K.; et. al. Impact of Reclassification on Thyroid Nodules with Architectural Atypia: From Non-Invasive Encapsulated Follicular Variant Papillary Thyroid Carcinomas to Non-Invasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-Like Nuclear Features. **Plos One**, v. 11, p. e0167756, 2016.

JUNG, Y. Y.; PARK, I. A.; KIM, M. A.; et. al. Application of chemokine CXC motif ligand 12 as a novel diagnostic marker in preoperative fine-needle aspiration biopsy for papillary thyroid carcinoma. **Acta Cytologica**, v. 57, p. 447-454, 2013.

KIM, B. A.; JEE, H. G.; YI, J. W.; et al. Expression Profiling of a Human Thyroid Cell Line Stably Expressing the *BRAFV600E* Mutation. **Cancer Genomics & Proteomics**, v. 14, p. 53-68, 2017.

KIM, T. H.; JEONG, D. J.; HAHN, S. Y.; et. al. Triage of patients with AUS/FLUS on thyroid cytopathology: effectiveness of the multimodal diagnostic techniques. **Cancer Medicine**, v. 5, p. 769-777, 2016.

LEE, S. H.; PARK, G. S.; JUNG, S. L.; et. al. Core-needle biopsy for the preoperative diagnosis of follicular neoplasm in thyroid nodule screening: A validation study. **Pathology – Research and Practice**, v. 212, p. 44-50, 2016.

LEE, S. H.; KIM, M. H.; BAE, J. S.; et. al. Clinical outcomes in patients with non-diagnostic thyroid fine needle aspiration cytology: usefulness of the thyroid core needle biopsy. **Annals of Surgical Oncology**, v. 21, p. 1870-1877, 2014.

LEE, Y. H.; BAEK, J. H.; JUNG, S. L.; et. al. Ultrasound-Guided Fine Needle Aspiration of Thyroid Nodules: A Consensus Statement by the Korean Society of Thyroid Radiology, **Korean Journal of Radiology**, v. 16, p. 391-401, 2015.

LI, D.; GAO, M.; LI, X.; XING, M. Molecular Aberrance in Papillary Thyroid Microcarcinoma Bearing High Aggressiveness: Identifying a “Tibetan Mastiff Dog” From Puppies. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, p. 1491-496, 2016.

LITHWICK-YANAI, G.; DROMI, N.; SHTABSKY, A.; et. al. Multicentre validation of a microRNA-based assay for diagnosing indeterminate thyroid nodules utilising fine needle aspirate smears. **Journal of Clinical Pathology**, v. 0, p. 1-8, 2016.

LIU, Z.; YU, P.; XIONG, Y.; et. al. Significance of CK19, TPO, and HBME-1 expression for diagnosis of papillary thyroid carcinoma. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 3, p. 4369-4374, 2015.

LIU, X.; MEDICI, M.; KWONG, N.; et. al. Bethesda Categorization of Thyroid Nodule Cytology and Prediction of Thyroid Cancer Type and Prognosis. **Thyroid**, v. 26, p. 256-261, 2016.

MA, H.; XU, S.; YAN, J.; et. al. The value of tumor markers in the diagnosis of papillary thyroid carcinoma alone and in combination. **Polish Journal of Pathology**, v. 65, p. 202-209, 2014.

- MEDICI, M.; KWONG, N.; ANGELL, T. E.; et. al. The variable phenotype and low-risk nature of RAS-positive thyroid nodules. **BMC Medicine**, v. 13, p. 184, 2015.
- NA, D. G.; BAEK, J. H.; JUNG, S. L.; et. al. Korean Society of Thyroid, R. Korean Society of, Core Needle Biopsy of the Thyroid: 2016 Consensus Statement and Recommendations from Korean Society of Thyroid Radiology. **Korean Journal of Radiology**, v. 18, p. 217-237, 2017.
- NIKIFOROV, Y. E.; CARTY, S. E.; CHIOSEA, S. I.; et. al. Impact of the Multi-Gene ThyroSeq Next-Generation Sequencing Assay on Cancer Diagnosis in Thyroid Nodules with Atypia of Undetermined Significance/Follicular Lesion of Undetermined Significance Cytology. **Thyroid**, v. 25, n. 11, p. 1217-23, 2015.
- NIKIFOROV, Y. E.; SEETHALA, R. R.; TALLINI, G.; et. al. Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Paradigm Shift to Reduce Overtreatment of Indolent Tumors. **JAMA Oncology**, v. 2, p. 1023-1029, 2016.
- NISHINO, M. Molecular cytopathology for thyroid nodules: a review of methodology and test performance. **Cancer Cytopathology**, v. 124, n. 1, p. 14-27, 2016.
- PAULSON, V. A.; SHIVDASANI, P.; ANGELL, T. E.; et. al. NIFTP Accounts for Over Half of "Carcinomas" Harboring RAS Mutations, **Thyroid**, feb. 2017.
- PYO, J. S.; SOHN, J. H.; KANG, G. Core Needle Biopsy Is a More Conclusive Follow-up Method Than Repeat Fine Needle Aspiration for Thyroid Nodules with Initially Inconclusive Results: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Pathology and Translational Medicine**, v. 50, p. 217-224, 2016.
- PUSZTASZERI, M.; ROSSI, E. D.; AUGER, M.; et al. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: Proposed Modifications and Updates for the Second Edition from an International Panel. **Acta Cytologica**, v. 60, p. 399-405, 2016.
- REIS, C. F.; CARNEIRO, A. P.; VIEIRA, C. U.; et. al. An antibody-like peptide that recognizes malignancy among thyroid nodules. **Cancer Letters**, v. 335, p. 306-313, 2013.
- REMONTI, L. R.; KRAMER, C. K.; LEITAO, C. B.; et. al. Thyroid ultrasound features and risk of carcinoma: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Thyroid**, v. 25, p. 538-550, 2015.
- ROSÁRIO, P. W.; WARD, L. S.; CARVALHO, G. A. et. al. Nódulo tireoidiano e câncer diferenciado de tireoide: atualização do consenso brasileiro. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, n. 4, p. 240-64, 2013.
- SANTOS, H. C. M. N.; ALENCASTRO, M. C.; MONAZZI, B. V.; et al. Estudo de punções de nódulos tireoidianos Bethesda III e IV versus confirmação histológica de malignidade. **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça Pescoço**, v.45, n. 1, p. 33-38, 2016.
- SHI, L. L.; DESANTIS, C.; JEMAL, A.; CHEN, A. Y. Changes in thyroid cancer incidence, post-2009 American Thyroid Association guidelines. **The Laryngoscope**, jan, 2017.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, p. 7-30, 2017.

SOPER, D. S. **A-priori Sample Size Calculator for Student t-Tests [Software]**. Disponível em <<http://www.danielsoper.com/statcalc>>. Acesso em 20 fev 2017

STACCHINI, A.; PACCHIONI, D.; DEMURTAS, A.; et al. Utility of Flow Cytometry as Ancillary Study to Improve the Cytologic Diagnosis of Thyroid Lymphomas. **Cytometry Part B**, v. 88B, p. 320–329, 2015.

TRIMBOLI, P.; NASROLLAH, N.; GUIDOBALDI, L.; et al. The use of core needle biopsy as first-line in diagnosis of thyroid nodules reduces false negative and inconclusive data reported by fine-needle aspiration. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 12, p. 61, 2014.

UDELSMAN, R.; ZHANG, Y.. The epidemic of thyroid cancer in the United States: the role of endocrinologists and ultrasounds. **Thyroid**, v. 24, p. 472-479, 2014.

USTUN, B.; CHHIENG, D.; VAN DYKE, A.; et al. Risk stratification in follicular neoplasm: a cytological assessment using the modified Bethesda classification. **Cancer Cytopathol**, v. 122, p. 536-545, 2014.

VALDERRABANO, P.; KHAZAI, L.; LEON, M. E.; et al. Evaluation of ThyroSeq v2 performance in thyroid nodules with indeterminate cytology. **Endocrine-Related Cancer**, v. 24, p. 127-136, 2017.

VEIGA, L. H. S.; NETA, G.; ASCHEBROOK-KILFOY, B.; et al. Thyroid cancer incidence patterns in Sao Paulo, Brazil and the U.S. SEER Program, 1997-2008. **Thyroid**, v. 23, n. 6, p. 748-757, 2013.

WOLINSKI, K.; STANGIERSKI, A.; RUCHALA, M. Comparison of diagnostic yield of core-needle and fine-needle aspiration biopsies of thyroid lesions: Systematic review and meta-analysis. **European Radiology**, v. 27, p. 431-436, 2017.

XING, M. Clinical utility of RAS mutations in thyroid cancer: a blurred picture now emerging clearer. **BMC Medicine**, v. 14, p. 12, 2016.

XU, B.; GHOSSEIN, R. Encapsulated Thyroid Carcinoma of Follicular Cell Origin. **Endocrine Pathology**, v. 26, p. 191-199, 2015.

ZHANG, Y-Z.; XU, T.; CUI, D.; et al. Value of TIRADS, BSRTC and FNA-BRAF^{V600E} mutation analysis in differentiating high-risk thyroid nodules. **Scientific Reports** 5, n. 16927, 2015.

ZHANG, M.; LIN, O. Molecular Testing of Thyroid Nodules: A Review of Current Available Tests for Fine-Needle Aspiration Specimens. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 140, n. 12, p. 1338-1344, 2016.

ZHU, X.; SUN, T.; LU, H.; et al. Diagnostic significance of CK19, RET, galectin-3 and HBME-1 expression for papillary thyroid carcinoma. **Journal of Clinical Pathology**, v. 63, p. 786-789, 2010.

ANEXO 1 – Parecer de Aprovação do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: PAPEL DO MARCADOR CAT12 NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER TIREOIDIANO

Pesquisador: PAULO TANNUS JORGE

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 35353213.4.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.763.023

Apresentação do Projeto:

A presente apresentação trata-se de emenda que tem a seguinte justificativa por parte dos Pesquisadores:

"Viu-se a necessidade de complementar o estudo com a coleta adicional de material biológico de pacientes como forma de validar a tecnologia proposta anteriormente, propusemos o diagnóstico auxiliar no diagnóstico complementar do câncer de tireóide em biópsias através da citometria de fluxo, uma técnica que necessita de material biológico fresco, sem congelamento ou parafina. Para não prejudicar os procedimentos clínicos atualmente recomendados, e de forma a permitir a comparação com a confirmação patológica, a coleta será feita após a finalização da cirurgia e retirada da peça cirúrgica suspeita, em que um fragmento de aproximadamente 0,5 cm de largura por 0,5 cm de comprimento será coletado e imediatamente processado, não acarretando nenhum risco complementar ao paciente, e nem levando à procedimentos diferentes dos que já são feitos durante a cirurgia de tireodectomia. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em anexo, será aplicado pelo médico responsável pela cirurgia antes da mesma e o material só será coletado após essa autorização. Os objetivos e justificativas do projeto continuam sendo os mesmos."

Segundo foi apresentado no protocolo:

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Laboratório de Nanobiotecnologia

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “PAPEL DO MARCADOR CAT12 NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER TIREOIDIANO”, sob a responsabilidade dos seguintes pesquisadores: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, Dr. Paulo Tannus Jorge e Sindeval José da Silva.

O projeto refere-se à busca por “sinais” no organismo que possam identificar a resposta individual contra o câncer de tireóide. A obtenção de biomarcadores que sirvam tanto como alvos diagnósticos quanto alvos terapêuticos para o câncer em geral, podem melhorar significativamente a qualidade de vida dos indivíduos portadoras dessa patologia, além disso, pode auxiliar na detecção precoce da malignidade, antecipando o tratamento e evitando assim, procedimentos cirúrgicos desnecessários.

Você poderá encaixar-se em um dos dois grupos seguintes: casos (câncer) e controles (ausência de câncer). Para realização dos exames laboratoriais, será necessária a coleta de um fragmento da lesão (100 mg) após o procedimento cirúrgico. O tecido será retirado normalmente e somente uma pequena quantidade deste material será utilizada na pesquisa. Esse procedimento será realizado conforme recomendação clínica e não será de forma alguma alterado para a realização desta pesquisa.

Não haverá, portanto, risco adicional, a não ser os que normalmente podem acontecer em qualquer procedimento cirúrgico. O material coletado será enviado ao Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, onde serão realizados experimentos com as células do tecido coletado.

As responsáveis pelo recebimento do material serão a aluna de doutorado Aline Gomes de Souza e Carolina Fernandes Reis. O médico Sindeval José da Silva ficará responsável pela aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pela cirurgia e coleta das amostras.

Os resultados da pesquisa serão publicados, mas em nenhum momento você, como participante da pesquisa, será identificado.

Não haverá gasto financeiro para quem aceitar participar, nem direito a pagamento pela sua participação. O seu tratamento não será alterado de nenhuma forma para a execução da pesquisa.

Você tem o direito de pedir esclarecimentos a respeito da finalidade da pesquisa, destino do material coletado e resultado dos exames realizados. Informações adicionais poderão ser obtidas no seguinte endereço: Av. Amazonas, s/n, Bloco 2E, Sala 248, Campus Umuarama – Telefone: 3225-8440 (falar com Luiz Ricardo Goulart Filho).

Você, mesmo concordando em participar da pesquisa, poderá desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio. A desistência da participação não implicará em prejuízo ao seu tratamento.

Pelos presentes termos apresentados por este documento, concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Uberlândia, de de 20.....

Pesquisador responsável pela coleta do Termo de Consentimento

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

ANEXO 3 – Instrumento de Coleta de Dados



Ficha para análise de prontuário:

Número de entrada:

Data de nascimento:

Sexo : M F

Data primeira consulta:

Nº biopsia (PAAF):

Idade:

Nº Anátomo – patológico:

História tireoide na família sim (qual?) _____ não

Características do nódulo:

Achado: Casual

Função tireoidiana: Normal Hipo Hiperfuncionante

Anticorpos: Positivo Negativo

História de radiação: Sim Não

Resultado do exame de ultrassom:

Número de nódulos: Único Múltiplos

Tamanho: mm

Calcificação: Não Sim: Grosseira Microcalcificações

Limites: Regulares ou Irregulares

Halo: Ausente Presente: Completo Incompleto

Ecogenicidade: ISO Hipo Hiper

Ecotextura: Homogênea Heterogênea

Vascularização: Ausente
 Periférica
 Periférica e Central
 Predomínio Central
 Difuso

Resultado PAAF-US Bethesda: I. II. III. IV. V. VI.

Resultado Citometria de Fluxo: _____

Resultado exame Anátomo Patológico após tireoidectomia:

I- Fragmento do Tumor _____

II- Espécime Cirúrgico _____