



Universidade de Brasília

Faculdade de Ceilândia

Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde

Influência de alterações em padrões moleculares no prognóstico de pacientes diagnosticados com Câncer da Tireoide submetidos a doses do Radiofármaco Iodeto de Sódio (^{131}I).

LIGIA CANONGIA DE ABREU CARDOSO DUARTE

Brasília – DF

2023

LIGIA CANONGIA DE ABREU CARDOSO DUARTE

Influência de alterações em padrões moleculares no prognóstico de pacientes diagnosticados com Câncer da Tireoide submetidos a doses do Radiofármaco Iodeto de Sódio (^{131}I).

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde, da Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília, Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Doutora em Ciências e Tecnologias em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Brasília – DF

2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

DC268i Duarte, Ligia Canongia
Influência de alterações em padrões moleculares no
prognóstico de pacientes diagnosticados com Câncer da
Tireoide submetidos a doses do Radiofármaco Iodeto de Sódio
(¹³¹I). / Ligia Canongia Duarte; orientador Diêgo Madureira
Oliveira; co-orientador Izabel Cristina Silva. -- Brasília,
2023.
208 p.

Tese(Doutorado em Ciências e Tecnologias em Saúde) --
Universidade de Brasília, 2023.

1. BAX (-248 G>A) / BCL-2 (128 G>A). 2. MAOA uVNTR. 3.
IL1B (+3954 C/T). 4. IL5 (-703 C/T). 5. IL12B (+1188 A/C).
I. Oliveira, Diêgo Madureira, orient. II. Silva, Izabel
Cristina, co-orient. III. Título.

LIGIA CANONGIA DE ABREU CARDOSO DUARTE

Influência de alterações em padrões moleculares no prognóstico de pacientes diagnosticados com Câncer da Tireoide submetidos a doses do Radiofármaco Iodeto de Sódio (^{131}I).

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde, da Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília, Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Doutora em Ciências e Tecnologias em Saúde.

Banca examinadora

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira (Presidente)
(Universidade de Brasília)

Prof^a. Dr^a. Vivian Taís Fernandes Cipriano
(UDF)

Prof. Dr. Marciano Régis Rubini
(EMBRAPA)

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido
(Universidade de Brasília)

Prof^a. Dr^a. Daniela Castilho Orsi (Suplente)
(Universidade de Brasília)

Ao meu pai, Edgard de Abreu Cardoso, *in memoriam*, que partiu demonstrando todos os dias o orgulho que sentia da caçula doutoranda, como ele mesmo dizia.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me mostrar sempre o melhor caminho para superar todas dificuldades.

À Universidade de Brasília (UnB), à Faculdade de Ceilândia (FCE) e seu corpo docente por me proporcionar imenso aprendizado no decorrer da Pós-Graduação.

À minha grande mentora Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva, pelo carinho, aprendizado, suporte, orientação e amizade em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira, por todo empenho, dedicação e paciência no decorrer dos anos de Doutorado.

Aos técnicos de laboratório Lorena e Elias, por todo apoio, suporte e carinho nos longos dias de experimentos laboratoriais.

Aos meus amigos de laboratório Jéssica, Aline, Gabriel e em especial Caroline Fratelli por me apoiar sempre e me auxiliar no desenvolvimento das análises estatísticas do trabalho.

Ao CNPq, FAPDF e UnB pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu marido, por sempre estar ao meu lado apoiando e torcendo pelo meu sucesso.

À toda minha família e amigos pela contribuição valiosa durante minha pós-graduação.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo. ”

Nelson Mandela

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 TIREOIDE E FISIOLOGIA HORMONAL.....	17
1.2 CÂNCER DE TIREOIDE	21
1.3 DIAGNÓSTICO	29
1.4 TRATAMENTO	33
1.5 POLIMORFISMO GENÉTICO	35
1.5.1 Anti-apoptotic B-cell lymphoma 2 (BCL2) e Pro-apoptotic B-cell lymphoma 2-associated X protein (BAX)	35
1.5.2 Enzima Monoamina Oxidase (MAO)	39
1.5.3 Interleucina-1B	40
1.5.4 Interleucina-5	42
1.5.5 Interleucina-12	43
2. OBJETIVOS	45
2.1 OBJETIVOS GERAIS	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
3. METODOLOGIA	46
3.1 DELINEAMENTO	46
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	46
3.3 CÁLCULO AMOSTRAL.....	46
3.4 COMITÊ DE ÉTICA E TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	47
3.5 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA E AMOSTRA	47
3.6 METODOLOGIA LABORATORIAL	48
3.6.1 Extração e quantificação de DNA.....	48
3.6.2 PCR	49
3.6.2.1 PCR-RFLP do gene BAX (-248 G/A) rs4645878.	50
3.5.2.2 PCR-RFLP do gene <i>BCL2</i> (128 G/A), Ala43Thr, rs1801018	51
3.5.2.3 PCR do gene <i>MAOA</i> uVNTR.....	52
3.5.2.4 PCR-RFLP do gene <i>IL1B</i> (+3954 C/T)	52
3.5.2.5 PCR-RFLP do gene <i>IL5</i> (-703 C/T).....	53
3.5.2.6 PCR-RFLP do gene <i>IL12B</i> (+1188 A/C) região não traduzida rs3212227.....	54
3.7 PARÂMETRO INFLAMATÓRIO DA IL-1 β	55
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	55
4 RESULTADOS	57

4.1 RESULTADOS DAS ANÁLISES MOLECULARES DO GENE <i>BAX</i> (-248 G/A) rs4645878.....	57
4.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES MOLECULARES DO GENE <i>BCL2</i> (+128 G/A), Ala43Thr, rs1801018.....	63
4.3 RESULTADOS DAS ANÁLISES MOLECULARES DO GENE <i>MAOA</i> uVNTR	68
4.4 RESULTADOS DAS ANÁLISES MOLECULARES DO GENE <i>IL1B</i> (+3954 C/T) rs1143634.....	75
4.5 RESULTADOS DAS ANÁLISES MOLECULARES DO GENE <i>IL5</i> (-703 C / T)	87
4.6 RESULTADOS DAS ANÁLISES MOLECULARES DO GENE <i>IL12B</i> (+1188 A/C) região não traduzida, rs3212227	93
5 DISCUSSÃO	98
6 CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalências de novos casos de neoplasia em mulheres, 2020.....	26
Tabela 2 - Estimativas, para o ano de 2023, das taxas brutas e ajustadas a de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária, Brasil.	27
Tabela 3 - Estimativas para o ano de 2023 das taxas brutas e ajustadas a de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária, Distrito Federal.	28
Tabela 4 - Sistema Bethesda para laudos citopatológicos de tireoide.....	30
Tabela 5 - Critérios de estadiamento TNM.	32
Tabela 6 - Lista de oligonucleotídeos.	49
Tabela 7 - Distribuição genotípica do polimorfismo <i>BAX</i> (-248 G/A) nos grupos caso e controle.	58
Tabela 8 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 e P-valores das variáveis Tireoglobulina, TSH e IMC nos pacientes diagnosticados com CPT, conforme o genótipo do polimorfismo <i>BAX</i> (-248 G/A).....	59
Tabela 9 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 e P-valores das variáveis Tireoglobulina, TSH e IMC nos pacientes diagnosticados com CPT, conforme o genótipo do polimorfismo <i>BAX</i> (-248 G/A).....	61
Tabela 10 - Estudo da associação entre o estadiamento TNM e pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo <i>BAX</i> (-248 G/A).	62
Tabela 11 - Distribuição genotípica do polimorfismo <i>BCL2</i> (+128 G/A), Ala43Thr nos grupos caso e controle.	63
Tabela 12 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 e P-valores das variáveis Tireoglobulina, TSH e IMC nos pacientes diagnosticados com CPT, conforme o genótipo do polimorfismo <i>BCL2</i> (+128 G/A).....	64
Tabela 13 - Estudo da associação entre a distribuição da antitireoglobulina (UI/mL), sexo e dose administrada (mCi) do radiofármaco nos pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo <i>BCL2</i> (+128 G/A).....	66
Tabela 14 - Estudo da associação entre o estadiamento TNM e pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo <i>BCL2</i> (+128 G/A). .	67
Tabela 15 - Distribuição genotípica do polimorfismo <i>MAOA</i> uVNTR nos grupos caso (PTC) e controle (saúdável).	69

Tabela 16 - Distribuição genotípica do polimorfismo <i>MAOA</i> uVNTR de acordo com os alelos 3R e 4R nos grupos caso (PTC) e controle (saúdável).....	70
Tabela 17 - Mediana, percentil 25, percentil 75 e valores p de tireoglobulina (Tg), hormônio estimulante da tireoide (TSH) e variáveis do IMC em pacientes diagnosticados com câncer papilífero de tireoide (PTC), de acordo com seu genótipo <i>MAOA</i> uVNTR.	71
Tabela 18 - Estudo da associação entre a distribuição da antitireoglobulina (UI/mL), sexo e dose administrada (mCi) do radiofármaco nos pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo <i>MAOA</i> uVNTR.	73
Tabela 19 - Estudo da associação entre o estadiamento TNM e pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo <i>MAOA</i> uVNTR.....	74
Tabela 20 - Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo <i>IL1B</i> + 3954C/T em indivíduos com CPT e grupo controle.	75
Tabela 21 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 e P-valores das variáveis Tireoglobulina, TSH e IMC nos pacientes diagnosticados com CPT, conforme o genótipo do polimorfismo <i>IL1B</i> +3954 C/T.	77
Tabela 22 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 e P-valores das variáveis Tireoglobulina, TSH e IMC nos pacientes diagnosticados com CPT, conforme o genótipo do polimorfismo <i>IL1B</i> +3954 C/T.	79
Tabela 23 - Estudo da associação entre o estadiamento TNM e pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo <i>IL1B</i> +3954 C/T.....	80
Tabela 24 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 dos níveis de IL-1 β antes da iodoterapia, conforme o genótipo do polimorfismo <i>IL1B</i> +3954 C/T.....	81
Tabela 25 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 dos níveis de IL-1 β do grupo controle e do grupo caso antes da iodoterapia, conforme o genótipo do polimorfismo <i>IL1B</i> +3954 C/T.	83
Tabela 26 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 dos níveis de IL-1 β do grupo controle e do grupo caso depois da iodoterapia, conforme o genótipo do polimorfismo <i>IL1B</i> +3954 C/T.	84
Tabela 27 - Distribuição genotípica do polimorfismo <i>IL5</i> (-703 C / T) nos grupos caso e controle.....	87
Tabela 28 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 e P-valores das variáveis Tireoglobulina, TSH e IMC nos pacientes diagnosticados com CPT, conforme o genótipo do polimorfismo <i>IL5</i> (-703 C/T).	89

Tabela 29 - Estudo da associação entre a distribuição da antitireoglobulina (UI/mL), sexo e dose administrada (mCi) do radiofármaco nos pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo <i>IL5</i> (-703 C/T).....	91
Tabela 30 - Estudo da associação entre o estadiamento TNM e pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo <i>IL5</i> (-703 C/T).....	92
Tabela 31 - Distribuição genotípica do polimorfismo <i>IL12B</i> (+1188 A/C) nos grupos caso e controle.....	93
Tabela 32 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 e P-valores das variáveis Tireoglobulina, TSH e IMC nos pacientes diagnosticados com CPT, conforme o genótipo do polimorfismo <i>IL12B</i> (+1188 A/C).....	94
Tabela 33 - Estudo da associação entre a distribuição da antitireoglobulina (UI/mL), sexo e dose administrada (mCi) do radiofármaco nos pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo <i>IL12B</i> (+1188 A/C).....	96
Tabela 34 - Estudo da associação entre o estadiamento TNM e pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo <i>IL12B</i> (+1188 A/C).	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Glândula tireoide.	17
Figura 2 – Folículos tireoidianos e uma célula folicular demonstrando a superfície apical que delimita o lúmen do folículo (colóide) e a superfície basal (ou basolateral) voltada para o espaço extrafolicular.	18
Figura 3 - A produção de hormônios T3 e T4 por célula folicular tireoidiana.	20
Figura 4 - Neoplasia maligna de tireoide dividida em três grupos principais: câncer bem-diferenciado, câncer pouco-diferenciado e câncer desdiferenciado.	22
Figura 5 - Estimativa global padronizada por idade para mortalidade de câncer de tireoide, 2018.	24
Figura 6 - Notificações de câncer de tireoide em homens e mulheres no período de 2013 a 2020.	25
Figura 7 - Taxas de mortalidade por câncer de tireoide, brutas e ajustadas por idade, pelas populações mundial e brasileira de 2010, por 100.000 mulheres, Brasil, entre 2009 e 2019 ²²	25
Figura 8 – Nódulos avaliados por US.	29
Figura 9 - Via mitocondrial da apoptose.	36
Figura 10 - Promoção da apoptose pelo Homodímero BAX-BAX na membrana mitocondrial.	37
Figura 11 - Desaminação oxidativa de neurotransmissores monoamina (MAO).	39
Figura 12 - Box-plots demonstrando a variação entre os valores de dosagem de IL-1 β antes e depois da iodoterapia.	85
Figura 13 - Box-plots demonstrando a variação entre os valores de dosagem de IL-1 β no grupo controle e no grupo caso antes da iodoterapia.	86
Figura 14 - Box-plots demonstrando a variação entre os valores de dosagem de IL-1 β no grupo controle e no grupo caso depois da iodoterapia.	86

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética do Centro Universitário de Brasília (UniCEUB).....	116
ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (GRUPO CASO).	120
ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (GRUPO CONTROLE).	123
ANEXO D - Termo de guarda de material biológico.	126
ANEXO E - Prontuário do paciente do grupo caso.....	128
ANEXO F - Artigo científico publicado na revista científica <i>The international Journal of Biological Markers</i>	129
ANEXO G - Normas de publicação do periódico no International Journal of Biological Markers.	135
ANEXO H - Avaliação Scopus percentil 76%.....	154
ANEXO I - Certificado de Premiação Prêmio Rui Curí de MELHOR TRABALHO APRESENTADO no IV Simpósio de Farmácia da UnB: E-SIMPFAR.....	155
ANEXO J - Produtos associados direta e indiretamente com a tese.....	156

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACR	<i>American College of Radiology</i>
anti-TPO	anticorpos antitireoperoxidase
ATA	<i>American Thyroid Association</i>
Bax	<i>pro-apoptotic B-cell lymphoma 2-associated X protein</i>
BCL-2	<i>anti-apoptotic B-cell lymphoma 2</i>
CPT	carcinoma papilífero de tireoide
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DIT	di-iodotirosina
DUOX	oxidase de dupla função do sistema
ETA	<i>European Thyroid Association</i>
EUA	Estados Unidos da América
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HRP	Peroxidase de raiz-forte
I ⁻	iodeto
IBGE	Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de confiança
IL1	interleucina-1
IL-1Ra	Antagonista de receptor de interleucina 1
IL12	interleucina-12
IL5	interleucina-5
IL-5R α	cadeia alfa do receptor de IL-5
IMC	Índice de Massa Corporal
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INF- γ	Interferon- γ
IYD1	Iodotirosina desalogenase 1
LT4	Levotiroxina
LPS	Lipopolissacarídeos
MAO	Monoamina Oxidase
MAOA	Monoamina Oxidase A
<i>MAOA-H</i>	<i>MAOA-High</i>
<i>MAOA-L</i>	<i>MAOA-Low</i>
MIT	mono-iodotirosina

MGEN	<i>Etude Epidémiologique de Femmes de la Mutuelle Générale de l'Education Nationale</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NIS	simportador de iodeto de sódio
ox-LDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
pb	pares de base
PDS	pendrina
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIT	Radioiodoterapia
RTSH	receptor de TSH
SIM/MS	Sistema de Informações sobre Mortalidade – Ministério da Saúde
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SP1	Proteína de Especificidade 1
T3	triiodotironina
T4	tiroxina
Tg	tireoglobulina
TgAb	Antitireoglobulina
Th	<i>T Helper</i>
TNM	Tumor-Nódulo-Metástase
TPO	peroxidase tireoidiana
TRH	hormônio liberador de tireotrofina
TSH	hormônio tireoestimulante
UICC	União Internacional para o Controle do Câncer
uVNTR	<i>upstream VNTR</i>
VNTR	<i>Variable number of tandem repeats</i>

RESUMO

O câncer de tireoide é responsável por aproximadamente 1% de todos os cânceres e é o tumor endócrino mais comum em todo o mundo. O carcinoma folicular da tireoide é responsável por 10-25% das malignidades desta glândula. O carcinoma papilífero de tireoide (CPT) é o subtipo mais comum sendo considerado com melhor prognóstico geral. Dentre os diversos marcadores moleculares descritos estão variações genéticas que podem ser entendidas como a presença de alterações moleculares em pelo menos um por cento da população, conhecidas como polimorfismos. Marcadores moleculares para câncer de tireoide são encontrados diferentes tipos de câncer, e a compreensão de seus mecanismos moleculares abre novas perspectivas no diagnóstico e tratamento. O objetivo do presente estudo é investigar a relação qualidade de vida e background genético em pacientes diagnosticados com Carcinoma Papilífero da Tireoide atendidos em serviço de saúde localizado no Distrito Federal (Brasil). Este estudo é pioneiro na análise dos polimorfismos *BAX* (-248 G>A), *BCL-2* (128 G>A), *MAOA* uVNTR, *IL1B* (+3954 C/T), *IL5* (-703 C/T), *IL12B* (+1188 A/C) associados ao Carcinoma Papilífero de Tireoide em uma amostra do Distrito Federal, Brasil. O estudo sugere que quanto a presença do alelo G no polimorfismo do gene *BAX* (-248 G/A) e a ocorrência de câncer de tireoide, o alelo G é mais comum entre os grupos ($p=0,009$) e, ao se analisar os genótipos dicotomizados, o genótipo GG é um fator de proteção para o Carcinoma Papilífero de Tireoide ($p=0,012$; OR=0,313; IC=0,123-0,794). Ao analisar o polimorfismo *MAOA* uVNTR no estadiamento TNM do CPT, o alelo 3R parece associar-se à gravidade da patogênese do PTC, uma vez que a presença de pelo menos um alelo 3R foi associada a maior tamanho do tumor (estadiamento T3+T4) e 77,8% ($n=7$) dos pacientes com PTC do genótipo 4R@ foram categorizados no estadiamento T1+T2 ($p=0,018$). Ao analisar a dosagem da *IL-1 β* foi possível verificar diferenças estatísticas na dosagem de *IL-1 β* do grupo caso antes e após o tratamento quando analisados os genótipos CC ($p<0,001$) e TT ($p<0,001$), quando comparados ao grupo controle.

Palavras-chave: *BAX* (-248 G>A), *BCL-2* (128 G>A), *MAOA* uVNTR, *IL1B* (+3954 C/T), *IL5* (-703 C/T), *IL12B* (+1188 A/C).

ABSTRACT

Thyroid cancer accounts for approximately 1% of all cancers and is the most common endocrine tumor worldwide. Follicular thyroid carcinoma accounts for 10-25% of malignancies of this gland. Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common subtype and is considered to have the best overall prognosis. Among the various molecular markers described are genetic variations that can be understood as the presence of molecular alterations in at least one percent of the population, known as polymorphisms. Molecular markers for thyroid cancer are found in different types of cancer, and understanding their molecular mechanisms opens up new perspectives in diagnosis and treatment. The aim of the present study is to investigate the relationship between quality of life and genetic background in patients diagnosed with Papillary Thyroid Carcinoma treated at a health service located in the Federal District (Brazil). This study is a pioneer in the analysis of the polymorphisms BAX (-248 G>A), BCL-2 (128 G>A), MAOA uVNTR, IL1B (+3954 C/T), IL5 (-703 C/T), IL12B (+1188 A/C) associated with Papillary Thyroid Carcinoma in a sample from the Federal District, Brazil. The study suggested that regarding the presence of the G allele in the polymorphism of the BAX gene (-248 G/A) and the occurrence of thyroid cancer, the G allele is more common between the groups ($p=0.009$) and, when analyzing the dichotomized genotypes, the GG genotype is a protective factor for Papillary Thyroid Carcinoma ($p=0.012$; OR=0.313; CI=0.123-0.794). When analyzing the MAOA uVNTR polymorphism in TNM staging of PTC, the 3R allele seems to be associated with the severity of PTC pathogenesis, since the presence of at least one 3R allele was associated with larger tumor size (T3+T4 staging) and 77.8% ($n=7$) of patients with PTC of the 4R@ genotype were categorized into the T1+T2 staging ($p=0.018$). When analyzing the IL-1 β dosage, it was possible to verify statistical differences in the IL-1 β dosage of the case group before and after treatment when analyzing the CC ($p<0.001$) and TT ($p<0.001$) genotypes, when compared to the control group.

Keywords: *BAX (-248 G>A), BCL-2 (128 G>A), MAOA uVNTR, IL1B (+3954 C/T), IL5 (-703 C/T), IL12B (+1188 A/C).*

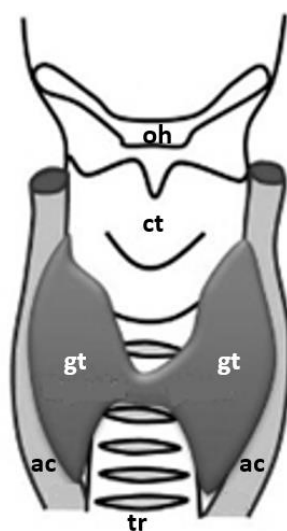
1. INTRODUÇÃO

1.1 TIROIDE E FISILOGIA HORMONAL

A glândula tireoide e seus hormônios possuem importante função na homeostase e no desenvolvimento de mecanismos fisiológicos básicos, como crescimento corporal e gasto de energia no ser humano.¹

A tireoide, órgão do sistema endócrino, é formada a partir de uma angulação da linha média no assoalho da faringe (Figura 1), sendo formada por folículos tireoidianos. As células diferenciadas dentro desses folículos, conhecidas como tirócitos ou células foliculares, são estritamente epiteliais possuindo uma superfície apical que delimita o lúmen do folículo (colóide) e uma superfície basal (ou basolateral) voltada para o espaço extrafolicular, essas células que produzem os hormônios tireoidianos triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) (Figura 2).²

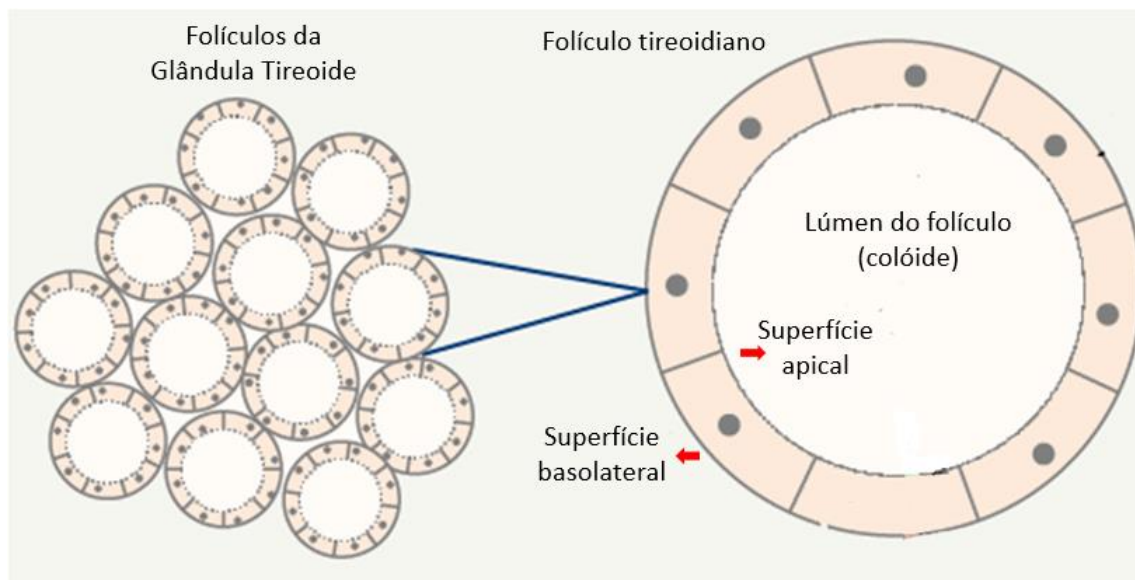
Figura 1 - Glândula tireoide.



Legenda: oh = osso hioide, ct= cartilagem tireoide, gt = glândula tireoide, ac = artéria carótida, tr = traqueia

Fonte: Nilsson e colaboradores (2017)², adaptado.

Figura 2 – Folículos tireoidianos e uma célula folicular demonstrando a superfície apical que delimita o lúmen do folículo (colóide) e a superfície basal (ou basolateral) voltada para o espaço extrafolicular.



Fonte: Samimi e colaboradores (2021)³, adaptado.

Os folículos tireoidianos também possuem uma segunda população de células conhecidas como parafoliculares ou células C, as quais sintetizam o hormônio calcitonina que em momentos de elevação do nível de cálcio no sangue promove a deposição de cálcio nos ossos, sua eliminação na urina e absorção de cálcio pelo intestino. A glândula tireoide também possui uma rica rede de capilares ao redor de cada folículo, o que permite a liberação sistêmica dos hormônios.⁴

Os hormônios T3 e T4 podem induzir atividade biológica em tecidos responsivos ligando-se aos receptores do hormônio tireoidiano. No entanto, o T3 é considerado o hormônio biologicamente ativo.⁵

As funções desses hormônios incluem o metabolismo de gorduras, proteínas e carboidratos, bem como a regulação da frequência cardíaca e a estimulação da respiração celular. No entanto, a velocidade e a força de tais hormônios diferem, sendo o T3 aproximadamente quatro vezes mais ativo que o T4. Em humanos, o T4 secretado na corrente sanguínea tem vida útil mais longa ($t_{1/2} = \sim 7$ dias), e o T3, embora menos secretado, é o mais comumente utilizado (maior efeito biológico) e possui vida útil mais curta ($t_{1/2} \leq 12$ horas).⁶

A produção de hormônios T3 e T4 é estimulada pela interação do hormônio tireoestimulante (TSH) com o receptor de TSH (RTSH), e as etapas centrais envolvem

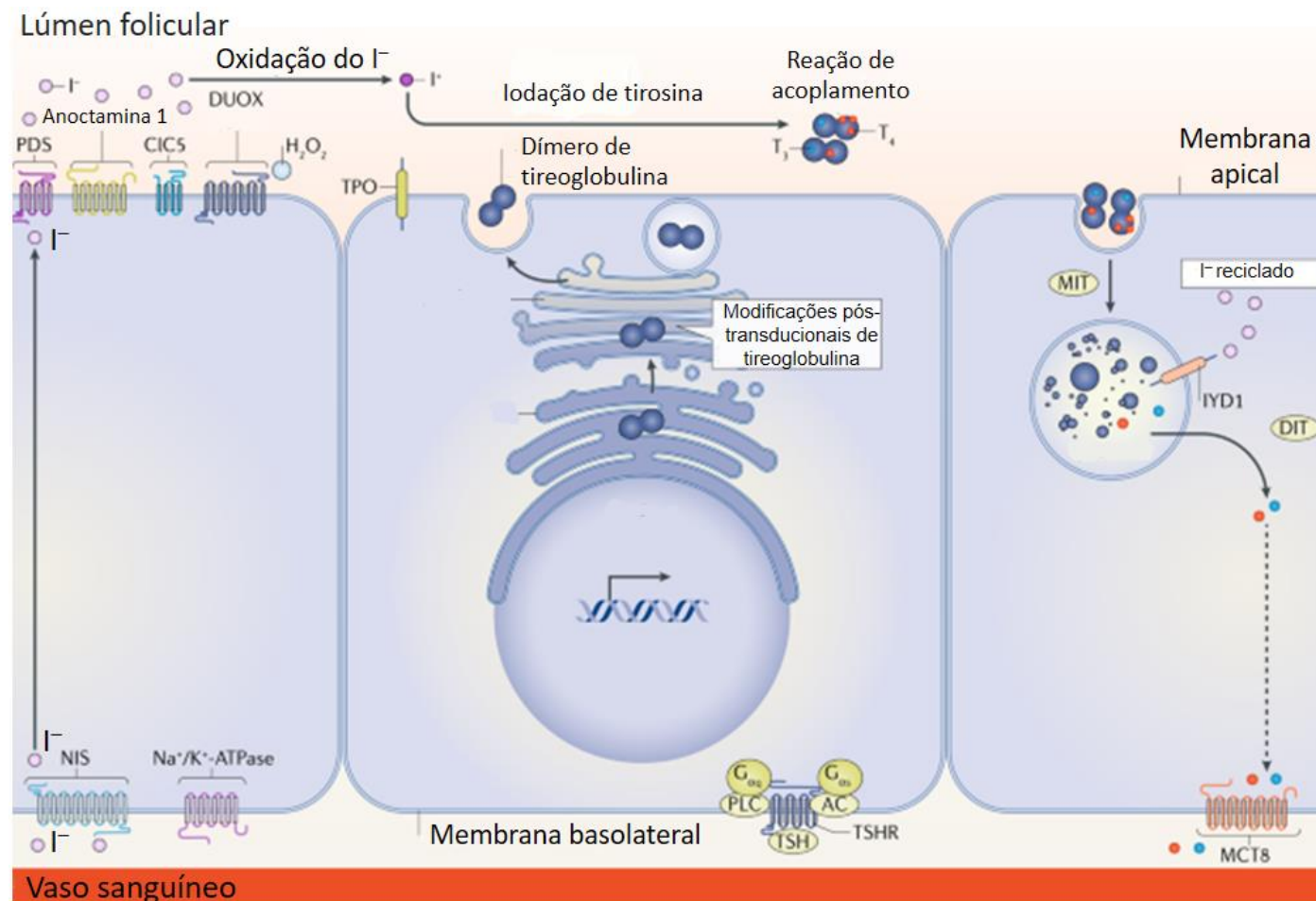
a coordenação de iodeto (I^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxidase tireoidiana (TPO) e tireoglobulina (proteína predominante expressa pelas células foliculares e principal fonte original dos hormônios tireoidianos).⁷

O processo se inicia quando o iodeto é inicialmente absorvido no trato gastrointestinal e entra na circulação sistêmica, ao atingir a glândula tireoide o I^- atravessa a membrana plasmática basolateral das células parafoliculares por meio da atividade do simportador de iodeto de sódio (NIS) e eflui através da membrana apical para o lúmen folicular, mediado pelas atividades da pendrina (PDS), anoctamina 1 e do canal de cloreto CIC-5.⁷

O H_2O_2 é fornecido pela oxidase de dupla função do sistema (DUOX), permitindo que TPO catalise a oxidação de iodeto. O iodeto reativo reage com resíduos de tirosina na tireoglobulina (iodação de tirosina) para gerar di-iodotirosina (DIT) e mono-iodotirosina (MIT). No momento da iodação, os resíduos seletivos de DIT e MIT da tireoglobulina podem sofrer a reação de acoplamento para iniciar a formação de T3 e T4. O acoplamento hormonogênico sempre envolve dois resíduos de iodotirosina: o T3, formado pelo acoplamento de uma molécula DIT e uma molécula MIT, e o T4, formado pelo acoplamento de duas moléculas DIT.⁷

A tireoglobulina folicular é reinternalizada nas células foliculares por endocitose, que promove a proteólise da tireoglobulina e a liberação dos hormônios T3 e T4, levando à sua secreção na corrente sanguínea por meio de transportadores como o Transportadores de Monocarboxilatos da família 8 (MCT8) na membrana plasmática basolateral, e o iodeto produto do desacoplamento é reciclado pela Iodotirosina desalogenase 1 (IYD1) (Figura 3).⁷

Figura 3 - A produção de hormônios T3 e T4 por célula folicular tireoidiana.



Legenda: NIS = simportador de iodeto de sódio; PDS = pendrina; DUOX = oxidase de dupla função do sistema; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio; TPO = peroxidase tireoidiana; T3 = triiodotironina; T4 = tiroxina.

Fonte: Citterio e colaboradores (2019)⁷, adaptado.

A função da glândula tireoide é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireoide a partir do mecanismo clássico de retroalimentação endócrina (*feedback negativo*). O hormônio liberador de tireotrofina (TRH) é secretado pelo hipotálamo e estimula a adeno-hipófise a produzir o TSH, que, por sua vez, estimula glândula tireoide a liberar os hormônios tireoidianos, os níveis de tais hormônios regulam a produção e liberação de TRH e TSH.⁸

1.2 CÂNCER DE TIREOIDE

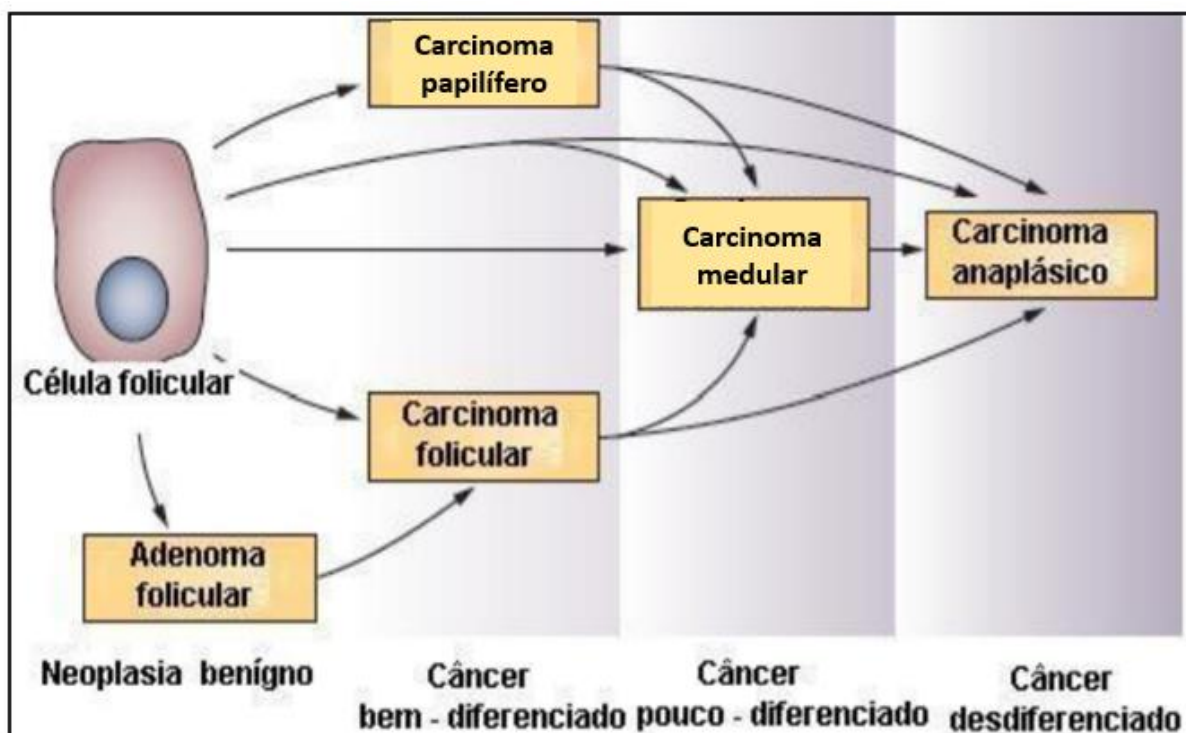
Os nódulos tireoidianos são cada vez mais diagnosticados na prática clínica, embora mais de 90% sejam lesões benignas pequenas, não palpáveis, que não evoluem para tumores clinicamente significativos, alguns pacientes apresentam lesões malignas, sendo essas não palpáveis ou palpáveis.⁹

O câncer da tireoide é responsável por aproximadamente 1 por cento de todos os carcinomas, mas é o tumor endócrino mais comum no mundo e a sua incidência tem aumentado desde a década de 1990.¹⁰

De acordo com as projeções para os Estados Unidos da América (EUA) até 2030, casos de carcinoma de tireoide ocuparão a quarta posição dentre as neoplasias mais comuns, tendência que também pode ser verificada em outros países. Prevê-se que os principais diagnósticos de câncer em 2030 sejam próstata, pulmão e melanoma para homens e mama, tireoide e útero para mulheres.¹¹

A maioria dos tumores da tireoide surge das células epiteliais foliculares da tireoide, enquanto 3-5% dos tumores surgem das células parafoliculares. A malignidade da tireoide é dividida em três grupos principais: câncer bem diferenciado (carcinoma papilífero e carcinoma folicular), câncer pouco diferenciado (carcinoma medular) e câncer desdiferenciado (carcinoma anaplásico) (Figura 4).¹²

Figura 4 - Neoplasia maligna de tireoide dividida em três grupos principais: câncer bem-diferenciado, câncer pouco-diferenciado e câncer desdiferenciado.



Fonte: Valgôde e colaboradores (2015)¹³, adaptado.

O câncer papilífero da tireoide (CPT) é o subtipo mais comum e tem o melhor prognóstico geral. As metástases ocorrem mais frequentemente nos gânglios linfáticos cervicais e menos frequentemente nos pulmões. O câncer folicular de tireoide e o câncer de tireoide pouco diferenciado são cânceres de alto risco que tendem a originar metástases em locais distantes, especialmente pulmões e ossos.¹⁴

A etiologia do câncer de tireoide ainda não está bem descrita, contudo, a literatura afirma que fatores de risco como: a radiação ionizante, especialmente com exposição na infância, obesidade, tabagismo e exposições hormonais podem ser associados à ocorrência do câncer de tireoide. Estudos de sequenciamento do DNA de indivíduos diagnosticados com câncer de tireoide revelaram a possibilidade de associação de alterações gênicas com a ocorrência de tal câncer. Tais fatos demonstram que o câncer de tireoide possui etiologia multifatorial.¹⁵

O excesso de tecido adiposo também tem sido implicado na etiologia de diversos tipos de câncer. Guignard e colaboradores (2007)¹⁶ em um estudo caso controle na Nova Caledônia, território francês de ilhas no sul do Oceano Pacífico, verificaram o peso e Índice de Massa Corporal (IMC) abrangendo a seguinte

classificação: déficit de peso (IMC abaixo de 18,5 kg/m²); peso normal (IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m²); sobrepeso (IMC entre 25 e 29,9 kg/m²) e obesidade (IMC maior ou igual a 30 kg/m²)¹⁷, e afirmaram que tais dados podem estar relacionados à maior taxa de detecção de nódulos tireoidianos em mulheres com sobrepeso do que em mulheres com peso normal.

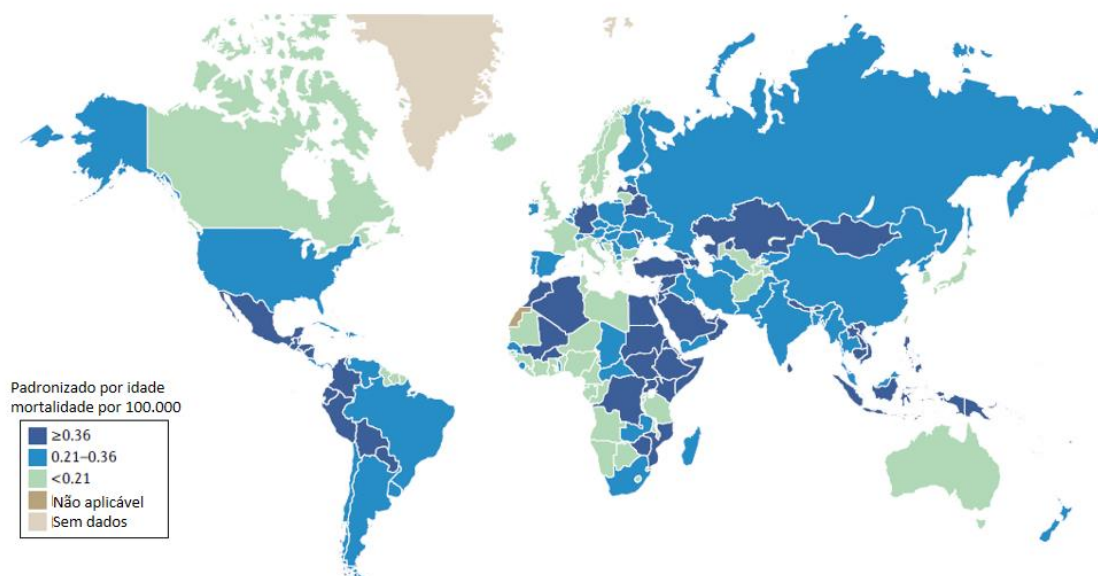
Clavel-Chapelon e colaboradores (2010)¹⁸ utilizando dados de um estudo de coorte francês E3N - *Etude Epidémiologique de Femmes de la Mutuelle Générale de l'Education Nationale (MGEN)*, investigaram a associação entre fatores antropométricos em diferentes períodos da vida e o risco diferenciado de câncer de tireoide, indicando que há relação contínua de aumento do risco da ocorrência do Câncer de Tireoide com o aumento do peso ou do IMC a partir dos 35 anos.

Analisando o câncer pouco-diferenciado da tireoide, o carcinoma medular é incomum, representando 1 a 2% de todos os cânceres da tireoide e ocorre mais comumente como um nódulo da tireoide em pacientes entre 40 e 60 anos, contudo, nota-se que quanto ao câncer desdiferenciado, o carcinoma anaplásico da tireoide é altamente agressivo e composto por células foliculares indiferenciadas, apesar de raro (1,7% de todos os tumores da tireoide) apresenta alta mortalidade.¹⁹

Nos Estados Unidos da América (EUA), a incidência de câncer de tireoide, particularmente o CPT aumentou rapidamente, começando no início da década de 1980. Reconhecendo a necessidade urgente de reverter essas tendências, entre 2009 e 2017, o *American College of Radiology (ACR)* e o *American Thyroid Association (ATA)* e a Força-Tarefa de Serviços Preventivos dos EUA emitiram pela primeira vez, as diretrizes da ATA de 2015 onde discutiram o uso de testes moleculares para nódulos com citologia indeterminada para contornar a cirurgia diagnóstica.²⁰

A mortalidade relacionada ao câncer de tireoide é variável, ao se analisar a incidência de tal câncer nota-se, em sua maioria, um declínio da taxa de mortalidade em países com alta renda, enquanto países que apresentam renda menor possuem taxas de mortalidade mais altas relacionadas ao câncer de tireoide (Figura 5).²¹

Figura 5 - Estimativa global padronizada por idade para mortalidade de câncer de tireoide, 2018.

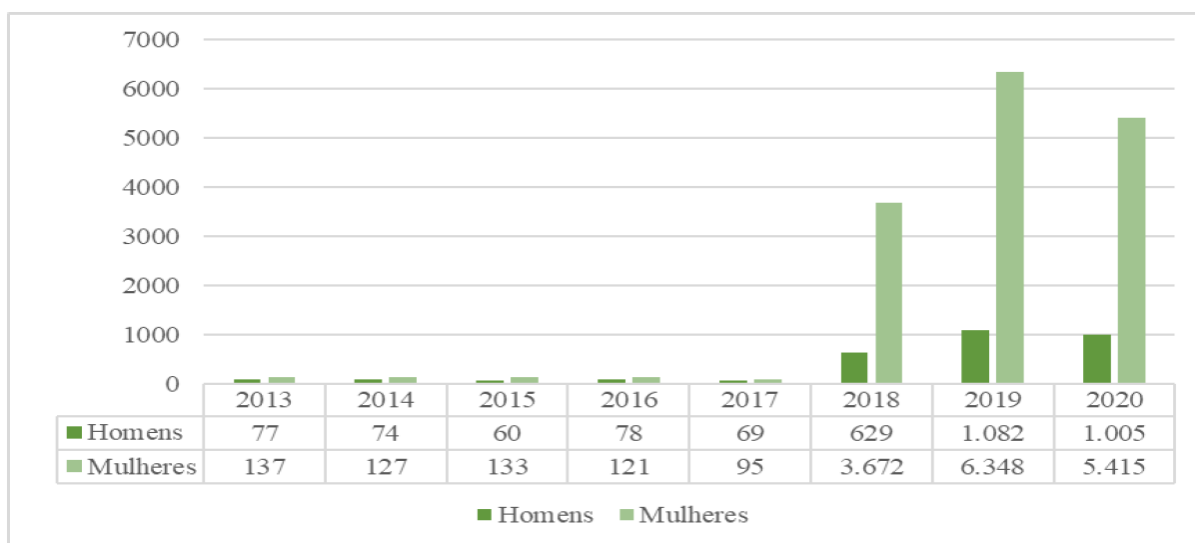


Fonte: Kim e colaboradores (2020), adaptado.

O conhecimento de informações como incidência, morbidade e mortalidade dos pacientes sobre o perfil dos diferentes tipos de câncer e a caracterização de possíveis mudanças no cenário ao longo do tempo são elementos-chave dos esforços de controle do câncer no Brasil. Esses indicadores são baseados em números provenientes principalmente de registros de câncer e do Sistema de Informação de Mortalidade do Ministério da Saúde (SIM/MS).²²

Rezende (2023)²³ em estudo epidemiológico descritivo para estimar a incidência e prevalência do câncer de tireoide; CID 10 – C73 (malignidade de tireoide), de 2013 a 2020, com dados coletados pelo Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), evidenciou um total de 19.122 casos, sendo 3.074 em homens (16,08%), 16.048 em mulheres (83,92%), notando-se que os casos de câncer de tireoide em homens e mulheres aumentaram significativamente entre 2018 e 2021 em comparação com anos anteriores, no entanto, se forem analisadas apenas as mulheres, observa-se um aumento de 39 vezes entre 2017 e 2018 (Figura 6).

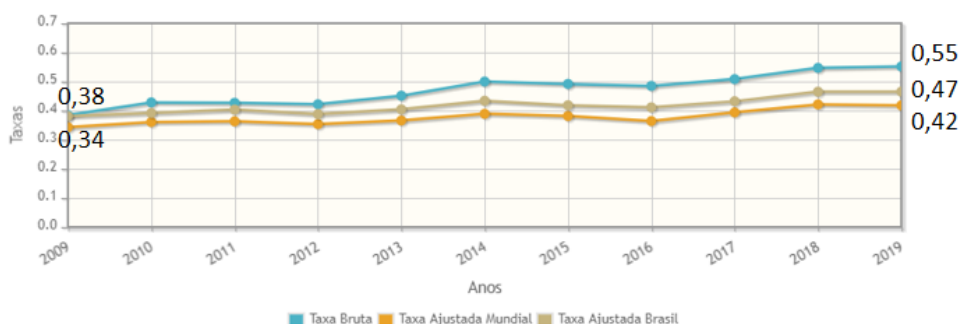
Figura 6 - Notificações de câncer de tireoide em homens e mulheres no período de 2013 a 2020.



Fonte: Rezende (2023).

Segundo a Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Ministério da Saúde (MS) e o INCA, ao se avaliar a taxa de mortalidade brasileira por câncer de tireoide entre 2009 e 2019 e compará-la com a população mundial no mesmo período, constata-se que a taxa de mortalidade ajustada por idade brasileira está acima da taxa de mortalidade ajustada mundial (Figura 7).²²

Figura 7 - Taxas de mortalidade por câncer de tireoide, brutas e ajustadas por idade, pelas populações mundial e brasileira de 2010, por 100.000 mulheres, Brasil, entre 2009 e 2019²².



Fonte: SIM, Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), MS, INCA - Divisão de Vigilância²².

O câncer de tireoide foi a quinto câncer mais comum entre as mulheres brasileiras em 2020, com 11.950 novos casos, excluindo o câncer de pele não melanoma, que segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) foi responsável por 5,4% de todos os cânceres (Tabela 1).²²

Tabela 1 - Prevalências de novos casos de neoplasia em mulheres, 2020.

Localização Primária	Casos Novos	%
Mama feminina	66.280	29,7
Cólon e Reto	20.470	9,2
Colo do útero	16.710	7,5
Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6
Glândula Tireoide	11.950	5,4
Estômago	7.870	3,5
Ovário	6.650	3,0
Corpo do útero	6.540	2,9
Linfoma não-Hodgkin	5.450	2,4
Sistema Nervoso Central	5.230	2,3
Todas as Neoplasias, exceto pele não melanoma	223.110	100,0
Todas as Neoplasias	316.280	

Fonte: MS / INCA, 2019²².

Segundo o INCA, estima-se que ocorrerão 16.660 novos casos de câncer de tireoide no Brasil entre 2023 e 2025, o que representa 2.500 homens e 14.160 mulheres em uma população de 100 mil habitantes, correspondendo a um risco estimado de 7,68 por 100 mil habitantes. Estes valores correspondem a um risco estimado de 2,33 novas infecções por 100 mil homens e 12,79 por 100 mil mulheres. (Tabela 2).²⁴

Tabela 2 - Estimativas, para o ano de 2023, das taxas brutas e ajustadas a de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária, Brasil.

LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA NEOPLASIA MALIGNA	ESTIMATIVA DOS CASOS NOVOS								
	Homens			Mulheres			Total		
	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada
Mama feminina	-	-	-	73.610	66,54	41,89	73.610	66,54	41,89
Próstata	71.730	67,86	55,49	-	-	-	71.730	67,86	55,49
Cólon e reto	21.970	20,78	12,43	23.660	21,41	11,06	45.630	21,10	11,43
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	17,06	12,73	14.540	13,15	9,26	32.560	15,06	10,52
Estômago	13.340	12,63	9,51	8.140	7,36	4,92	21.480	9,94	7,08
Colo do útero	-	-	-	17.010	15,38	13,25	17.010	15,38	13,25
Glândula tireoide	2.500	2,33	1,84	14.160	12,79	6,68	16.660	7,68	4,83
Cavidade oral	10.900	10,30	7,64	4.200	3,83	2,61	15.100	6,99	4,95
Linfoma não Hodgkin	6.420	6,08	4,55	5.620	5,08	3,00	12.040	5,57	3,79
Leucemias	6.250	5,90	4,75	5.290	4,78	3,95	11.540	5,33	4,43
Sistema nervoso central	6.110	5,80	4,56	5.380	4,85	3,80	11.490	5,31	4,33
Bexiga	7.870	7,45	3,96	3.500	3,14	1,58	11.370	5,25	2,75
Esôfago	8.200	7,76	5,46	2.790	2,49	1,43	10.990	5,07	3,38
Pâncreas	5.290	5,00	3,74	5.690	5,15	3,22	10.980	5,07	3,31
Fígado	6.390	6,06	5,18	4.310	3,89	3,14	10.700	4,95	4,29
Pele melanoma	4.640	4,37	2,24	4.340	3,90	1,56	8.980	4,13	1,88
Corpo do útero	-	-	-	7.840	7,08	4,13	7.840	7,08	4,13
Laringe	6.570	6,21	5,07	1.220	1,09	0,72	7.790	3,59	2,68
Ovário	-	-	-	7.310	6,62	5,01	7.310	6,62	5,01
Linfoma de Hodgkin	1.500	1,40	0,84	1.580	1,41	0,78	3.080	1,41	0,75
Outras localizações	41.730	39,49	26,17	33.970	30,69	19,70	75.700	34,99	21,96
Todas as neoplasias, exceto pele não melanoma	239.430	226,56	185,61	244.160	220,75	154,08	483.590	223,59	169,63
Pele não melanoma	101.920	96,44	-	118.570	107,21	-	220.490	101,95	-
Todas as neoplasias	341.350	323,00	-	362.730	327,96	-	704.080	325,53	-

Fonte: INCA (2022).

Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, o câncer de tireoide é o sétimo tipo de câncer mais comum. Entre os homens, ocupa a 14ª posição nas regiões Nordeste (2,68 por 100 mil) e Norte (0,96 por 100 mil), ocupando o 15º lugar nas regiões Centro-Oeste (2,68 por 100 mil), Sudeste (2,55 por 100 mil) e Sul (1,93 por 100 mil). Analisando o câncer de tireoide em mulheres, no Sudeste (16 por 100 mil) e Nordeste (13,54) é o terceiro câncer mais comum em mulheres, contudo, na região Centro-Oeste (11,91 por 100 mil) está na 5ª posição. Nas regiões Norte, é a nona doença mais comum (3,28 por 100 mil) e ocupa o 13º lugar na região Sul (6,63 por 100 mil habitantes).²⁴

A incidência de câncer de tireoide no triênio 2023-2025 no distrito federal é estimada em 160 novos casos, dos quais 40 são homens, com um risco estimado de

2,95 por 100.000 habitantes e 120 mulheres, equivalente a um risco estimado de 7,24 por 100 mil habitantes (Tabela 3).²⁴

Tabela 3 - Estimativas para o ano de 2023 das taxas brutas e ajustadas a de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária, Distrito Federal.

LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA NEOPLASIA MALIGNA	ESTIMATIVA DOS CASOS NOVOS								
	Homens			Mulheres			Total		
	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada
Mama feminina	-	-	-	1.030	62,70	49,76	1.030	62,70	49,76
Próstata	460	30,07	28,21	-	-	-	460	30,07	28,21
Cólon e reto	330	21,47	23,43	380	23,15	18,59	710	22,34	22,50
Traqueia, brônquio e pulmão	250	16,50	15,73	220	13,20	11,53	470	14,79	13,19
Estômago	180	12,13	9,12	120	7,34	3,72	300	9,64	5,93
Colo do útero	-	-	-	240	14,47	11,05	240	14,47	11,05
Glândula tireoide	40	2,95	3,04	120	7,24	5,48	160	5,17	3,46
Cavidade oral	120	7,92	8,29	50	3,29	2,79	170	5,52	3,15
Linfoma não Hodgkin	110	7,22	7,65	90	5,48	4,60	200	6,32	5,93
Leucemias	120	8,17	8,66	50	2,92	2,68	170	5,44	6,75
Sistema nervoso central	110	7,46	7,62	90	5,41	4,60	200	6,40	5,43
Bexiga	110	7,42	6,71	50	2,83	2,29	160	5,04	3,20
Esôfago	90	5,69	6,07	30	1,62	1,36	120	3,57	3,43
Pâncreas	80	5,28	6,04	90	5,54	4,53	170	5,41	5,20
Fígado	90	6,24	6,44	60	3,88	3,32	150	5,01	4,65
Pele melanoma	80	5,25	4,91	50	3,20	2,71	130	4,19	3,26
Corpo do útero	-	-	-	140	8,76	6,63	140	8,76	6,63
Laringe	70	4,71	4,97	**	0,57	0,51	80	2,56	2,44
Ovário	-	-	-	130	8,00	6,65	130	8,00	6,65
Linfoma de Hodgkin	40	2,56	2,56	30	1,57	1,36	70	2,05	1,83
Outras localizações	520	34,10	35,87	460	27,73	23,74	980	30,80	28,79
Todas as neoplasias, exceto pele não melanoma	2.800	183,84	209,72	3.440	209,19	193,19	6.240	197,00	201,70
Pele não melanoma	630	41,27	-	460	27,82	-	1.090	34,29	-
Todas as neoplasias	3.430	225,21	-	3.900	237,16	-	7.330	231,41	-

Fonte: INCA (2022).

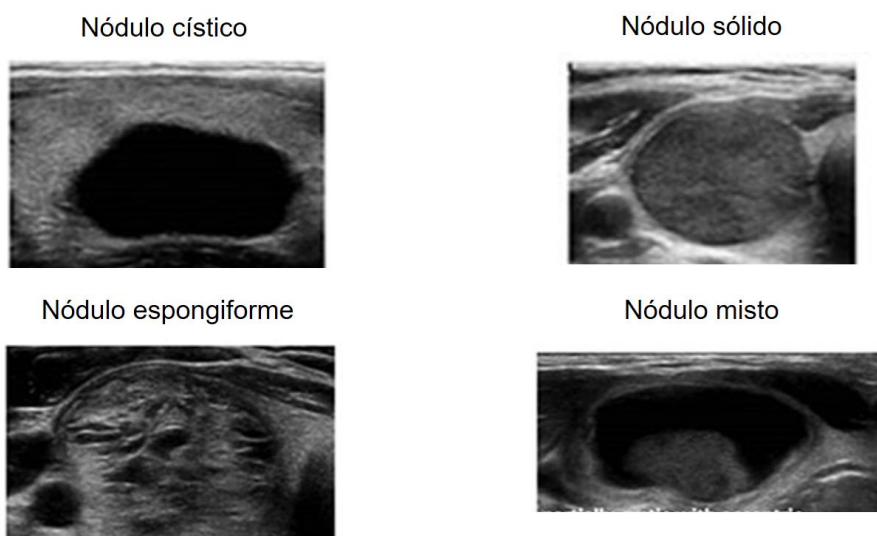
Reafirmando seu objetivo de fortalecer a vigilância do câncer, o INCA apresenta projeções para 2023-2025 e fornece ferramentas para administradores, profissionais de saúde, setores aliados e sociedade em geral, afim de melhorar a gestão de recursos e combater, de forma eficaz, o câncer no Brasil.²⁴

1.3 DIAGNÓSTICO

O câncer de tireoide geralmente é detectado pela palpação ou com nódulos encontrados na ultrassonografia (US) ou ultrassonografia cervical. A US é uma técnica comum e o exame de escolha para detectar e caracterizar pacientes com nódulos tireoidianos. A sensibilidade da técnica é superior a outras técnicas utilizadas no diagnóstico por imagem, tendo menor custo, fácil implementação, ausência de preparação para o exame e sem risco pessoal.²⁵

A partir do US é possível avaliar o nódulo tireoidiano com base na composição do tecido, podendo ser um nódulo cístico, cujo centro está total ou quase totalmente preenchido com líquido; espongiforme, que contém um espaço cístico que ocupa pelo menos metade do volume total; sólidos, cujo componente básico é o tecido mole e misto, que combina características de nódulos sólidos e císticos (Figura 8). A ecogenicidade do US é definida em relação ao tecido circundante, podendo o nódulo ser considerado: hiperecótico (aumentado em relação ao parênquima tireoidiano), isoecótico (igual ao parênquima), hipoecótico (diminuído em relação ao parênquima) e marcadamente hipoecótico (diminuído em relação aos músculos anteriores do pescoço), típico de tumores malignos. Ao se analisar o formato considera-se o eixo do nódulo e classifica-o 'mais alto que largo' se o diâmetro anteroposterior for maior que a dimensão lateral, sendo uma propriedade associada a tumores malignos.²⁶

Figura 8 – Nódulos avaliados por US.



Fonte: Granzotto et al, 2020²⁷.

Atualmente o sistema Bethesda é utilizado para uniformizar o diagnóstico do câncer da tireoide, antes do sistema Bethesda, as instituições e, às vezes, os patologistas individuais usavam sua própria nomenclatura para relatar os resultados da PAAF da tireoide. A falta de uma abordagem padronizada atrapalhou a comparação dos resultados e a tomada de decisões na clínica, uma vez que não houve acordo com relação à terminologia, ao número de categorias e ao seu valor preditivo. Para trabalhar em direção à uniformidade e ao consenso, em outubro de 2007, o *National Cancer Institute* (NCI) organizou a “Conferência NCI sobre o estado da ciência da aspiração por agulha fina da tireoide”, uma reunião ao vivo de dois dias, em Bethesda, Maryland.²⁸

Nódulos tireoidianos e cervicais suspeitos devem ser submetidos a Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF), melhor método para distinguir lesões benignas e malignas, mesmo em nódulos menores que 1 cm ou maiores que 4 cm, seguida de avaliação citológica para se averiguar a malignidade celular, seguindo as recomendações do Sistema Bethesda. Um resumo das discussões e conclusões formou a base de um atlas de 2010, *The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology*²⁹, como um meio para o citopatologista comunicar claramente ao médico solicitante uma interpretação para selecionar essencialmente aqueles pacientes que devem ser submetidos a intervenção cirúrgica e aqueles que podem ser acompanhados clínica e ultrassonograficamente com segurança (Tabela 4).^{27,28,30}

Tabela 4 - Sistema Bethesda para laudos citopatológicos de tireoide.

Categoria diagnóstica		Risco de malignidade (%)
I	Amostra não diagnóstica ou insatisfatória	1-4
II	Benigno	0-3
III	Atipia de Significado Indeterminado ou Lesão	5-15
	Folicular de Significado Indeterminado	
IV	Neoplasia Folicular ou Suspeita de Neoplasia Folicular	15-30
V	Suspeito de Malignidade	60-75
VI	Maligno	97-99

Fonte: Hess e colaboradores (2023)²⁸.

Para se avaliar nódulos tireoidianos em hiperfunção pode-se utilizar a cintilografia com ^{131}I , afim de verificar se o nódulo está: hiperfuncionante, captação do radiofármaco é maior do que a tireoide normal (dificilmente apontando malignidade); isofuncionante (captação do ^{131}I é igual a tireoide circundante e não funcionante), contudo quando absorção do radiofármaco for menor do que o tecido tireoidiano circundante pode apontar para malignidade.⁹

A investigação inicial para qualquer nódulo tireoidiano recém-descoberto deve incluir a análise do nível sérico do hormônio TSH (valor de referência $<4,5 \mu\text{UI/mL}$). O TSH é liberado pela hipófise anterior e sinaliza à glândula tireoide para produzir o hormônio tireoidiano conforme apropriado. Quando os níveis dos hormônios tireoidianos estão baixos, o TSH aumenta responsivamente e vice-versa; assim, medir o nível de TSH permite a diferenciação entre nódulos funcionais e não funcionais. Esta é uma característica importante, já que nódulos hiperfuncionais raramente são malignos.³¹

A dosagem dos anticorpos antitireoperoxidase (anti-TPO) pode ser solicitada para confirmar a tireoidite autoimune. Diferente dos anticorpos anti-TPO, os auto-anticorpos para a tireoglobulina e antitireoglobulina (TgAb), não parecem ser patogênicos e podem simplesmente ser indicadores de doenças tireoidianas (valor de referência $<4,00 \text{ UI/mL}$). A dosagem de tireoglobulina (Tg) sérica é um teste de sensibilidade e especificidade relativamente baixas para diagnóstico de malignidade da tireoide, contudo os níveis deste marcador estão aumentados na presença do câncer de tireoide (valor de referência 1,1 a 130 ng/mL).³⁰

A necessidade de classificar os casos de câncer decorre do fato de as taxas de sobrevivência serem diferentes quando o câncer está in situ no órgão de origem e quando se espalhou para outros órgãos. O estadiamento do câncer é a avaliação da propagação com base em regras estabelecidas internacionalmente. O sistema de estadiamento recomendado pela União Internacional para Controle do Câncer (UICC) é a classificação de Tumor-nódulo linfático-metástase (TNM) de acordo com a extensão anatômica da doença e leva em consideração as características do tumor primário (T), características linfonodais das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), presença ou ausência de metástases à distância (M). Esses parâmetros são geralmente classificados de T0 a T4, N0 a N3 e M0 a M1. (Tabela 5).³²

Tabela 5 - Critérios de estadiamento TNM.

Categoria TNM		Critérios
Tumor Primário (T)	Tx	O tumor primário não pode ser avaliado.
	T0	Não há evidência de tumor primário.
	T1a	Tumor com diâmetro de 1 cm ou menos em sua maior dimensão e limitado à tireoide.
	T1b	Tumor com diâmetro de mais de 1 cm e com até 2 cm em sua maior dimensão e limitado à tireoide.
	T2	Tumor com diâmetro mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão e limitado à tireoide.
	T3a	Tumor com mais de 4 cm restrito à tireoide
	T3b	Tumor de qualquer tamanho com extensão extratireoidiana grosseria/moderada incluindo invasão de tecidos moles subcutâneos, laringe, traqueia, esôfago e/ou nervo laríngeo recorrente
	T4a	Tumor de qualquer tamanho que se estende além da cápsula tireoidiana e invade tecidos moles subcutâneos, laringe, traqueia, esôfago ou nervo laríngeo recorrente.
	T4b	Tumor com invasão de fáscia pré-vertebral ou vasos mediastinais ou envolve a artéria carótida.
	NOTA: As categorias T devem ser subdivididas em: (s) tumor solitário ou (m) tumor multifocal (o maior foco tumoral definirá a categoria T nos tumores multifocais).	
Linfonodos Regionais (N)	Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
	N0	Ausência de metástases em linfonodos regionais.
	N1a	Metástases linfáticas em nível VI (compartimento central).

		Metástases em outros linfonodos cervicais unilaterais, bilaterais ou contralaterais (níveis I, II, III, IV ou V) ou em linfonodo retrofaríngeo ou mediastinal superior.
	N1b	
Metástase	M0	Ausência de metástase(s) à distância.
a Distância	M1	Presença de metástase(s) à distância.
(M)		

Fonte: Ministério da Saúde (2014), Mendes (2023)^{33,34}.

1.4 TRATAMENTO

De acordo com o consenso da *American Thyroid Association* (ATA), da *European Thyroid Association* (ETA) e do Departamento de Tireoide da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, o tratamento para o carcinoma de tireoide deve iniciar retirada total da tireoide (tireoidectomia) ou parcial (lobectomia). A tireoidectomia é indicada quando a doença nodular é bilateral; associada à radiação; a citologia sugestiva de malignidade ou indeterminada e o nódulo apresentar mais que 4 cm ou tiver 4 cm ou menos, com alta suspeita clínica ou ultrassonográfica de câncer. A lobectomia é adequada para doença nodular unilateral e esporádica se o tamanho do nódulo for de 4 cm ou menos, a citologia não for clara e a suspeita clínica e ultrassonográfica de malignidade for baixa; ou a citologia insatisfatória.³⁰

A tireoidectomia é associada com a radioiodoterapia (RIT) por iodo-131 (¹³¹I), tal radiofármaco é administrado via oral (cápsulas ou líquido) com a formulação química de iodeto de sódio marcado com o radionuclídeo (¹³¹I-Nal), tal terapia é recomendada para sendo recomendada para ablação de células remanescentes da tireoide pós tireoidectomia, a fim de destruir focos microscópicos e tratar metástases, possuindo bons efeitos e baixo índice de complicações. A quantidade de radiofármaco administrada pode variar de 30mCi a 100 mCi de ¹³¹I, dependendo dos fatores de risco para resistência e sobrevida livre de doença. Após 2 horas da administração do radiofármaco é completa a sua biodisponibilidade por todo o corpo, sendo depositada grande dose de radiação no sangue e na medula óssea vermelha, fixando-se

principalmente nas células da tireoide remanescentes, aproximadamente 80 a 90% do ^{131}I é eliminado por via renal.^{35,36}

Devido ao mecanismo de absorção do iodo pelas células da tireoide, a baixa ingesta de iodo, ou mesmo suspensão da levotiroxina (LT4), hormônio comumente utilizado em pacientes pós tireoidectomia, por 7 a 14 dias melhora a absorção do ^{131}I , pois a ausência de hormônios tireoidianos estimula a hipófise a produzir TSH, que por fim estimula as células da tireoide a captarem o iodo proveniente do tratamento³⁰. A terapia com levotiroxina, que visa não apenas a reposição hormonal em pacientes com tireoidectomia, mas também a supressão dos níveis séricos de TSH, é conhecida por ter um efeito positivo no prognóstico do paciente e influenciar as taxas de recidiva e mortalidade. Níveis séricos elevados de TSH, mesmo dentro da faixa normal (aproximadamente 0,4 a 4,5 $\mu\text{UI/mL}$, dependendo da idade), estão associados a um risco aumentado de nódulos malignos da tireoide e cânceres mais agressivos.³⁷

Após a tireoidectomia total, a tireoglobulina plasmática cai para níveis que não podem ser mensurados por análises sorológicas, contudo, quando esta cirurgia é realizada para tratar câncer diferenciado, a detecção de tireoglobulina no plasma pós-operatório provavelmente indicará tumor residual ou recorrente, e o acompanhamento de tais pacientes e análise de tireoglobulina devem-se tornar rotina. Rodrigues e colaboradores (2002)³⁸ afirmam que como a produção de tireoglobulina pela tireoide é dependente do TSH hipofisário, a inibição de TSH pela administração de hormônios tireoidianos durante o pós-operatório reduz a produção de tireoglobulina pelas células remanescentes para níveis muito baixos. Portanto, um aumento da tireoglobulina a valores superiores a 10ng/mL indica a possibilidade de recorrência e mau prognóstico, valores acima de 70 ng/mL indicam provável metástase, capaz de produzir tireoglobulina independente do TSH.

1.5 POLIMORFISMO GENÉTICO

O surgimento de métodos de sequenciamento de alto rendimento baseados na presença de novas anormalidades moleculares permitiu o desenvolvimento de informações sobre o diagnóstico molecular do câncer de tireoide.³⁹ Marcadores moleculares do câncer de tireoide foram estudados em mais de 70% de carcinomas diferenciados, atuando em diferentes vias metabólicas, e a compreensão de seus diversos mecanismos moleculares contribuirá para novas perspectivas no diagnóstico e tratamento do câncer de tireoide.⁴⁰

Dentre os marcadores moleculares descritos estão as variantes genéticas que podem ser entendidas como a ocorrência de alterações moleculares em pelo menos um por cento da população, que são chamadas de polimorfismo, caso tais variações moleculares ocorram em apenas um nucleotídeo, os polimorfismos são chamados de *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) ou Polimorfismos de Nucleotídeo Único.⁴¹

Variable number of tandem repeats (VNTR) são definidos como repetições contínuas de uma sequência de DNA com o tamanho unitário maior ou igual a 7 pares de base (pb). Os VNTRs surgem como resultado da recombinação ou em eventos de replicação celular, atualmente são descritos mais de dez mil VNTRs polimórficos no genoma humano. A literatura afirma que a presença de determinados números de repetições *in tandem* pode ter impacto significativo nas propriedades dos genes, incluindo seu nível de expressão.⁴²

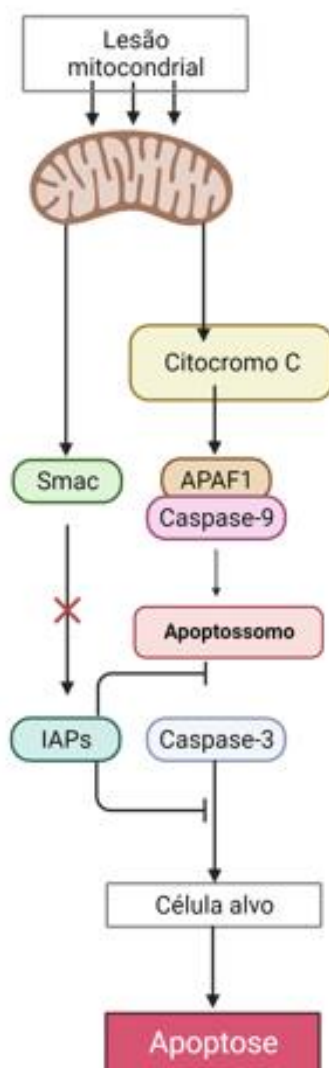
1.5.1 Anti-apoptotic B-cell lymphoma 2 (BCL2) e Pro-apoptotic B-cell lymphoma 2-associated X protein (BAX)

A apoptose pode ser compreendida como um processo de morte celular programada em condições fisiológicas e patológicas, a deficiência deste processo altera a homeostase celular e leva possivelmente à carcinogênese e progressão tumoral. A apoptose é regulada por diferentes vias envolvendo múltiplos genes que a promovem ou inibem.⁴³

A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca se inicia com a ligação de ligantes específicos a um painel de receptores do fator de necrose tumoral,

podendo este iniciar a ativação da cascata de caspases. A via intrínseca é ativada quando as mitocôndrias são lesionadas por agentes como radicais livres ou a presença de lesão do DNA, e durante a apoptose é possível formar um poro na membrana mitocondrial levando à liberação do citocromo C no citoplasma, a fim de formar um complexo com o fator de ativação de protease associada à apoptose 1 (APAF1) e com caspase-9 denominado apoptossomo além de ativar proteínas mitocondriais como o segundo ativador mitocondrial de caspases (SMAC) que inibe as proteínas da família inibidora das proteínas apoptóticas (IAP), tais ações promovem a ativação da caspase-3 causando apoptose (Figura 8).⁴⁴

Figura 9 - Via mitocondrial da apoptose.

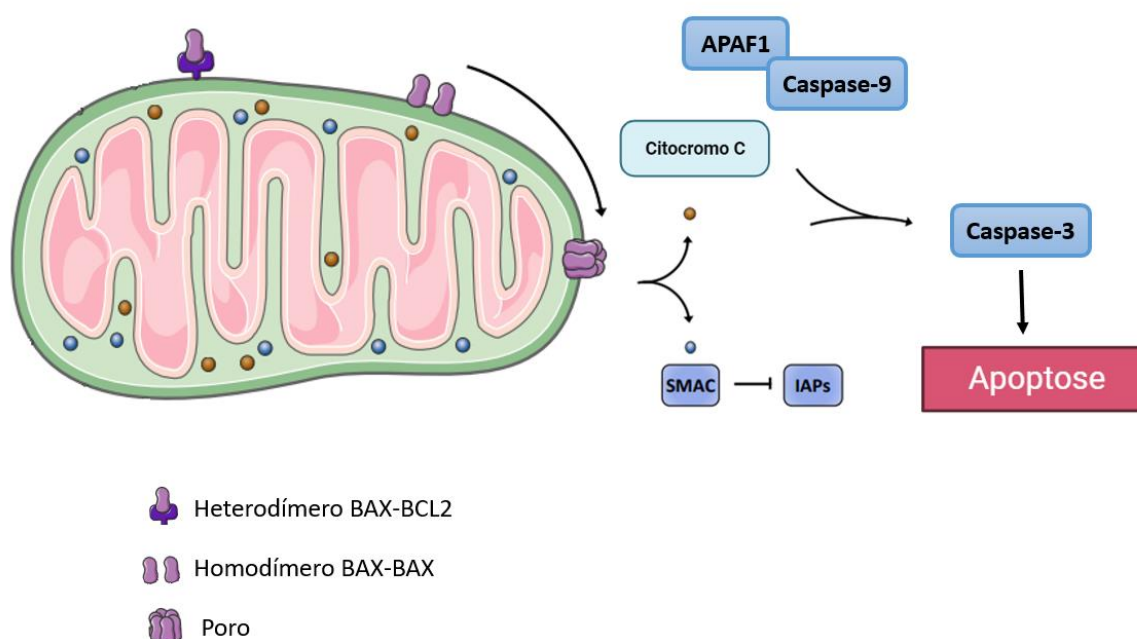


Fonte: própria autora, *Created with BioRender.com*.

O equilíbrio entre proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas determinam o destino da célula e regulam a resposta aos sinais apoptóticos, a presença de deficiências na apoptose alteram a homeostase celular podendo levar à carcinogênese e promover a progressão tumoral. A literatura chama atenção para dois reguladores descritos da apoptose: *Anti-apoptotic B-cell lymphoma 2* (BCL2) e a *Pro-apoptotic B-cell lymphoma 2-associated X protein* (BAX).⁴⁵

A proteína BAX é uma importante proteína pró-apoptose na família BCL2, sendo que as proteínas BAX existem principalmente no citoplasma. Quando as células recebem sinais de apoptose, as proteínas BAX são transferidas para a membrana mitocondrial e reconhecem as proteínas BCL2 na membrana, ligando-se a BCL2 para formar o heterodímero BAX-BCL2, inibindo assim o efeito anti-apoptose das proteínas BCL2. As proteínas BAX também podem formar o homodímero BAX-BAX, presente na membrana da mitocôndria, que aumenta a permeabilidade da membrana mitocondrial e liberando citocromo C, um fator apoptótico, no citoplasma para ativar a resposta à apoptose em cascata. Portanto, BAX possui um importante papel de regulação da via de sinalização da apoptose mitocondrial (Figura 9).⁴⁶

Figura 10 - Promoção da apoptose pelo Homodímero BAX-BAX na membrana mitocondrial.



Fonte: Barillé-Nion (2020)⁴⁷, adaptada.

A proteína BCL2 promove a sobrevivência celular ao inibir a apoptose, enquanto BAX estimula a morte celular programada, sendo assim, a expressão excessiva de BCL2 ou BAX gera uma desregulação na homeostase celular podendo desempenhar um papel importante no surgimento do câncer.⁴⁵

O gene *BAX* foi o primeiro gene pró-apoptótico a ser descrito como diretamente relacionado ao gene *P53*, que codifica uma proteína relacionada ao bloqueio do ciclo celular em caso de dano ao DNA, e está localizado no cromossomo 19q13.3 contendo 6 éxons.⁴⁸

O polimorfismo *BAX* -248 G/A (rs4645878) está localizado na região 5' não traduzida da sequência promotora deste gene, tal polimorfismo é caracterizado pela presença dos nucleotídeos Guanina (G) no alelo selvagem e Adenina (A) no alelo variante. A presença do alelo polimorfismo A já foi associado com a redução da expressão da proteína pró-apoptótica BAX, quando comparado ao alelo selvagem G.⁴⁹

A associação entre polimorfismos do gene *BAX* e o câncer não está apenas relacionada à ocorrência do câncer, como também ao prognóstico do paciente. Estudos demonstram que o polimorfismo *BAX*(-248)G/A pode estar associado a uma regulação negativa da atividade da transcrição do gene *BAX* gerando uma diminuição da expressão proteica, o que aumenta a razão BCL2 e BAX podendo inibir o processo apoptótico de células tumorais.⁵⁰

Estudos afirmam que além da diminuição da expressão proteica, polimorfismos do gene *BAX* estão relacionados a diminuição da ativação de *p53*, gerando falha da via apoptótica mitocondrial, progressão no desenvolvimento do tumor e mau prognóstico.⁵¹

Localizado no cromossomo humano 18q21.33, o polimorfismo *BCL2* 128 G/A (rs1800477), vêm sendo associado à ocorrência de câncer de próstata, ovário, mama, renal e de orofaringe. Tal polimorfismo envolve a inserção do códon ACC ao invés do códon GCC (GCC→ACC), gerando uma troca de aminoácido relevante na proteína, treonina por alanina na posição 43 da proteína (Ala43Thr).⁵²

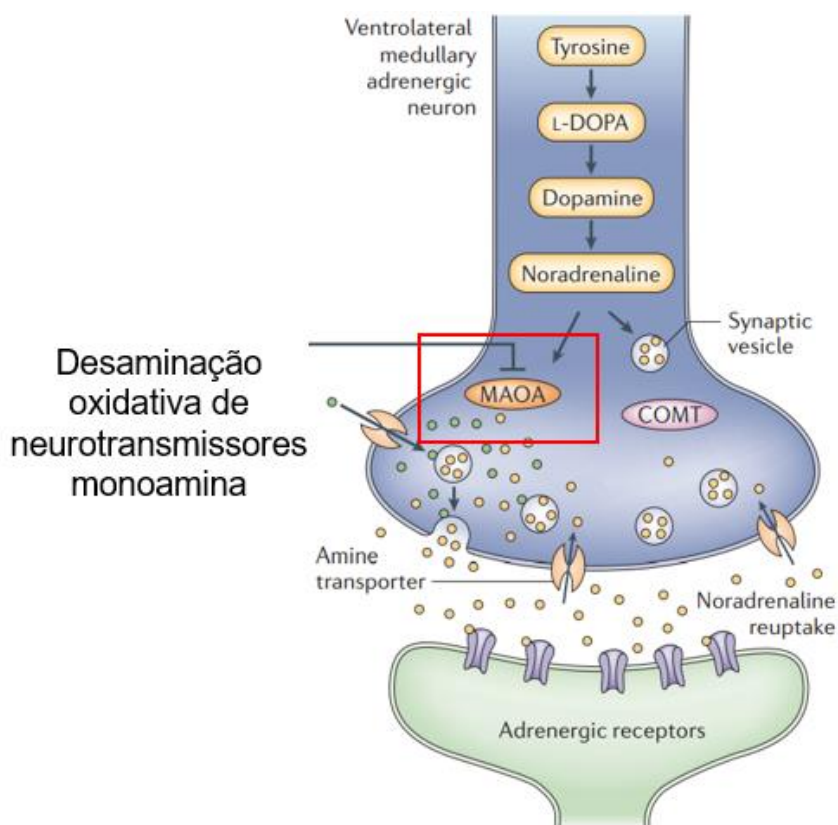
Um estudo *in vitro* sobre o polimorfismo *BCL2* 128 G/A mostrou que o genótipo Ala43Ala aumenta a sobrevivência celular, enquanto que a presença da variante treonina atua como um haplótipo suprimido fator antiapoptótico, demonstrando uma associação com o risco ao desenvolvimento de câncer.⁵³

1.5.2 Enzima Monoamina Oxidase (MAO)

A enzima MAO é localizada na membrana mitocondrial externa das células neuronais e gliais. Existe em duas isoformas, MAO-A e MAO-B, codificadas pelos genes *MAOA* e *MAOB*, respectivamente. Ambos os genes *MAO* contêm 15 éxons e 14 íntrons e estão localizados no braço curto do cromossomo X (Xp11.23).⁵⁴

Cabe destacar que a enzima MAO catalisa a desaminação oxidativa de neurotransmissores monoamina, aminas dietéticas, hormônios e drogas no cérebro e tecidos periféricos, regulando assim seus níveis e funções biológicas. A oxidação de Monoamina pela MAO produz os aldeídos e peróxido de hidrogênio correspondentes, subprodutos da reação que aumentam o estresse oxidativo e as respostas celulares associadas (Figura 10). O estresse oxidativo induzido pela MAO é potencialmente um fator de risco para perda neuronal no envelhecimento e distúrbios neurodegenerativos relacionados à idade, como a doença de Parkinson.⁵⁵

Figura 11 - Desaminação oxidativa de neurotransmissores monoamina (MAO).



Fonte: Youdim (2006)⁵⁶, adaptada.

Embora estudado principalmente no contexto de uma vasta variedade de desordens do espectro neural, MAO-A também podem contribuir para a ocorrência de câncer, devido aos produtos desaminados de atividade MAO-A promoverem a proliferação celular e inibir a apoptose.⁵⁷

Polimorfismos funcionais no gene *MAOA* fornecem uma possível ligação entre a deficiência de *MAOA* e comportamentos fisiológicos anormais, e tais variantes gênicas são consideradas mais significativas do que a atividade deficiente de *MAO-A*. Dentre os polimorfismos estudados do gene *MAOA* destaca-se o *MAOA upstream VNTR* (*uVNTR*), um polimorfismo VNTR de 30 pb localizado na região promotora do gene, 1,2 kb a partir do local de iniciação da transcrição.⁵⁵

A análise do polimorfismo da amplificação gênica revelou cinco tamanhos de fragmentos (alelos) compostos por 2 (2R), 3 (3R), 3,5 (3,5R), 4 (4R), 5 (5R) ou 6 (6R) cópias da sequência repetida.^{55,58} As variantes do polimorfismo *MAOA uVNTR* afetam sua transcrição^{59,60} e atividade enzimática⁵⁹. Os alelos 3.5R e 4R são descritos como alelos de alta atividade por sua atividade transcricional mais eficiente. Em contraste, o alelo 3R, quando combinado com os alelos 2R e 5R, são denotados como alelos de baixa atividade por sua menor eficiência transcricional^{59,61}. No entanto, ainda há debate sobre a influência de 2R e 5R na eficiência transcricional, pois alguns os consideram alelos de baixa atividade, enquanto outros, alta.⁵⁸ Essa lacuna de conhecimento provavelmente se deve à sua raridade.⁵⁸

1.5.3 Interleucina-1B

As citocinas são categorizadas em quimiocinas, interferons (IFNs), interleucinas (ILs), fatores de necrose tumoral (TNFs) e linfocinas. Normalmente, as citocinas são imunopoli-peptídeos ou imunoglicoproteínas que atuam como indutores de vias de sinalização. Essas proteínas não estruturais de baixo peso molecular (5-20 kDa) são secretadas por várias subpopulações de leucócitos, como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células *natural killer* (NK) e células T. Essas células imunes estão envolvidas na regulação, modulação e promoção de respostas imunes orquestrando a ativação, proliferação, desenvolvimento, diferenciação e crescimento mediados por citocinas. Portanto, as citocinas desempenham papéis fundamentais como proteínas moduladoras nas respostas imunes em cascata inflamatória e nos

sistemas de reparo, pois modulam os sistemas imunes inato e adaptativo. As citocinas são expressas por células imunes e não imunes, bem como células hematopoiéticas e cancerígenas.⁶²

A interleucina-1 (IL-1) é uma citocina pró-inflamatória com múltiplos efeitos biológicos. A família de genes *IL1* no cromossomo 2q13-14 codifica três proteínas: IL-1 α , IL-1 β e seu inibidor natural antagonista de receptor de interleucina 1 (IL-1Ra). A IL-1 α atua ligada à membrana de forma autócrina (na própria célula) sendo secretada por queratinócitos, sem induzir efeitos sistêmicos, enquanto que a IL-1 β , é produzida principalmente por monócitos sanguíneos e macrófagos teciduais, tem sido implicada na mediação da inflamação aguda e crônica.⁶³

Os principais efeitos biológicos da IL-1 são a liberação de componentes específicos (lisozima, collagenase, lactoferrina, fosfatase alcalina) dos grânulos de neutrófilos além da síntese de Interleucina-6, pelos monócitos, estimula a secreção de Interleucina-2 por linfócitos auxiliares, bem como a adesão de leucócitos, inibição da proliferação de células endoteliais, aumenta os efeitos de coagulação, além da proliferação e ativação de neutrófilos, linfócitos B, monócitos/macrófagos e auxilia a fagocitose.⁶⁴

O gene *IL1B* é considerado polimórfico e as trocas de base entre C e T nas posições -511, -31 e +3954 têm sido amplamente estudadas. Em particular, os dois primeiros polimorfismos estão localizados na região promotora e apresentam alto desequilíbrio de ligação. A substituição de T por C no polimorfismo *IL1B* -31T/C causa a interrupção da região promotora TATA-box e nota-se que afeta a afinidade de fatores de transcrição, afetando a atividade de transcrição de IL-1B. O polimorfismo *IL1B* +3954 C/T no éxon 5 é um SNP e estudos *in vitro* mostraram que tanto a presença do alelo T no polimorfismo *IL1B* -511T quanto no *IL1B* +3954T estão associados ao aumento da secreção de IL-1 β induzida por lipopolissacarídeos (LPS).⁶⁵

1.5.4 Interleucina-5

A Interleucina-5 (IL-5) é uma citocina derivada de células T envolvida na patogênese de doenças atópicas e desempenha papéis importantes na patogênese da asma, síndromes hipereosinofílicas e doenças inflamatórias dependentes de eosinófilos. Além disso, acredita-se que regula o crescimento, diferenciação e ativação de eosinófilos. Além disso, atua em eosinófilos maduros a fim de prolongar sua maturação e sobrevivência e influencia o aumento dos progenitores de eosinófilos circulantes, sugerindo um papel sistêmico fundamental para a IL-5 na mobilização de eosinófilos. É descrito que a superexpressão de IL-5 aumenta significativamente os níveis de anticorpos *in vivo* e age como um fator de diferenciação de células B ao estimular células B ativadas a secretar anticorpos.⁶⁶

O gene *IL-5* está localizado no cromossomo 5 dentro de um agrupamento de genes de citocinas IL-4 e IL-13. Além disso, os genes *IL5*, *IL4* e *IL13* podem ser regulados coordenadamente por elementos reguladores de longo alcance espalhados por 120 kilobases no cromossomo 5q31.1. O gene *IL5* codifica uma citocina que atua como um fator de diferenciação e crescimento para células B e eosinófilos. Takatsu (2011)⁶⁷ sugere que camundongos sem um gene funcional para IL-5 ou para a cadeia alfa do receptor de IL-5 (IL-5R α) exibem uma série de deficiências funcionais e de desenvolvimento nas linhagens de células B e eosinófilos, demonstrando que polimorfismos nos genes da IL-5 podem contribuir para a suscetibilidade à doenças com alterações eosinofílicas e determinar o curso clínico da doença.⁶⁸

As doenças autoimunes da tireoide resultam de uma disfunção do sistema imunológico levando à perda da autotolerância aos antígenos tireoidianos, tireoglobulina (Tg), tireoide peroxidase (TPO) e receptor do hormônio estimulante da tireoide (TSHR), seguida de infiltração linfocítica da glândula. Os linfócitos TCD4+, principais células infiltrantes nas doenças autoimunes da tireoide, podem ser subdivididos em células T *Helper* (Th): Th1, Th2, Th17 e Th22, além de células T regulatórias e T foliculares auxiliares, de acordo com os perfis das citocinas sintetizadas.⁶⁹

As células Th2 produzem interleucinas específicas, como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, que podem inibir a diferenciação e a ativação das células Th17 e Th1. Além disso, essas citocinas estimulam a produção de anticorpos antitireoidianos e levam ao

desenvolvimento de inflamação na glândula tireoide. A IL-5 é um significativo mediador da resposta Th2, e os níveis de IL-5 são descritos de forma elevada no sangue periférico de indivíduos com tireoidite de Hashimoto e doença de Graves, bem como, tal interleucina desempenha um papel em diversas doenças, regulando a variedade celular como células NK, mastócitos, linfócitos B e eosinófilos.⁶⁹

A IL-5 também desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Zhang e colaboradores (2023)⁷⁰ demonstraram que a IL-5 pode promover a secreção do anticorpo IgM e impedir que os macrófagos absorvam a lipoproteína de baixa densidade oxidada (ox-LDL), e com isso investigou a relação genética entre IL-5 e Doença Arterial Coronariana (DAC) em uma população chinesa. Os resultados mostraram que os SNPs em *IL5* podem desempenhar um papel na doença arterial coronariana, afetando os fatores de risco tradicionais para doença indicando que o SNP -745 C/T estava envolvido na DAC ao influenciar a hipertensão.

Mahajan e colaboradores (2008)⁷¹ afirmam que a IL-5 é um determinante importante da resposta Th2 e os níveis séricos de IL-5 foram encontrados aumentados em indivíduos infectados por *Helicobacter pylori* com gastrite crônica, um precursor do câncer gástrico. Em seu estudo com a população polonesa encontraram que o polimorfismo *IL5* -745 C/T foi significativamente associado ao risco de câncer gástrico. Embora a função biológica de tal polimorfismo não seja clara e que ainda não foi descrito sobre sua associação ao risco de câncer, polimorfismos da IL-5 têm sido associados a doenças relacionadas à resposta imune, como asma brônquica atópica e eosinofilia sanguínea.

1.5.5 Interleucina-12

A interleucina-12 (IL-12) é uma citocina pró-inflamatória potente que possui papel central na imunidade celular, produzida principalmente por células fagocíticas, como células dendríticas, monócitos, macrófagos, neutrófilos e micróglia em resposta à estimulação antigênica⁷². A produção de IL-12 é realizada por meio de estímulos microbianos, infecções por vírus e indução de células TCD4 já estimuladas por esses agentes. É a primeira citocina liberada em um tecido infectado sendo essencial para o início e polarização da resposta imune que é, a diferenciação de células Th1 e Th2

de células precursoras comuns não polarizadas (CD4 +), bem como a estimulação da produção de Interferon- γ (INF- γ) além de inibir a apoptose de células Th1.⁷³

A IL-12 possui várias funções pró-inflamatórias, entre tais funções destaca-se a capacidade sistêmica de aumentar a imunidade celular, o que estimula seu estudo como um agente antitumoral.⁷²

Tal interleucina é composta de subunidades p35 e p40 as quais são codificadas pelos genes *IL12A* e *IL12B* nas regiões cromossômicas 3p12–3q13.2 e 5q33–33.3, respectivamente. Estudos de sequenciamento mostraram que o gene *IL12B* possui íntrons polimórficos que resultam em variações individuais no nível de produção de IL12, demonstrando que variações gênicas podem estar associadas ao nível de resposta inflamatória de cada indivíduo.⁷⁴

Polimorfismos da região 3' não traduzida (A/C) do gene *IL12B* (rs3212227) já foram descritores em vários tipos de câncer, como câncer do colo do útero e Linfoma de Hodking, originário no sistema linfático, em jovens adultos.⁷⁵

Portanto, a carcinogênese está associada ao acúmulo gradual de alterações genéticas em uma célula normal. Geralmente, tais alterações resultam na perda do controle da proliferação e na aquisição de características associadas à progressão tumoral. Assim, o câncer pode ser considerado uma doença multifatorial envolvendo fatores ambientais e genéticos, sendo que os fatores genéticos podem ser resultantes de alterações sequenciais em genes envolvidos na proliferação e diferenciação celular.⁷⁶

Um dos avanços mais importantes no campo da genética molecular tem sido o estudo e o uso de marcadores moleculares para detectar e explorar polimorfismos genéticos, devido ao uso de marcadores no DNA fornecer diferentes informações que são distribuídas aleatoriamente por todo o genoma.⁷⁷

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar a relação do perfil genético de pacientes diagnosticados com Carcinoma Papilífero da Tireoide atendidos em serviço de saúde localizado no Distrito Federal (Brasil).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Efetuar a genotipagem destes pacientes por meio da estratégia PCR-RFLP para análise dos polimorfismos *BAX* -248 G/A, *BCL2* +128 G/A GCC/ACC (*Ala43Thr*), *MAOA uVNTR*, *IL1B* +3954 C/T, *IL 5* -703 C/T e *IL12B* +1188 A/C em amostras de sangue periférico.

Executar testes estatísticos para avaliar a relação dos perfis genéticos *BAX* -248 G/A, *BCL2* +128 G/A GCC/ACC (*Ala43Thr*), *MAOA uVNTR*, *IL1B* +3954 C/T, *IL 5* -703 C/T e *IL12B* +1188 A/C com a características clínicas dos participantes da pesquisa.

3. METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO

Trata-se de um estudo do tipo caso-controle, comparativo, analítico, prospectivo, com abordagem quantitativa e qualitativa. Os participantes da pesquisa foram divididos em dois grupos. O grupo de casos consistiu de 30 pacientes (20 mulheres, 10 homens) com mais de 18 anos (idade média: $50,9 \pm 9,2$ anos) diagnosticados com câncer papilífero de tireoide (PTC) que foram submetidos a tireoidectomia e radioiodoterapia em uma clínica privada do Distrito Federal. O grupo controle consistiu de 30 voluntários saudáveis (18 mulheres, 12 homens) com idade média de 56 ± 4 anos, pareados e não relacionados ao grupo caso.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os critérios de inclusão do grupo caso incluíram pacientes de ambos os sexos, idade maior que 18 anos, diagnosticados com câncer da tireoide e submetidos a iodoterapia na empresa Imagens Médicas de Brasília (IMEB). Já os critérios de exclusão foram indivíduos menores de 18 anos, que apresentam diagnóstico câncer da tireoide, não eletivos a iodoterapia e que não desejassem participar da pesquisa ou representantes legais que não consentissem em participar.

O grupo controle teve como critérios de inclusão indivíduos de ambos os sexos, que não possuíssem casos de câncer, não foram submetidos a iodoterapia e não aparentados dos pacientes do grupo caso. Os critérios de exclusão foram indivíduos menores de 18 anos, parentes de indivíduos com câncer da tireoide, submetidos a iodoterapia e indivíduos que não desejassem participar da pesquisa.

3.3 CÁLCULO AMOSTRAL

A amostra foi calculada estimando-se a prevalência de 1% de câncer de tireoide entre os tipos de câncer na população adulta, de acordo com o descrito pela Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia⁷⁸, bem como foi considerado

um erro amostral de 5% e intervalo de confiança (IC) de 95%, em número de pessoas com CPT 16.660 (estimativa de novos casos de câncer de tireoide no Brasil, em 2023 segundo o INCA, sendo 2.500 em homens e 14.160 em mulheres)²⁴, chegou-se a 16 participantes. Com a compensação de perdas de participantes durante a pesquisa, foi considerada uma amostra de 30 com CPT.

3.4 COMITÊ DE ÉTICA E TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Centro Universitário de Brasília (UniCEUB), sob o parecer número 2.532.976 (Anexo A). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os participantes do presente estudo, grupo caso (Anexo B) e controle (Anexo C).

Antes da coleta do material, ocorreram esclarecimentos sobre o significado e o possível uso dos resultados previstos. Aos participantes de pesquisa será oferecida a opção de escolher entre serem informados ou não sobre resultados de seus exames.

3.5 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA E AMOSTRA

Após assinar o TCLE e o Termo de Guarda de Material Biológico (Anexo D), foi coletado de cada participante 10 mL de sangue venoso, além do material biológico foram coletadas informações do prontuário do grupo caso, como: tempo de tratamento, exames para detecção de TSH e antitireoglobulina, dados de exposição ao I131, características do tumor e índice de massa corporal (ANEXO E).

As amostras de sangue total dos participantes diagnosticados com câncer da tireoide que realizaram o tratamento com o Radiofármaco Iodeto de Sódio (¹³¹I) foram coletadas antes de tomar a medicação para tratamento, na empresa Imagens Médicas de Brasília (IMEB).

A primeira coleta do sangue total foi realizada antes do tratamento com o Radiofármaco Iodeto de Sódio (¹³¹I), enquanto que a segunda coleta foi feita de 7 a 10 dias após a administração da dose conhecida como Pesquisa de Corpo Inteiro (PCI) pós-dose, de acordo com o protocolo clínico aprovado pela Portaria Nº 7, de 3 de janeiro de 2014.

De 6 a 12 meses após a iodoterapia o participante realizará o exame de PCI-controle também com o Radiofármaco Iodeto de Sódio (^{131}I), com doses baixas para fins visando o controle, estadiamento e acompanhamento da doença, nesse momento, haverá a terceira punção venosa para coleta do sangue total.

Para os participantes do grupo controle, o recrutamento se deu na sala de coleta de amostras no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ceilândia (FCE).

O material biológico (sangue) dos participantes foi estocado no laboratório de Análises Clínicas da FCE, para a extração do DNA das amostras, além das realizações das análises laboratoriais para verificação dos polimorfismos genéticos.

Dificuldades e limitações foram encontradas durante o percurso dessa pesquisa, devido ao pedido de saída de um dos participantes e a ausência de dados sociodemográficos e de resultados de certos exames de alguns participantes.

3.6 METODOLOGIA LABORATORIAL

3.6.1 Extração e quantificação de DNA

Para avaliação dos polimorfismos genéticos o DNA foi extraído de sangue periférico, coletado na 1ª etapa, com uso do *PureLink® Genomic DNA Mini Kit* da empresa Invitrogen (catálogo #K1820-02, lote #19339891). A concentração de DNA foi determinada por meio de espectrofotometria (NanoDrop one). As amostras de DNA extraídas e quantificadas foram submetidas à diluição com água ultrapura a fim de obter um rendimento mínimo de 20 ng/μL. Em seguida, o DNA diluído foi submetido a técnicas de Biologia Molecular como *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) para o estudo de distribuição dos diferentes polimorfismos.

3.6.2 PCR

A técnica de PCR foi utilizada para a amplificação dos seguintes genes: *BAX* - 248 G/A, *BCL2* GCC/ACC (*Ala43Thr*), *MAOA* uVNTR, *IL1B* +3954 C/T, *IL 5* -703 C/T e *IL12B* +1188 A/C, as sequências de oligonucleotídeos utilizadas para avaliar os diferentes polimorfismos estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6 - Lista de oligonucleotídeos.

Gene	Oligonucleotídeo	Referência
<i>BAX</i> (-248 G/A) rs4645878	<i>Forward</i> 5'- CATTAGAGCTGCGATTGGACCG -3' <i>Reverse</i> 5'- GCTCCCTCGGGAGGTTTGGT -3	Mirmajid e colaboradores, 2016 ⁴⁸
<i>BCL2</i> (128 G/A), <i>Ala43Thr</i> rs1801018	<i>Forward</i> 5'- CATTAGAGCTGCGATTGGACCG -3' <i>Reverse</i> 5'- GCTCCCTCGGGAGGTTTGGT -3'	Lima e colaboradores, 2020 ⁷⁹
<i>MAOA</i> uVNTR	<i>Forward</i> 5' – ACAGCCTCGCCGTGGAGAAG -3' <i>Reverse</i> 5' – GAACGGACGCTCCATTCGGA -3'	Tzeng e colaboradores, 2011 ⁸⁰
<i>IL1B</i> (+3954 C/T)	<i>Forward</i> 5' – GTTGTTCATCAGACTTTGACC -3' <i>Reverse</i> 5' – TCCAGTTCATATGGACCAGA -3'	Rashad e colaboradores, 2018 ⁸¹
<i>IL5</i> (-703 C/T)	<i>Forward</i> 5' – CAGGGAGAGCCAATCAGT -3' <i>Reverse</i> 5' – ATGATGTCCAGACTCCAGGATCT -3'	Freidin e colaboradores, 2003
<i>IL12B</i> (+1188 A/C) região não traduzida rs3212227	<i>Forward</i> 5' – GATATCTTTGCTGTATTTGTATAGTT -3' <i>Reverse</i> 5'- AATATTTAAATAGCATGAAGGC – 3'	Silva e colaboradores, 2020 ⁷³

Fonte: própria autora.

Em cada reação, foram utilizados 4,0 µL de DNA genômico na concentração de 2,5 ng/µL; 2,5µL de tampão 10X Taq Pol, (Ludwig Biotecnologia LTDA, Brasil); 0,5 µL de MgCl₂ (50 mM, Ludwig Biotecnologia LTDA, Brasil), 0,5 µL de dNTPs (2,5mM; Ludwig Biotecnologia LTDA, Brasil)); 0,5 µL de Taq-Polimerase (Ludwig Biotecnologia LTDA, Brasil), 5U/µL); 1,5µL de cada oligonucleotídeo *forward* e *reverse* (*Invitrogen Life Technologies*, EUA, 10 pmol/µL); completando com água ultrapura para um volume final de 25 µL por reação.

O equipamento utilizado foi termociclador TC-512 (Techne, EUA).

3.6.2.1 PCR-RFLP do gene BAX (-248 G/A) rs4645878.

As condições de termociclagem da PCR para análise do gene *BAX* (-248 G/A) rs4645878 foram: 96°C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguida por 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 45 segundos, acompanhada de 56°C por 40 segundos, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 segundos para a extensão dos fragmentos. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. O equipamento utilizado foi termociclador Techne modelo TC-512.

Aos oligonucleotídeos flanquearem o gene *BAX* foi possível obter um fragmento amplificado (amplicon) de DNA de 109 pares de base (pb).

Para obter marcadores polimórficos, os produtos de PCR são digeridos utilizando enzimas de restrição para gerar fragmentos de diferentes tamanhos chamados *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLPs). As enzimas de restrição cortam o DNA em locais específicos conhecidos como sítios de restrição.

Após amplificação da região gênica *BAX* foi realizada a técnica de PCR-RFLP, na qual o produto da PCR foi digerido utilizando a enzima de restrição *MspI* Fast Digest (Thermo Scientific, Lote 00066274) que reconhece o sítio de restrição C[^]CGG. Foi realizado um Mix para 5 amostras de PCR utilizado 2,5 µL da enzima de restrição, 10 µL de solução tampão (*Green Buffer*) e 37,5 µL de água ultrapura, após, a digestão individual de cada amostra foi preparada com 10 µL do mix e 10 µL da amostra amplificada por PCR. A digestão ficou em banho-maria a 37°C por duas horas e depois foi revelada por meio de um gel de agarose a 3%, corado com 3µL de brometo de etídeo, utilizando um transluminador.

Observou-se o seguinte padrão genotípico: o homozigoto selvagem (GG) produziu duas bandas (89pb e 20pb), o heterozigoto (GA) produziu três bandas (20pb, 89pb e 109pb) e a variante alélica homozigoto mutada (AA) produziu apenas uma banda de 109pb.

3.5.2.2 PCR-RFLP do gene *BCL2* (128 G/A), Ala43Thr, rs1801018

Para a amplificação do gene *BCL2* (128 G/A), Ala43Thr, rs1800477 foram utilizadas as seguintes condições de termociclagem: 94°C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, acompanhada de 48°C por 45 segundos, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 60 segundos para a extensão dos fragmentos. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos.

Aos oligonucleotídeos flanquearem o gene *BCL2* foi possível obter um fragmento amplificado (amplicon) de DNA de 178 pb.

Para análise genotípica do polimorfismo foi realizada em seguida a técnica de PCR-RFLP, na qual o produto da PCR foi digerido utilizando a enzima de restrição *BglI* Fast Digest (Invitrogen, Lote 01028222) que reconhece o sítio de restrição GCCNNNN[^]NGGC. Foi feito um Mix para 5 amostras de PCR utilizado 5 µL da enzima de restrição, 10 µL de tampão (*Red Buffer*) e 85 µL de água ultrapura. Após, a digestão individual de cada amostra foi preparada com 10 µL do mix e 10 µL da amostra amplificada por PCR. A digestão ficou em banho-maria a 37°C por uma hora e trinta minutos sendo depois revelada por meio de um gel de agarose a 3%, corado com 3µL de brometo de etídeo, utilizando um transluminador. Todas as amostras de digestão enzimáticas corridas em gel de agarose foram acompanhadas de uma amostra de PCR para comparação do tamanho de bandas e certeza da criação dos sítios de restrição.

Observou-se o seguinte padrão genotípico: o homozigoto selvagem (Ala/Ala) produziu duas bandas (157pb e 21pb), o heterozigoto (Ala/Thr) produziria três bandas (178pb, 157pb e 21pb) e a variante alélica homozigoto mutada (Thr/Thr) produziria apenas uma banda de 178pb.

3.5.2.3 PCR do gene *MAOA* uVNTR

A análise da genotipagem do gene *MAOA* uVNTR foi feita apenas pela técnica de PCR, seguindo as seguintes condições de termociclagem: 94°C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, acompanhada de 55°C por 30 segundos, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 segundos para a extensão dos fragmentos. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. O equipamento utilizado foi termociclador Techne modelo TC-512.

Em seguida, o produto da PCR foi revelado por meio de um gel de agarose 4%, corado com 4 µL de brometo de etídio (10 mg/mL) usando o transiluminador. O seguinte padrão alélico foi observado de acordo com o número de repetições *in tandem*: 2R - 320 pb, 3R - 350 pb, 4R - 380 pb e 5R - 410 pb.

3.5.2.4 PCR-RFLP do gene *IL1B* (+3954 C/T)

Para avaliação do polimorfismo do gene *IL1B* (+3954 C/T) foi utilizada a técnica de PCR nas seguintes condições de termociclagem: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 60 segundos, acompanhada de 55°C por 40 segundos para a etapa de extensão. Por fim, o processo de extensão final a 72°C por 7 minutos, obtendo-se um amplicon de 250 pb.

Após amplificação do gene *IL1B* (+3954 C/T) foi realizada a técnica de PCR-RFLP, na qual os produtos da PCR foram digeridos utilizando a enzima de restrição *TaqI* (New England Biolabs, Inc. Beverly, MA, USA), a fim de clivar o alelo C em dois fragmentos: 135bp e 114pb, e não de clivar o alelo T.

Para a digestão enzimática foi realizado um Mix para 5 amostras de PCR utilizado 2,5 µL da enzima de restrição, 10 µL de solução tampão (*Green Buffer*) e 37,5 µL de água ultrapura, após, a digestão individual de cada amostra foi preparada com 10 µL do mix e 10 µL da amostra amplificada por PCR. A digestão ficou em banho-maria a 37°C por três horas e depois foi revelada por meio de um gel de agarose a 3%, corado com 3µL de brometo de etídeo, utilizando um transluminador.

Após a criação dos sítios de restrição observou-se o seguinte padrão genotípico: o homozigoto selvagem (C/C) produziu duas bandas (136pb e 114pb), o

heterozigoto (C/T) produziu três bandas (250pb, 136pb e 114pb) e a variante alélica homozigoto mutada (T/T) produziu apenas uma banda de 250pb.

3.5.2.5 PCR-RFLP do gene *IL5* (-703 C/T)

Para a amplificação do gene *IL5* (-703 C/T), foram utilizadas as seguintes condições de termociclagem: 94°C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguida por 33 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, acompanhada de 60°C por 1 minuto, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 45 segundos para a extensão dos fragmentos. A extensão final foi realizada a 72°C por 8 minutos.

Aos oligonucleotídeos flanquearem o gene *IL5* (-703 C/T) foi possível obter um amplicon de DNA de 178 pb. Para análise genotípica do polimorfismo foi realizada em seguida a técnica de PCR-RFLP, na qual o produto da PCR foi digerido utilizando a enzima de restrição *A/wnI* a fim de clivar o alelo C em dois fragmentos: 160bp e 18pb, e não de clivar o alelo T.

Foi feito um Mix para 5 amostras de PCR utilizado 5 µL da enzima de restrição, 10 µL de tampão (*Green Buffer*) e 85 µL de água ultrapura. Após, a digestão individual de cada amostra foi preparada com 10 µL do mix e 10 µL da amostra amplificada por PCR. A digestão ficou em banho-maria a 37°C por uma hora e trinta minutos sendo depois revelada por meio de um gel de agarose a 3%, corado com 3µL de brometo de etídeo, utilizando um transluminador.

Observou-se o seguinte padrão genotípico: o homozigoto selvagem (C/C) produziu duas bandas (160pb e 18pb), o heterozigoto (C/T) produziu três bandas (178pb, 160pb e 18pb) e a variante alélica homozigoto mutada (T/T) produziu apenas uma banda de 178pb.

3.5.2.6 PCR-RFLP do gene *IL12B* (+1188 A/C) região não traduzida rs3212227

A PCR do gene *IL12B* (+1188 A/C) região não traduzida rs3212227 utilizou as seguintes condições de termociclagem: 95°C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, acompanhada de 53°C por 45 segundos, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 45 segundos para a extensão dos fragmentos. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos.

Aos oligonucleotídeos flanquearem o gene *IL12B* (+1188 A/C) foi possível obter um fragmento amplificado (amplicon) de DNA de 118 pb. Para análise dos genótipos foi realizada a técnica de PCR-RFLP, na qual o produto da PCR foi digerido utilizando a enzima de restrição *TaqI* Fast Digest (Thermo Scientific, Lote 00059767) que reconhece o sítio de restrição T[^]CGA. Foi feito um Mix para 5 amostras de PCR utilizado 5 µL da enzima de restrição, 10 µL de tampão (*Green Buffer*) e 85 µL de água ultrapura. Após, a digestão individual de cada amostra foi preparada com 10 µL do mix e 10 µL da amostra amplificada por PCR. A digestão ficou em banho-maria a 65°C por uma hora e trinta minutos sendo depois foi revelada por meio de um gel de agarose a 3%, corado com 3µL de brometo de etídeo, utilizando um transluminador.

Observou-se o seguinte padrão genotípico: o homozigoto selvagem (A/A) produziu uma banda (118pb), o heterozigoto (A/C) produziu três bandas (118pb, 92pb e 26pb) e a variante alélica homozigoto mutada (C/C) produziu duas bandas (92pb e 26pb).

3.7 PARÂMETRO INFLAMATÓRIO DA IL-1 β .

Para quantificar IL-1 β em soros de pacientes, amostras de sangue foram coletadas em tubos isentos de endotoxina e analisadas com um kit de imunoensaio sanduíche Life Technologies específico para IL-1 β humana, kit ELISA de IL-1 β humana (Cat.# KHC0011, número de lote 74788401A) , seguindo as instruções do fabricante.

Resumidamente, as amostras foram colocadas em poços que possuíam um anticorpo primário, contra a proteína de interesse, adsorvido no fundo da placa. Um anticorpo específico contra o antígeno foi adicionado e marcado com uma enzima chamada Peroxidase de raiz-forte (HRP), que teve com objetivo reagir com o substrato incolor para produzir um produto colorido proporcional à quantidade de proteína de interesse na amostra e pôde ser medido a 450/550 nm, as amostras foram comparadas com uma curva padrão de concentrações conhecidas.

Valores acima de 2,08 pg/ml foram considerados níveis séricos elevados, tais níveis séricos foram medidos apenas uma vez no grupo controle, e nos indivíduos do grupo caso os níveis foram medidos na admissão ao tratamento com radiofármaco e 7 dias após o tratamento.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Para análise estatística, as frequências alélicas e genóticas foram estimadas por meio do software SPSS versão 28.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), adotando-se um nível de significância de 5,0%.

O teste Qui-quadrado e o odds ratio (OR) foram aplicados para comparar as distribuições de frequência, analisar possíveis associações com os alelos e genótipos entre os dois grupos avaliados (caso e controle) e descrever suas estatísticas resumidas.

Os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram empregados para comparar as frequências genóticas dos pacientes com CPT com suas características clínicas: tireoglobulina (Tg), hormônio estimulante da tireoide (TSH) e índice de massa corporal (IMC), bem como a dosagem de IL-1 β .

O teste do Qui-quadrado e o Teste exato de Fisher foram utilizados para analisar a associação entre a distribuição de antitreoglobulina (UI/mL), sexo e dose de radiofármaco administrada (mCi) em pacientes com PTC e seu genótipo. O teste exato de Fisher também foi usado para examinar a associação entre o estadiamento do tumor dos pacientes com CPT, de acordo com a classificação TNM, e seu genótipo.

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DAS ANÁLISES MOLECULARES DO GENE *BAX* (-248 G/A) rs4645878.

Foram selecionados 30 indivíduos (média de idade 43 anos $\pm$ 13 anos) diagnosticados com CPT, por outro lado, o grupo controle foi composto por 81 participantes (média de idade 40 anos $\pm$ 9 anos) saudáveis. A frequência genotípica do polimorfismo do gene *BAX* (-248 G/A) no grupo controle estava em equilíbrio Hardy-Weinberg ($p=0,130$).

A Tabela 7 descreve a distribuição genotípica e alélica no grupo caso e controle, no qual a maior parte do grupo diagnosticado com CPT (60,0 %) apresentou genótipo GG. O mesmo ocorreu no grupo controle (82,7%). Além disso, observou-se uma diferença estatística em relação à associação do polimorfismo e os diferentes grupos ($p=0,042$).

Ao avaliar a distribuição alélica, 76,7% dos pacientes com CPT possuíam o alelo G, contra 90,1% do grupo controle, observando diferença estatística entre os alelos estudados e uma proteção para a ocorrência de CPT, quando portador do alelo selvagem ($p=0,009$; OR=0,360; IC=0,163-0,793). Ao se dicotomizar os genótipos, foi possível observar uma diferença estatística entre os dados, sendo que a presença do genótipo GG sugere uma proteção para a ocorrência de CPT ($p=0,012$, OR=0,313, IC=0,123 - 0,794).

Tabela 7 - Distribuição genotípica do polimorfismo *BAX* (-248 G/A) nos grupos caso e controle.

	CPT		Controle		p	OR	IC (OR)
	N	%	N	%			
GG	18	60,0	67	82,7	0,042*	N/A	N/A
GA	10	33,3	12	14,8			
AA	2	6,6	2	2,5			
TOTAL	30	100	81	100			
G	46	76,7	146	90,1	0,009*	0,360	(0,163-0,793)
A	14	23,3	16	9,9			
TOTAL	60	100,0	162	100,0			
GG	18	60,0	67	82,7	0,012*	0,313	(0,123 - 0,794)
GA+AA	12	40,0	14	17,3			
TOTAL	30	100,0	81	100,0			

Legenda: *= $p < 0,05$; Teste Qui quadrado; N/A=Não se aplica; OR= Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança.

Fonte: Própria autora

A partir dos resultados obtidos, foram analisadas as relações da variante genética com características clínicas ligadas aos pacientes diagnosticados com CPT, como: concentração sérica de tireoglobulina, TSH, antitireoglobulina, IMC, sexo, dose administrada e estadiamento de tumores (TNM).

Ao se avaliar a dosagem de Tireoglobulina nota-se que os pacientes com genótipo AA tiveram como mediana maior do que os outros diferentes genótipos, contudo não houve diferença significativa entre os diferentes tipos de genótipos e a dosagem de tireoglobulina ($p=0,102$).

Analisando as três variantes genéticas estudadas com os valores de concentração sérica TSH e IMC ($p = 0,973$ e $0,460$; respectivamente) também não foi observada diferença estatística entre os dados (Tabela 8).

Tabela 8 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 e P-valores das variáveis Tireoglobulina, TSH e IMC nos pacientes diagnosticados com CPT, conforme o genótipo do polimorfismo *BAX* (-248 G/A).

<i>BAX</i> (-248 G/A)	[Tireoglobulina] ng/mL			[TSH] uUI/mL			IMC		
	P 25	Mediana	P 75	P 25	Mediana	P 75	P 25	Mediana	P 75
GG	1,63	4,40	9,00	38,30	77,90	117,23	24,44	27,60	30,64
GA	0,52	0,81	1,06	7,46	71,96	121,00	22,57	24,37	33,30
AA	8,09	97,25	186,40	7,07	68,57	130,07	23,24	23,93	24,62
p valor	0,102 ^a			0,973 ^a			0,460 ^a		
GG	1,63	4,40	9,00	38,30	77,90	117,23	24,44	27,60	30,64
GA+AA	0,56	1,04	20,04	7,46	71,96	121,00	22,91	24,37	32,51
p valor	0,506 ^b			0,845 ^b			0,324 ^b		

Legenda: a=Teste H de Kruskal-Wallis; b=Teste U de Mann-Whitney. Valores de referência: Tireoglobulina <10 ng/ml; TSH <4,5µUI/ml.

Fonte: própria autora.

A Tabela 9 descreve a relação da variante genética estudada e a concentração de antitireoglobulina nos pacientes diagnosticados com CPT dicotomizados quanto ao genótipo (GG e GA+AA), além de seu sexo e da dose de fármaco administrada. Acerca da concentração de antitireoglobulina, 10 dos participantes diagnosticados com CPT (76,9%) obtiveram uma concentração >20UI/mL e eram portadores do genótipo GG.

Verificou-se ainda que a maior parte dos indivíduos diagnosticados com CPT e do genótipo GG (70,6%) eram do sexo feminino, quando comparado ao masculino. Sendo que não houve diferença estatística entre os grupos genéticos e as variáveis estudadas. Avaliando a dose de radiofármaco administrada, 14 pacientes (82,4%) que apresentam o genótipo GG, receberam doses ≤ 150 mCi e 3 indivíduos com CPT (17,6%) deste grupo com o mesmo genótipo, receberam a dose >150 mCi. Nas três características estudadas, não foram observadas diferenças estatísticas significativas.

Tabela 9 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 e P-valores das variáveis Tireoglobulina, TSH e IMC nos pacientes diagnosticados com CPT, conforme o genótipo do polimorfismo *BAX* (-248 G/A).

			<i>BAX</i> (-248 G/A)		p	OR	IC (OR)
			GG	GA+AA			
Antitireoglobulina (UI/mL)	<20	N	10	8	0,616	0,417	(0,36-4,81)
		%	76,9	88,8			
	>20	N	3	1			
		%	23,1	11,2			
	Total	N	13	9			
		%	100	100			
Sexo	Feminino	N	12	6	0,438	2,4	(0,52-11,19)
		%	70,6	50			
	Masculino	N	5	6			
		%	29,4	50			
	Total	N	17	12			
		%	100	100			
Dose administrada (mCI)	≤150	N	14	11	0,622	0,42	(0,39-4,66)
		%	82,4	91,7			
	>150	N	3	1			
		%	17,6	8,3			
	Total	N	17	12			
		%	100	100			

Legenda: Teste exato de Fisher; OR= Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança. Valores de referência: Antitireoglobulina <4,00 UI/ml
 Fonte: própria autora.

Pode-se observar que metade dos pacientes com genótipo GG possuía estadiamento T1+T2, contra a outra metade com o mesmo genótipo e estadiamento T3+T4. Quanto aos demais estadiamentos, pouca informação dos pacientes estava disponível no prontuário (Tabela 10).

Tabela 10 - Estudo da associação entre o estadiamento TNM e pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo *BAX* (-248 G/A).

			<i>BAX</i> (-248 G/A)		p	OR	IC (OR)
			GG	GA+AA			
T	T1+T2	N	3	5	0,999	0,6	(0,70-5,14)
		%	50	62,5			
	T3+T4	N	3	3			
		%	50	37,5			
	Total	N	6	8			
		%	100	100			
N	N0	N	1	-	0,222	N/A	N/A
		%	50	-			
	N1	N	1	7			
		%	50	100			
	Total	N	2	7			
		%	100	100			
M	M1	N	1	1	N/A	N/A	N/A
		%	100	100			

Legenda: Teste exato de Fisher; N/A=não se aplica; OR= Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança.

Fonte: própria autora.

4.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES MOLECULARES DO GENE *BCL2* (+128 G/A), Ala43Thr, rs1801018.

Ao se avaliar a distribuição genotípica e alélica do grupo caso e controle quanto ao polimorfismo do gene *BCL2* (+128 G/A), Ala43Thr, nota-se que todos os indivíduos da pesquisa tanto do grupo caso (100%) quanto controle (100%) apresentaram genótipo GG, demonstrando a presença do aminoácido alanina na tradução de ambos os alelos (Ala43Ala), não sendo possível fazer análise de diferença estatística dos dados (Tabela 11).

Tabela 11 - Distribuição genotípica do polimorfismo *BCL2* (+128 G/A), Ala43Thr nos grupos caso e controle.

	CPT		Controle				
	N	%	N	%	p	OR	IC (OR)
Ala43Ala	30	100	30	100	N/A	N/A	N/A
Ala43Thr	-	-	-	-			
Thr43Thr	-	-	-	-			
Total	30	100	30	100			
Ala	60	100	60	100	N/A	N/A	N/A
Thr	-	-	-	-			
Total	60	100	60	100			

Legenda: N/A=Não se aplica; OR= Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança.

Fonte: própria autora.

Analisando as características clínicas: concentração sérica de tireoglobulina, TSH e IMC dos participantes diagnosticados com CPT com genótipo Ala43Ala nota-se que a mediana da dosagem de Tireoglobulina foi 3,04 ng/mL, sendo o Percentil 25 0,90 ng/mL e o Percentil 75 8,55 ng/mL, estando dentro do esperado para os pacientes com câncer de tireoide já que foram submetidos a tireoidectomia total. A dosagem de TSH apresenta a mediana 76,65 μ UI/ml, com valores de Percentil 25 14,27 μ UI/ml e Percentil 75 118,08 μ UI/ml (Tabela 12).

Tabela 12 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 e P-valores das variáveis Tireoglobulina, TSH e IMC nos pacientes diagnosticados com CPT, conforme o genótipo do polimorfismo *BCL2* (+128 G/A).

<i>BCL2</i> (+128 G/A) Ala43Thr	[Tireoglobulina] ng/mL			[TSH] uUI/mL			IMC		
	P 25	Mediana	P 75	P 25	Mediana	P 75	P 25	Mediana	P 75
Ala43Ala	0,90	3,04	8,55	14,27	76,65	118,08	23,83	26,22	30,80
BCL2 Ala43Thr	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Thr43Thr	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
P valor	N/A			N/A			N/A		

Legenda: N/A=não se aplica. Valores de referência: Tireoglobulina <10 ng/ml; TSH <4,5µUI/ml.

Fonte: própria autora.

O estudo da associação entre a distribuição de antitireoglobulina, sexo e dose administrada do radiofármaco ^{131}I pode ser avaliado na tabela 13, nota-se que 18 (81,8%) dos indivíduos com genótipo Ala43Ala possuíam dosagem de antitireoglobulina menor que 20 UI/mL enquanto que apenas 4 (18,2%) participantes tiveram tal dosagem maior que 20 UI/mL.

Tabela 13 - Estudo da associação entre a distribuição da antitireoglobulina (UI/mL), sexo e dose administrada (mCi) do radiofármaco nos pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo *BCL2* (+128 G/A).

			<i>BCL2</i> (+128 G/A), Ala43Thr		p	OR	IC (OR)
			Ala43Ala	Ala43Thr/Thr43Thr			
Antitireoglobulina (UI/mL)	<20	N	18	-	N/A	N/A	N/A
		%	81,8	-			
	>20	N	4	-			
		%	18,2	-			
	Total	N	22	-			
		%	100,0	-			
Sexo	Feminino	N	19	-	N/A	N/A	N/A
		%	63,3	-			
	Masculino	N	11	-			
		%	36,7	-			
	Total	N	30	-			
		%	100,0	-			
Dose administrada (mCi)	≤150	N	13	-	N/A	N/A	N/A
		%	43,3	-			
	>150	N	17	-			
		%	56,7	-			
	Total	N	30	-			
		%	100,0	-			

Legenda: OR= Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança; N/A=não se aplica. Valores de referência:

Antitireoglobulina <4,00 UI/ml.

Fonte: própria autora.

Dos participantes Ala43Ala, 19 (63,6%) eram do sexo feminino e 11 (36,7%) do sexo masculino, avaliando-se a dose administrada de I131 nos indivíduos com tal genótipo nota-se que 13 (43,3%) tiveram a dose menor ou igual a 150 mCi enquanto que 17 (56,7%) dos pacientes diagnosticados com CPT foram submetidos à dose maior que 150 mCi, não sendo possível analisar diferença estatística entre os genótipos pois todos os indivíduos do grupo caso possuíam genótipo Ala43Ala.

Ao se avaliar a associação entre o estadiamento TNM e os pacientes diagnosticados com CPT observa-se que dos participantes com genótipo Ala43Ala 8 (57,14%) apresentavam estadiamento T1+T2 e 6 (42,86%) se encontravam com estadiamento T3+T4. Avaliando as metástases em linfonodos regionais 1 (11,11%) não apresentava tais metástases (N0), enquanto que 8 (88,99%) possuíam estadiamento N1. Quanto à metástase (M), notou-se que 2 pacientes com genótipo Ala43Ala possuíam tal estadiamento. Não foi possível analisar diferença estatística entre os genótipos e os diferentes estadiamentos dos indivíduos da pesquisa pois todos os indivíduos do grupo caso possuíam genótipo Ala43Ala (Tabela 14).

Tabela 14 - Estudo da associação entre o estadiamento TNM e pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo *BCL2* (+128 G/A).

			<i>BCL2</i> (+128 G/A), Ala43Thr		p	OR	IC (OR)
			Ala43Ala	Ala43Thr + Thr43Thr			
T	T1+T2	N	8	-	N/A	N/A	N/A
		%	57,14	-			
	T3+T4	N	6	-			
		%	42,86	-			
	Total	N	14	-			
		%	100,00	-			
N	N0	N	1	-	N/A	N/A	N/A
		%	11,11	-			
	N1	N	8	-			
		%	88,89	-			
	Total	N	9	-			
		%	100,00	-			
M	M1	N	2	-	N/A	N/A	N/A
		%	100,00	-			

Legenda: N/A=não se aplica; OR= Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança.

Fonte: própria autora.

4.3 RESULTADOS DAS ANÁLISES MOLECULARES DO GENE *MAOA uVNTR*

A distribuição genotípica do polimorfismo *MAOA uVNTR* nos grupos caso e controle está apresentada na Tabela 15. Os genótipos encontrados na amostra analisada foram 2R/4R, 3R@ (feminino homozigoto 3R/3R ou masculino hemizigoto 3R*), 3R/4R, 3R/5R, 4R@ (feminino homozigoto 4R/4R ou masculino hemizigoto 4R*) e 5R@ (feminino homozigoto 5R/5R ou masculino hemizigoto 5R*).

Os mais frequentes foram 3R@ (n=12, 20%), 3R/4R (n=16, 26,7%) e 4R@ (n=24, 40%). Como ainda existem controvérsias^{58,59} sobre a atividade/efeito dos alelos 2R e 5R do *MAOA uVNTR* na função e transcrição do *MAOA* e sua baixa frequência na amostra analisada, todas as análises posteriores foram feitas em relação a 3R@, 3R/4R e 4R@ genótipos, deixando 27 pacientes PTC e 25 controles saudáveis dos 30 dos grupos originais.

Tabela 15 - Distribuição genotípica do polimorfismo MAOA uVNTR nos grupos caso (PTC) e controle (saudável).

MAOA uVNTR	Grupos				Total	
	CPT		Controle			
	N	%	N	%	N	%
2R/2R ou 2R* (2R @)	-	-	-	-	-	-
2R/3R	-	-	-	-	-	-
2R/4R	1	3,3%	4	13,3%	5	8,3%
2R/5R	-	-	-	-	-	-
3R/3R ou 3R* (3R @)	5	16,7%	7	23,3%	12	20,0%
3R/4R	8	26,7%	8	26,7%	16	26,7%
3R/5R	1	3,3%	-	-	1	1,7%
4R/4R ou 4R* (4R @)	14	46,7%	10	33,3%	24	40,0%
4R/5R	-	-	-	-	-	-
5R/5R ou 5R* (5R @)	1	3,3%	1	3,3%	2	3,3%

Legenda: * representa hemizigotos masculinos; @ representa a combinação de homozigotos femininos e hemizigotos masculinos.

Fonte: própria autora

A distribuição genotípica MAOA uVNTR nos grupos caso e controle considerando apenas os alelos 3R e 4R é apresentada na Tabela 16. Embora 14 (51,9%) dos indivíduos do grupo caso tivessem o genótipo 4R @ contra 10 (40,0%) no controle grupo, não foi detectada diferença significativa entre a distribuição genotípica dos grupos de pesquisa ($p=0,629$). Mesmo avaliando os genótipos de forma dicotomizada – modelo dominante (genótipos 4R @ vs. 3R @ +3R/4R), não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,392$). A frequência genotípica do polimorfismo do gene MAOA uVNTR no grupo controle estava em equilíbrio Hardy-Weinberg ($p=0,07$).

Tabela 16 - Distribuição genotípica do polimorfismo MAOA uVNTR de acordo com os alelos 3R e 4R nos grupos caso (PTC) e controle (saudável).

MAOA uVNTR	Grupos				p	OR	IC (OR)
	PTC		Controle				
	N	%	N	%			
3R/3R ou 3R* (3R @)	5	18,5%	7	28,0%	0,629	N / A	N / A
3R/4R	8	29,6%	8	32,0%			
4R/4R ou 4R* (4R @)	14	51,9%	10	40,0%			
4R/4R ou 4R* (4R @)	14	51,9	10	40,0%	0,392	1.62	0,54- 4,85
3R @ + 3R/4R	13	48.1	15	60,0%			

Legenda: * representa hemizigotos masculinos ; @ representa a combinação de homozigotos femininos e hemizigotos masculinos ; teste qui-quadrado; N/A= Não aplicável; OR= Razão de chances; IC=Intervalo de confiança.

Fonte: própria autora

A Tabela 17 apresenta as relações do polimorfismo genético MAOA uVNTR de pacientes com PTC com diferentes características clínicas. Nenhuma das características clínicas analisadas tireoglobulina (Tg ng/mL), hormônio estimulante da tireoide (TSH μ UI/mL) e índice de massa corporal (IMC) apresentou diferença estatística entre os genótipos dos pacientes com PTC ($p=0,478$; $p=0,824$; e $p=0,999$), respectivamente.

Tabela 17 - Mediana, percentil 25, percentil 75 e valores p de tireoglobulina (Tg), hormônio estimulante da tireoide (TSH) e variáveis do IMC em pacientes diagnosticados com câncer papilífero de tireoide (PTC), de acordo com seu genótipo *MAOA* *uVNTR*.

<i>MAOA</i> <i>uVNTR</i>	[Tireoglobulina] ng/mL			[TSH] uUI /mL			IMC		
	P25	Mediana	P75	P25	Mediana	P75	P25	Mediana	P75
3R @ +	0,47	4,40	31,99	38.30	76,65	117.23	23.65	25.73	32.46
3R/4R									
4R @	0,77	2.88	5.58	7.46	77,90	136.13	24.34	25.44	30.47
p-valor #		0,478			0,824			0,999	

Legenda: @ representa a combinação de homozigotos femininos e hemizigotos masculinos; # Teste U de Mann-Whitney. Valores de referência: Tireoglobulina <10 ng/ml; TSH <4,5µUI/ml.

Fonte: própria autora

A análise de antitireoglobulina, sexo biológico e dose administrada de ^{131}I de acordo com a distribuição genotípica *MAOA uVNTR* é mostrada na Tabela 18. Nenhuma diferença significativa foi encontrada nos níveis de antitireoglobulina ($p=0,313$) e na dose administrada de radiofármaco (^{131}I) ($p=0,842$) em pacientes com PTC de acordo com seu genótipo *MAOA uVNTR*. Embora não tenha sido identificada diferença significativa em relação ao sexo biológico dos pacientes com CPT ($p=0,148$), houve mais pacientes do sexo feminino com pelo menos um alelo 3R ($n=10$; 76,9%) do que pacientes do sexo masculino ($n=3$; 23,1%).

Tabela 18 - Estudo da associação entre a distribuição da antitireoglobulina (UI/mL), sexo e dose administrada (mCi) do radiofármaco nos pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo MAOA uVNTR.

		MAOA uVNTR				P #
		3R @ + 3R/4R		4R @		
		N	%	N	%	
Antitireoglobulina (UI/mL)	<20	7	70,0%	8	88,9%	0,313
	>20	3	30,0%	1	11,1%	
sexo biológico	F	10	76,9%	7	50,0%	0,148
	M	3	23,1%	7	50,0%	
Dose administrada (mCI)	≤150	6	46,2%	7	50,0%	0,573
	>150	7	53,8%	7	50,0%	

Legenda: @ representa a combinação de homozigotos femininos e hemizigotos masculinos ;# = teste exato de Fisher; *= p<0,05.

Valores de referência: Antitireoglobulina <4,00 UI/ml

Fonte: própria autora

A Tabela 19 mostra a análise de associação entre o estadiamento TNM e o genótipo *MAOA uVNTR* dos pacientes com CPT. Notavelmente, todos os pacientes com estadiamento T1+T2 (n= 7, 77,8%) apresentavam o genótipo 4R @ (feminino homozigoto 4R/4R ou masculino hemizigoto 4R*) (p= 0,018) e nenhum apresentava o 3R @ (feminino homozigoto 3R/3R ou masculino hemizigoto 3R*) + genótipo 3R/4R (n= 0, 0%).

Tabela 19 - Estudo da associação entre o estadiamento TNM e pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo *MAOA uVNTR*.

		MAOA uVNTR				P #
		3R @ + 3R/4R		4R @		
		N	%	N	%	
T	T1+T2	0	0,0%	7	77,8%	0,018*
	T3+T4	3	100,0%	2	22,2%	
N	N0	0	0,0%	1	16,7%	0,659
	N1	1	100,0%	5	83,3%	
M	M0	0	0,0%	0	0,0%	N / D
	M1	0	0,0%	2	100,0%	

Legenda: @ representa a combinação de homozigotos femininos e hemizigotos masculinos; # Teste Exato de Fisher; *= p<0,05

Fonte: própria autora

4.4 RESULTADOS DAS ANÁLISES MOLECULARES DO GENE *IL1B* (+3954 C/T) rs1143634.

A frequência e a distribuição genóticas do polimorfismo *IL-1B* +3954C/T nos pacientes com CPT e do grupo controle estão descritas na Tabela 20. Tais frequências genóticas, foram encontradas em equilíbrio Hardy-Weinberg ($P=0,713$).

O estudo mostra que não houve diferença significativa na distribuição genotípica entre os grupos ($P=0,297$), sendo que 33,3% dos indivíduos diagnosticados com CPT possuíam o genótipo CC contra 50% do grupo controle.

Ao se avaliar os genótipos dicotomizados, não houve associação estatística entre o genótipo CC e os genótipos CC+CT ($P = 0,191$; OR = 0,50; IC95% = 0,18 – 1,42). Analisando os alelos de forma isolada, também não foi possível observar diferença estatisticamente significativa ($P = 0,126$; OR = 0,55; IC95% = 0,26 – 1,18). Demonstrando que a presença do polimorfismo *IL-1B* 3954C/T não foi associado ao carcinoma papilífero da tireoide.

Tabela 20 - Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo *IL1B* + 3954C/T em indivíduos com CPT e grupo controle.

	CPT		Controle				
	N	%	N	%	p	OR	IC (OR)
CC	10	33,3	15	50,0	0,297	NA	NA
CT	15	50,0	13	43,3			
TT	5	16,7	2	6,7			
Total	30	100	30	100			
CC	10	33,3	15	50,0	0,191	0,50	0,18-1,42
CT+TT	20	66,7	15	50,0			
Total	30	100	30	100			
C	35	58,3	43	71,7	0,126	0,55	0,26-1,18
T	25	41,7	17	28,3			
Total	60	100	60	100			

Legenda: Teste Qui quadrado; N/A=Não se aplica; OR= Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança.

Fonte: Própria autora

A tabela 21 descreve variáveis clínicas dos indivíduos diagnosticados com CPT quanto aos seus diferentes genótipos (CC, CT e TT), contudo nenhuma das características clínicas analisadas tireoglobulina (Tg ng/mL), hormônio estimulante da tireoide (TSH μ UI/mL) e índice de massa corporal (IMC) apresentou diferença estatística entre os genótipos dos pacientes com PTC ($p=0,445$; $p=0,378$; e $p=0,654$), respectivamente.

Aos se analisar os genótipos de forma dicotomizada (CC e CT+TT) também não foi encontrada diferença estatística entre as variáveis Tg, TSH e IMC e os diferentes genótipos ($p=0,625$, $0,999$, $0,839$), respectivamente.

Tabela 21 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 e P-valores das variáveis Tireoglobulina, TSH e IMC nos pacientes diagnosticados com CPT, conforme o genótipo do polimorfismo *IL1B* +3954 C/T.

<i>IL1B</i> + 3954C/T	[Tireoglobulina] ng/mL			[TSH] uUI/mL			IMC		
	P 25	Mediana	P 75	P 25	Mediana	P 75	P 25	Mediana	P 75
CC	0,77	3,04	5,58	1,20	77,90	118,08	23,83	25,75	30,80
CT	0,59	1,63	31,90	10,87	60,91	106,33	23,24	24,37	31,71
TT	2,88	8,09	195,00	60,51	116,72	137,00	26,22	27,06	30,48
p valor		0,445 ^a			0,378 ^a			0,654 ^a	
CC	0,77	3,04	5,58	1,20	77,90	118,08	23,83	25,75	30,80
CT+TT	1,02	3,64	31,90	15,96	68,94	119,12	23,67	26,22	31,61
p valor		0,625 ^b			0,999 ^b			0,839 ^b	

Legenda: a=Teste H de Kruskal-Wallis; b=Teste U de Mann-Whitney. Valores de referência: Tireoglobulina <10 ng/ml; TSH <4,5µUI/ml.

Fonte: própria autora.

A tabela 22 demonstra o estudo da associação entre a distribuição de antitireoglobulina, sexo e dose administrada do radiofármaco ^{131}I pode ser avaliado na tabela 22, nota-se que 7 (77,7%) dos indivíduos com genótipo CC possuíam dosagem de antitireoglobulina menor que 20 UI/mL contra 11 (84,6%) dos indivíduos com genótipos CT+CC.

Dos participantes com genótipo CC, 7 (70%) eram do sexo feminino, contra 11 (84,6%) com genótipos CT+TT, não havendo diferença significativa entre os dados ($p=0,452$). Avaliando-se a dose administrada de ^{131}I , nota-se que 10 (100%) dos participantes com genótipo CC tiveram a dose menor ou igual a 150 mCi contra 16 (80%) indivíduos com genótipo CT+TT, não sendo observada diferença estatística entre os dados ($p=0,176$).

Tabela 22 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 e P-valores das variáveis Tireoglobulina, TSH e IMC nos pacientes diagnosticados com CPT, conforme o genótipo do polimorfismo *IL1B* +3954 C/T.

		IL1B + 3954C/T				P	OR	IC (OR)
		CC		CT+TT				
		N	%	N	%			
Antitireoglobulina (UI/mL)	<20	7	77,8	11	84,6	0,551	0,64	0,07-5,61
	>20	2	22,2	2	15,4			
	Total	9	100,0	13	100,0			
Sexo	F	7	70,0	12	60,0	0,452	1,55	0,31-7,87
	M	3	30,0	8	40,0			
	Total	10	100,0	20	100,0			
Dose administrada (mCl)	<150	10	100,0	16	80,0	0,176	NA	NA
	>150	0	0,0	4	20,0			
	Total	10	100,0	20	100,0			

Legenda: Teste exato de Fisher; OR= Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança. Valores de referência:

Antitireoglobulina <4,00 UI/ml

Fonte: própria autora.

Avaliando o estadiamento TNM dos pacientes diagnosticados com CPT observa-se que 2 (100%) indivíduos com genótipo CC apresentavam estadiamento T1+T2 contra 6 (50%) indivíduos com genótipo CT+TT e o mesmo estadiamento ($p=0,233$). Avaliando as metástases em linfonodos regionais, apenas 1 (100%) indivíduo não apresentava tais metástases (N0), contra nenhum indivíduo com genótipo CT+TT ($p=0,111$). Quanto a presença de metástase (M), observou-se que nenhum indivíduo com genótipo CC ou CT+TT teve ausência de metástase (M0) ($P=0,999$) (Tabela 23).

Tabela 23 - Estudo da associação entre o estadiamento TNM e pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo *IL1B* +3954 C/T.

		IL1B + 3954C/T				P	OR	IC (OR)
		CC		CT+TT				
		N	%	N	%			
T	T1+T2	2	100,0	6	50,0	0,233	NA	NA
	T3+T4	0	0,0	6	50,0			
	Total	2	100,0	12	100,0			
N	N0	1	100,0	0	0,0	0,111	NA	NA
	N1	0	0,0	8	100,0			
	Total	1	100,0	8	100,0			
M	M0	0	0,0	0	0,0	0,999	NA	NA
	M1	0	0,0	2	100,0			
	Total	0	0,0	2	100,0			

Legenda: Teste Exato de Fisher; N/A=não se aplica; OR= Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança.

Fonte: própria autora.

Os níveis de IL-1 β dos pacientes com CPT antes e após iodoterapia associados aos diferentes genótipos, são descritos na tabela 24, sendo associados com a distribuição genotípica em relação a percentil 25, mediana e percentil 75. Na análise dos dados inflamatórios antes e após iodoterapia, verificou-se uma elevação considerável dos níveis de IL-1 β após o tratamento independentemente do genótipo. Porém, na análise genotípica individual para antes do tratamento não houve relação entre os genótipos e os níveis de IL-1 β ($p = 0,387$), e após tratamento também não foi possível verificar relação entre os genótipos e os níveis de IL-1 β ($p = 0,608$).

Tabela 24 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 dos níveis de IL-1 β antes e depois da iodoterapia, conforme o genótipo do polimorfismo *IL1B* +3954 C/T.

		<i>IL1B</i> + 3954C/T		
		CC	CT	TT
IL-1b (pg/mL) antes	P 25	12,90	10,91	13,62
	Mediana	17,01	14,26	16,03
	P 75	18,41	16,57	18,86
$p = 0,387$				
IL-1b (pg/mL) depois	P 25	81,98	81,20	75,25
	Mediana	132,68	98,02	97,85
	P 75	143,60	104,68	129,03
$p = 0,608$				

Legenda: Teste Exato de Fisher

Fonte: Própria autora

Com esses dados foi possível analisar os perfis inflamatórios de ambos os grupos, verificando que os pacientes com CPT, independente do genótipo e independente do momento (antes ou depois do tratamento com I131), possuíam níveis mais elevados de IL-1 β quando comparado aos indivíduos do grupo controle.

Ao se analisar a dosagem de IL-1 β dos indivíduos com genótipos CC, CT e TT antes do tratamento nota-se que os indivíduos diagnosticados com CPT apresentam uma elevação importante dos níveis de IL-1 β quando comparados ao grupo controle, independente do genótipo. Observando-se diferença estatística na concentração de IL-1 β antes do tratamento em relação genótipos CC e CT, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,001$) (Tabela 25).

Avaliando a dosagem de IL-1 β do grupo caso depois do tratamento com I131 observa-se uma elevação ainda maior dos níveis de tal interleucina e quando tais dosagens são comparadas às dosagens grupo controle nota-se uma diferença estatisticamente significativa nos genótipos CC ($p < 0,001$) e CT ($p < 0,001$) (tabela 26).

Tabela 25 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 dos níveis de IL-1 β do grupo controle e do grupo caso antes da iodoterapia, conforme o genótipo do polimorfismo *IL1B* +3954 C/T.

		Genótipos								
		CC			CT			TT		
		P25	Mediana	P75	P25	Mediana	P75	P25	Mediana	P75
IL-1 β (pg/mL)	CPT Antes	12,90	17,01	18,41	10,91	14,26	16,57	13,62	16,03	18,86
	Controle	5,01	7,01	8,39	6,17	7,09	7,90	6,16	6,16	6,16
p <0,001				p <0,001			p = 0,500			

Legenda: Teste U de Mann-Whitney

Fonte: Própria autora

Tabela 26 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 dos níveis de IL-1 β do grupo controle e do grupo caso depois da iodoterapia, conforme o genótipo do polimorfismo *IL1B* +3954 C/T.

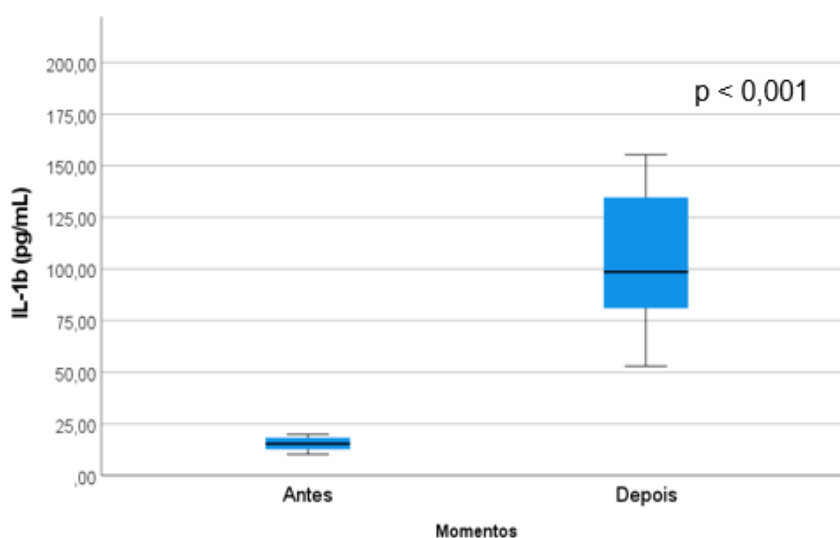
		Genótipos								
		CC			CT			TT		
		P25	Mediana	P75	P25	Mediana	P75	P25	Mediana	P75
IL-1 β (pg/mL)	CPT Depois	81,98	132,68	143,60	81,20	98,02	104,68	75,25	97,85	129,03
	Controle	5,01	7,01	8,39	6,17	7,09	7,90	6,16	6,16	6,16
p <0,001				p <0,001				p = 0,500		

Legenda: Teste U de Mann-Whitney

Fonte: Própria autor

Ao se avaliar a variação dos valores de dosagem de IL-1 β antes e depois da iodoterapia nota-se que antes do tratamento a variação dos valores em torno da mediana é mínima, sendo o p75 = 187,39 pg/mL, a mediana = 15,45 pg/mL o p25 = 12,72 pg/mL. Contudo, após a iodoterapia nota-se uma elevação da IL-1 β com uma predominância de valores entre a mediana = 98,62 e o p75 = 134,71, demonstrando que grande parte dos pacientes elevaram sua IL-1 β a cima da mediana após o tratamento com o ¹³¹I (p<0,001) (Figura 11).

Figura 12 - Box-plots demonstrando a variação entre os valores de dosagem de IL-1 β antes e depois da iodoterapia.



Legenda: Teste Exato de Fisher

Fonte: própria autora.

Avaliando a variação dos valores de dosagem de IL-1 β antes do tratamento com o ¹³¹I e comparando com a dosagem do grupo controle nota-se que a dosagem do grupo caso antes do tratamento é consideravelmente maior e que grande parte dos pacientes com genótipo TT possuíam sua dosagem de IL-1 β menor do que a mediana, observando-se uma diferença estatística entre as análises (p<0,001) (Figura 12).

Observando a variação dos valores de IL-1 β depois da iodoterapia e comparando com a dosagem do grupo controle a diferença dos valores é ainda mais discrepante, havendo uma elevação de tal interleucina nos participantes do grupo caso após o tratamento, sendo que grande parte dos indivíduos com genótipo TT após o tratamento possuíam valores de IL-1 β acima da mediana (p<0,001) (Figura 13).

Figura 13 - Box-plots demonstrando a variação entre os valores de dosagem de IL-1 β no grupo controle e no grupo caso antes da iodoterapia.

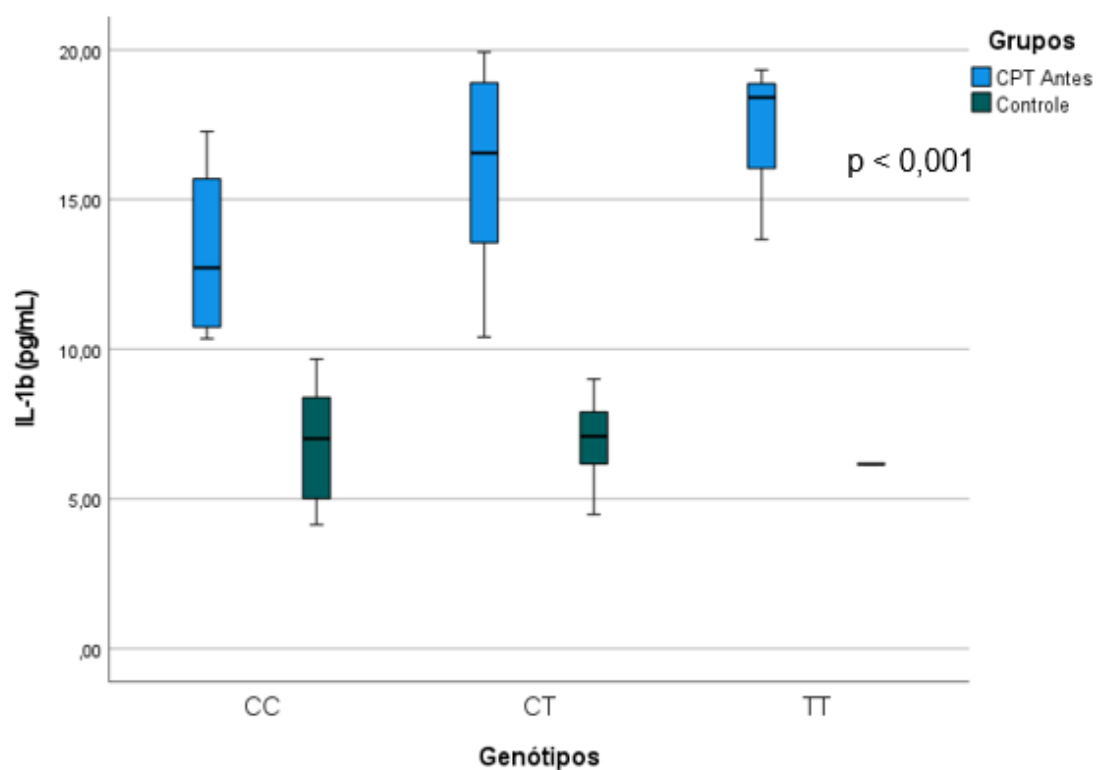
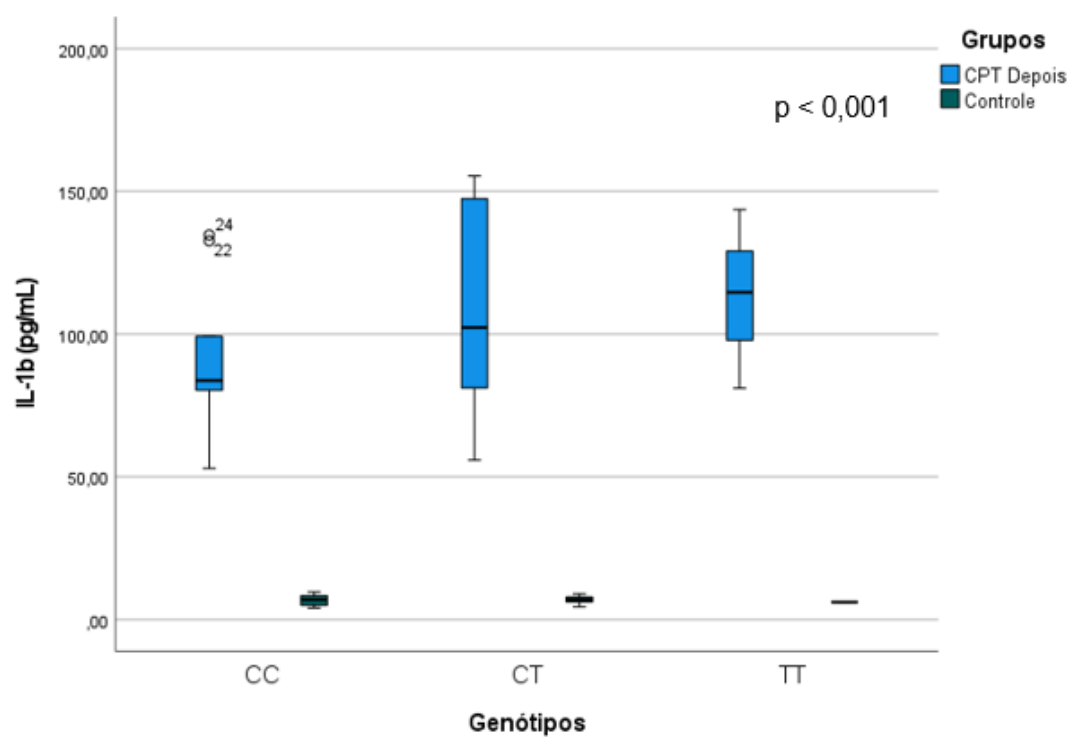


Figura 14 - Box-plots demonstrando a variação entre os valores de dosagem de IL-1 β no grupo controle e no grupo caso depois da iodoterapia.



4.5 RESULTADOS DAS ANÁLISES MOLECULARES DO GENE *IL5* (-703 C / T)

A frequência e a distribuição genotípicas do polimorfismo *IL5* (-703 C / T) nos pacientes com CPT e do grupo controle estão descritas na Tabela 27. Tais frequências genotípicas, foram encontradas em equilíbrio Hardy-Weinberg ($P=0,503$).

Ao analisar os diferentes genótipos no grupo caso e controle nota-se que não houve diferença significativa na distribuição genotípica entre os grupos ($p=0,273$), sendo que 36,6% dos indivíduos do grupo caso possuíam genótipo CC contra 20,7% do controle.

Avaliando os genótipos dicotomizados, não houve diferença significativa entre o genótipo CC e os genótipos CC+CT ($p = 0,175$; OR = 2,22; IC95% = 0,69 – 7,12). Analisando os alelos de forma isolada, também não foi possível observar diferença estatisticamente significativa ($P = 0,099$; OR = 1,84; IC95% = 0,89 – 3,84).

Tabela 27 - Distribuição genotípica do polimorfismo *IL5* (-703 C / T) nos grupos caso e controle.

	CPT		Controle				
	N	%	N	%	P	OR	IC (OR)
CC	11	36,7	6	20,7			
CT	14	46,7	14	48,3	0,273	NA	NA
TT	5	16,7	9	31,0			
Total	30	100,0	29	100,0			
CC	11	36,7	6	20,7			
CT+TT	19	63,3	23	79,3	0,175	2,22	(0,69-7,12)
Total	30	100,0	29	100,0			
C	36	60,0	26	44,8			
T	24	40,0	32	55,2	0,099	1,84	(0,89-3,84)
Total	60	100,0	58	100,0			

Legenda: Teste Qui quadrado; N/A=Não se aplica; OR= Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança.

Fonte: Própria autora

A partir dos resultados obtidos no estudo, foram analisadas as relações da variante genética *IL5* -703C/T com características clínicas ligadas aos pacientes diagnosticados com CPT.

Ao se avaliar a dosagem de Tireoglobulina não foi observada diferença estatística em relação aos diferentes genótipos ($p=0,066$) e aos genótipos dicotomizados ($p=0,194$). Analisando a dosagem de TSH, nota-se que pacientes com genótipo CC tiveram como mediana 110,0 uUI/mL, contudo não houve diferença significativa entre os diferentes tipos de genótipos e a dosagem de TSH ($p=0,359$) e entre os genótipos dicotomizados e a dosagem de TSH ($p=0,166$). Ao analisar a variável IMC também não houve diferença significativa ao associar com os diferentes genótipos ($p=0,057$) e os genótipos dicotomizados ($p=0,808$) (Tabela 28).

Tabela 28 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 e P-valores das variáveis Tireoglobulina, TSH e IMC nos pacientes diagnosticados com CPT, conforme o genótipo do polimorfismo IL5 (-703 C/T).

<i>IL5</i> -703C/T	[Tireoglobulina] ng/mL			[TSH] uUI/mL			IMC		
	P 25	Mediana	P 75	P 25	Mediana	P 75	P 25	Mediana	P 75
CC	0,77	1,80	3,00	55,90	110,30	136,13	24,34	25,24	28,13
CT	3,08	5,58	31,99	14,27	71,96	95,42	23,24	23,83	30,80
TT	0,26	0,53	97,80	12,56	41,78	84,64	30,48	33,30	33,69
p valor		0,066 ^a			0,359 ^a			0,057 ^a	
CC	0,77	1,80	3,00	55,90	110,30	136,13	24,34	25,24	28,13
CT+TT	1,02	5,43	31,99	14,27	65,91	95,42	23,63	28,35	31,71
p valor		0,194 ^b			0,166 ^b			0,808 ^b	

Legenda: a=Teste H de Kruskal-Wallis; b=Teste U de Mann-Whitney. Valores de referência: Tireoglobulina <10ng/ml; TSH <4,5µUI/ml.

Fonte: própria autora.

A Tabela 29 descreve a relação da variante genética *IL5* (-703 C/T) e a concentração de antitireoglobulina nos pacientes diagnosticados com CPT dicotomizados quanto ao genótipo (CC e CT+TT), além de seu sexo e da dose de fármaco administrada. Acerca da concentração de antitireoglobulina, 5 participantes diagnosticados com CPT com genótipo CC (71,4%) obtiveram uma concentração <20UI/ML contra 13 (86,7%) dos indivíduos com genótipo CT+TT ($p=0,378$). Verificou-se ainda que 5 indivíduos (45,5%) diagnosticados com CPT e do genótipo CC eram do sexo feminino contra 14 (73,7%) dos indivíduos do mesmo sexo e com genótipo CT+TT ($p=0,125$). Com relação a dose de radiofármaco administrada, 11 pacientes (100%) que apresentaram o genótipo CC, receberam doses ≤ 150 mCi contra 15 (78,9%) dos pacientes com genótipo CT+TT que receberam a mesma dose ($p=0,014$). Vale ressaltar que não houve diferença estatística entre os grupos genéticos e as variáveis estudadas.

Tabela 29 - Estudo da associação entre a distribuição da antitireoglobulina (UI/mL), sexo e dose administrada (mCi) do radiofármaco nos pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo *IL5* (-703 C/T).

		IL5 -703C/T						
		CC		CT+TT		P	OR	IC (OR)
		N	%	N	%			
Antitireoglobulina (UI/mL)	<20	5	71,4%	13	86,7%			
	>20	2	28,6%	2	13,3%	0,378	0,38	0,04-3,52
	Total	7	100,0%	15	100,0%			
Sexo	F	5	45,5%	14	73,7%			
	M	6	54,5%	5	26,3%	0,125	0,29	0,06-1,42
	Total	11	100,0%	19	100,0%			
Dose administrada (mCi)	<150	11	100,0%	15	78,9%			
	>150	0	0,0%	4	21,1%	0,140	NA	NA
	Total	11	100,0%	19	100,0%			

Legenda: Teste exato de Fisher; OR= Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança; N/A=não se aplica. Valores de referência: Antitireoglobulina <4,00 UI/ml

Fonte: própria autora.

A tabela 30 demonstra o estadiamento TNM dos pacientes diagnosticados com CPT conforme os genótipos do polimorfismo *IL5* (-703 C/T). Observa-se que 3 (60%) indivíduos com genótipo CC apresentavam estadiamento T1+T2 contra 5 (55,6%) dos indivíduos com genótipo CT+TT ($p=0,657$). Avaliando as metástases em linfonodos regionais, nenhum participante com genótipo CC apresentava tais metástases (N0), contra 1 (16,7) indivíduo com genótipo CT+TT ($p=0,667$). Quanto à metástase (M), observou-se que em ambos genótipos apenas 1 (100%) indivíduo apresentou metástases a distância ($p=0,999$). Portanto, não foi observada diferença estatística entre a variável estadiamento TNM e os diferentes genótipos em estudo.

Tabela 30 - Estudo da associação entre o estadiamento TNM e pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo *IL5* (-703 C/T).

		IL5 -703C/T				P	OR	IC (OR)
		CC		CT+TT				
		N	%	N	%			
T	T1+T2	3	60	5	55,6	0,657	1,2	0,13-11,05
	T3+T4	2	40	4	44,4			
	Total	5	100	9	100			
N	N0	0	0	1	16,7	0,667	NA	NA
	N1	3	100	5	83,3			
	Total	3	100	6	100			
M	M0	0	0	0	0	0,999	NA	NA
	M1	1	100	1	100			
	Total	1	100	1	100			

Legenda: Teste Exato de Fisher; N/A=não se aplica; OR= Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança.

Fonte: própria autora.

4.6 RESULTADOS DAS ANÁLISES MOLECULARES DO GENE *IL12B* (+1188 A/C) região não traduzida, rs3212227

A análise genotípica dos grupos caso e controle pode ser observada na Tabela 31, na qual 15 (50%) indivíduos do grupo caso, diagnosticados com carcinoma papilífero da tireoide, apresentaram genótipo AA, enquanto que no grupo controle 16 (53,3%) indivíduos apresentaram genótipo AC, não observando diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p=0,180$). Analisando a os genótipos dicotomizados nota-se que 15 (50%) dos indivíduos do grupo caso apresentaram genótipo AA e 15 (50%) participantes do mesmo grupo apresentaram pelo menos um alelo mutado de forma heterozigota (AC) ou homozigota (CC), enquanto que no grupo controle 22 (73%) indivíduos apresentaram pelo menos um alelo mutado, não observando diferença estatística entre os dados ($p=0,630$; $OR=2,75$; $IC=0,93-8,10$).

Tabela 31 - Distribuição genotípica do polimorfismo *IL12B* (+1188 A/C) nos grupos caso e controle.

	Grupos				p	OR (IC)
	CPT		Controle			
	n	%	n	%		
AA	15	50,0	8	26,7	0,180	NA
AC	11	36,7	16	53,3		
CC	4	13,3	6	20,0		
TOTAL	30	100,0	30	100,0		
AA	15	50,0	8	26,7	0,630	2,75 (0,93-8,10)
AC+CC	15	50,0	22	73,3		
TOTAL	30	100,0	30	100,0		

Legenda: Teste Qui quadrado; N/A=Não se aplica; OR= Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança.

Fonte: própria autora.

Ao relacionar os três diferentes genótipos estudados com características clínicas como tireoglobulina, TSH e IMC, não foram encontradas diferenças estatísticas (0,535, 0,431,0,654; respectivamente) (Tabela 32).

Tabela 32 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 e P-valores das variáveis Tireoglobulina, TSH e IMC nos pacientes diagnosticados com CPT, conforme o genótipo do polimorfismo *IL12B* (+1188 A/C).

<i>IL12B</i> +1188 A/C (rs3212227)	[Tireoglobulina] ng/mL			[TSH] uUI/mL			IMC		
	P25	Mediana	P75	P25	Mediana	P75	P25	Mediana	P75
AA	0,52	3,64	31,99	27,98	103,36	128,57	23,67	26,64	31,61
AC	1,63	5,43	9,00	14,27	71,96	77,90	24,25	26,26	30,80
CC	0,59	1,06	3,08	7,46	51,44	95,42	22,22	24,01	29,04
p valor	0,535 ^a			0,431 ^a			0,654 ^a		
	[Tireoglobulina] ng/mL			[TSH] uUI/mL			IMC		
	P25	Mediana	P75	P25	Mediana	P75	P25	Mediana	P75
AA	0,52	3,64	31,99	27,98	103,36	128,57	23,67	26,64	31,61
AC+CC	1,06	3,04	8,09	7,46	71,96	95,42	23,83	25,24	30,80
p valor	0,886 ^b			0,211 ^b			0,914 ^b		

Legenda: a=Teste H de Kruskal-Wallis; b=Teste U de Mann-Whitney. Valores de referência: Tireoglobulina <10 ng/ml; TSH <4,5µUI/ml.

Fonte: própria autora.

Avaliando a ausência de mutação (AA) e a presença da mutação em pelo menos um alelo (AC+CC) nos pacientes diagnosticados com CPT e relacionando com concentração de antitireoglobulina, sexo e dosagem administrada de radiofármaco, foi possível observar que a concentração de antitireoglobulina foi <20 UI/mL em 9 (81,8%) dos pacientes com genótipo AA o que também foi visualizado em 9 (81%) dos pacientes com genótipo AC+CC ($p=0,999$; OR=1; OR=0,11-8,73). Nota-se que 9 (81,8%) dos diagnosticados com CPT com genótipo AA eram do sexo feminino, enquanto que 10 (66,7) mulheres apresentaram genótipo AC+CC ($p=0,705$; OR= 0,75; IC=0,16-3,32). Com relação a dose de radiofármaco administrada, 11 (73,3%) pacientes que apresentaram genótipo AA receberam doses ≤ 150 mCi enquanto que 4 (26,7%) pacientes com o mesmo genótipo receberam dose >150 mCi. Nas três características estudadas, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (Tabela 33).

Tabela 33 - Estudo da associação entre a distribuição da antitireoglobulina (UI/mL), sexo e dose administrada (mCi) do radiofármaco nos pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo *IL12B* (+1188 A/C).

<i>IL12B</i> +1188 A/C (rs3212227)		AA		AC+CC		p	OR	IC (OR)
		n	%	n	%			
Antitireoglobulina (UI/mL)	<20	9	81,8%	9	81,8%	0,999	1,00	(0,11-8,73)
	>20	2	18,2%	2	18,2%			
	Total	11	100,0%	11	100,0%			
Sexo	F	9	60,0%	10	66,7%	0,705	0,75	(0,16-3,32)
	M	6	40,0%	5	33,3%			
	Total	15	100,0%	15	100,0%			
Dose administrada (mCi)	≤150	11	73,3%	15	100,0%	0,267	NA	NA
	>150	4	26,7%	-	-			
	Total	15	100,0%	15	100,0%			

Legenda: Teste Qui-quadrado; OR= Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança. Valores de referência: Antitireoglobulina <4,00 UI/ml

Fonte: própria autora.

Ao se avaliar os diferentes estadiamentos do carcinoma papilífero da tireoide e associar com a ausência (AA) ou presença de mutação em pelo menos um alelo (AC+CC) nota-se que 4 (66,7%) indivíduos com genótipo AA apresentaram estadiamento T3+T4 contra 2 (25,0%) indivíduos com genótipo AC+CC e o mesmo estadiamento ($p=0,119$). Avaliando-se o estadiamento N, 5 (100,0%) dos indivíduos com genótipo AA apresentaram estadiamento N1 contra 3 (75,0%) dos indivíduos com genótipo AC+CC e também estadiamento N1 ($p=0,236$). Apenas 2 indivíduos diagnosticados com carcinoma papilífero de tireoide apresentaram estadiamento M1, e esses possuíam genótipo AC+CC (Tabela 34).

Tabela 34 - Estudo da associação entre o estadiamento TNM e pacientes diagnosticados com CPT conforme o genótipo do polimorfismo *IL12B* (+1188 A/C).

		IL12B +1188 A/C (rs3212227)				
		AA		AC+CC		p
		n	%	n	%	
T	T1+T2	2	33,3	6	75,0	0,119
	T3+T4	4	66,7	2	25,0	
N	N0	-	0,0	1	25,0	0,236
	N1	5	100,0	3	75,0	
M	M0	-	0,0	-	-	NA
	M1	-	0,0	2	100,0	

Legenda: Teste Qui-quadrado; N/A=não se aplica.

Fonte: própria autora.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre a presença do alelo G no polimorfismo do gene *BAX* (-248 G/A) e a ocorrência de câncer de tireoide, sendo o alelo G mais comum entre os grupos ($p=0,009$). Ao se dicotomizar os genótipos considerando a presença de G nos dois alelos (GG) e a presença do alelo A em pelo menos um alelo (GG+GA) e associar com os grupos caso (CPT) e controle, nota-se que 18 (60%) dos indivíduos com genótipo GG eram do grupo caso contra 67 (82,7%) dos indivíduos com genótipo GG do grupo controle ($p=0,012$), demonstrando um fator de proteção dos indivíduos com genótipo GG para a ocorrência de Carcinoma Papilífero de Tireoide.

Mirmajidi (2016)⁴⁸, realizando uma análise polimórfica do gene *BAX* -248G/A em uma amostra de pacientes com câncer gástrico, observou que o alelo G foi mais frequente entre o grupo caso e o grupo controle, sendo que tal polimorfismo pode afetar a expressão da proteína BAX. Em tal estudo foi realizada uma análise *in silico* demonstrando que a alteração gênica estudada removeu o fator de transcrição Proteína de Especificade 1 (SP1) em amostras com genótipo AA, afetando a expressão do gene na célula.⁴⁸

Em um estudo indiano sobre o câncer ovariano e a presença de polimorfismo do gene *BAX* (-248 G/A), foi encontrada uma associação e um aumento de risco em indivíduos com o genótipo AA e a ocorrência do câncer ovariano (ORs = 4.1, 95 %, CI = 1.23–13.97).⁸²

A proteína BCL2 promove a sobrevivência celular ao inibir a morte celular programada ou apoptose. Uma variedade de carcinomas quimiorresistentes, incluindo câncer ovariano, câncer uterino, câncer de mama e câncer gástrico, expressam BCL2, sugerindo que BCL2 pode interferir com uma variedade de agentes citotóxicos.⁸³

Peng e colaboradores⁴⁵ (2015) em um estudo caso-controle de associação do polimorfismo *BCL2* (128 G/A) realizado com 235 pacientes diagnosticados com câncer de pulmão de células pequenas inoperáveis (estágio III/IV) em Chongqing, China, observou que 129 (54,9%) dos pacientes de sua pesquisa apresentaram o genótipo GG enquanto que 87 (37%) e 19 (8,1%) apresentaram os genótipos GA e AA, respectivamente. Lima e colaboradores (2020)⁷⁹ em um estudo do tipo caso-controle realizado com 158 participantes no Distrito Federal, Brasil, analisaram a associação

do polimorfismo *BCL2* (128 G/A) e a ocorrência de Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico, os autores encontraram que 69 (88,5%) dos pacientes diagnosticados com AVEH possuíam genótipo GG, enquanto que 9 (11,5%) e 0 (0%) apresentaram genótipo GA e AA, respectivamente. Tais estudos demonstram a prevalência do genótipo GG sobre os demais genótipos tanto na população chinesa quanto na brasileira, tal fato se comprova no presente estudo, no qual 30 (100%) do grupo caso e do grupo controle possuíam genótipo GG, Ala43Ala.

O catabolismo da Monoamina oxidase A (MAOA) contribui para o estresse oxidativo, essencial para a carcinogênese, como no câncer de próstata. White e colaboradores (2012)⁵⁷ afirmam que o polimorfismo *MAOA* uVNTR influencia a expressão e atividade do gene podendo afetar a suscetibilidade ao câncer de próstata. Em seu estudo caso-controle foi avaliado tal polimorfismo em residentes caucasianos e afro-americanos de King County, Washington, Estados Unidos da América, demonstrando que os dois alelos mais comuns foram os de 3 e 4 repetições, que juntos representaram aproximadamente 90,7% dos genótipos controle e 92% dos genótipos do grupo caso.

As variantes alélicas *MAOA* uVNTR no presente estudo foram 2R, 3R, 4R e 5R e os genótipos encontrados foram 2R/4R, 3R@ (homozigoto feminino 3R/3R ou hemizigoto masculino 3R*), 3R/4R, 3R/5R, 4R@ (homozigoto feminino 4R/4R ou hemizigoto masculino 4R*) e 5R@ (homozigoto feminino 5R/5R ou hemizigoto masculino 5R*). Assim como o estudo de White et al. (2012)⁵⁷, 3R e 4R foram os genótipos mais comuns nos grupos controle e caso, em seu trabalho a frequência genotípica foi de 20% para 3R@ (n=12), 26,7% para 3R/4R (n =16) e 40% para genótipos 4R@ (n=24).

Devido às controvérsias em torno da atividade/efeito dos alelos 2R e 5R na função e transcrição da *MAOA* e sua baixa frequência na amostra do estudo, todas as análises posteriores foram feitas em relação aos genótipos 3R@, 3R/4R e 4R@. Não foi detectada diferença significativa entre a distribuição genotípica dos grupos de pesquisa ($p=0,629$) e nem ao avaliar os genótipos dicotomizados (4R@ vs. 3R@+3R/4R) ($p=0,392$).

A IL-1 β sinaliza através da ligação ao receptor IL-1R1, que é amplamente expresso em várias populações de leucócitos e frequentemente em tecidos epiteliais. Os efeitos fisiológicos incluem a expansão dos progenitores hematopoiéticos, a regulação da hematopoiese de emergência e a sobrevivência prolongada de neutrófilos e monócitos-macrófagos. A relevância oncológica da sinalização de IL-1 β foi recentemente demonstrada em camundongos deficientes em IL1 β , que mostraram inibição do crescimento tumoral em várias entidades tumorais e mantiveram imunidade antitumoral. A sinalização de IL-1 β impulsiona a carcinogênese por vários mecanismos, incluindo inflamação sustentada com recrutamento preferencial de macrófagos e neutrófilos, angiogênese e imunossupressão.⁸⁴

Lurje e colaboradores (2023)⁸⁵ em um estudo sobre Polimorfismos genéticos da interleucina-1 β (rs1143634) e interleucina-8 (rs4073) associados à sobrevivência após ressecção de colangiocarcinoma intra-hepático observaram que a genotipagem para IL-1B C+3954 T (rs1143634) foi bem-sucedida em 112/112 pacientes (100%), com 65% (73/112) homozigotos para o alelo C (C/C), 28% (31/112) heterozigotos (C/T) e 7% (8/112) homozigotos para o alelo T (T/T), correspondendo às frequências alélicas de C=0,790 e T=0,210 e, portanto, com grande semelhança com as frequências alélicas de referência nas populações europeias, que são C=0,763 e T=0,237.⁸⁶

No presente estudo, ao analisar o polimorfismo *IL1B* (+3954 C/T) e sua distribuição genotípica CC, CT e TT entre os diferentes grupos caso e controle, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p=0,297$), ao se dicotomizar os genótipos CC e CT+TT também não foi possível encontrar diferença estatística ($p=0,191$).

IL-5 é uma citocina responsável pelo recrutamento, proliferação, maturação e ativação de eosinófilos, aumentando a adesão e migração de eosinófilos. Gitto e colaboradores (2020)⁸⁷ afirmam que a IL-5 estimula a diferenciação e o crescimento de linfócitos B e pode estimular os mastócitos, aumentando sua produção de citocinas pró-tumorais e pró-fibróticas, incluindo TNF- α , IL-13 e granulócitos, bem como fator estimulador de colônias de macrófagos (GM-CSF).

Erdei e colaboradores (2010) em seu estudo com base em experiências *in vitro*, afirmam que granulócitos eosinófilos, pré-tratados com IL-5 antes da interação com o tumor ou com as células endoteliais, ligaram-se agressivamente às células

endoteliais, evitando assim a fixação do tumor. Tais descobertas levantam a possibilidade de que o nível aumentado de IL-5 detectado possa representar um sinal molecular para os granulócitos eosinófilos, atraindo-os para as células cancerígenas, levantando a possibilidade do potencial dos granulócitos eosinófilos para futuras investigações terapêuticas.⁸⁸

No presente trabalho ao estudar o polimorfismo *IL5* (-703 C/T) associado ao CPT não foi possível observar diferenças estatísticas ao avaliar os diferentes genótipos e os grupos caso e controle ($p=0,273$).

A interleucina 12 é considerada um fator de risco para câncer, Kong e colaboradores (2020) em uma revisão sistemática avaliaram cinco estudos asiáticos (China e Índia), um africano (Egito) e um Norte Americano (América), quanto ao polimorfismo *IL12B* (+1188 A/C) e sua distribuição genotípica em uma amostra de pacientes com hepatocarcinoma, notando que ao se comparar os genótipos AA *versus* AC+CC foram encontrados em todos os estudos 2.337 indivíduos do grupos caso e 3.362 do grupo controle, tendo diferença estatística ($p=0,003$) entre os diferentes grupos genotípicos.⁸⁹

No presente estudo, ao se analisar o polimorfismo *IL12B* (+1188 A/C) e sua distribuição genotípica entre os diferentes grupos, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa, possivelmente devido ao número amostral ser menor que nos demais estudos da literatura.

Além disso, um estudo retrospectivo dos prontuários de pacientes que realizaram a tireoidectomia em um Hospital público de referência em Oncologia no Estado de São Paulo no período de 2009 a 2010, observou entre outros fatores o IMC (razão do peso pela altura do paciente elevada ao quadrado) e ao avaliar o IMC dos participantes da pesquisa notou-se um aumento na proporção de pacientes com câncer bem diferenciado de tireoide pode ser observado com o aumento do IMC, mas sem diferença estatística.⁶⁰

No presente estudo pode-se observar que a mediana da variável IMC também não teve diferença estatisticamente significativa ao se avaliar os diferentes genótipos do estudo nos diferentes polimorfismos: *BAX* (-248 G/A) ($p= 0,460$), *MAOA* uVNTR ($p=0,999$), *IL1-B* ($p=0,654$), *IL5* ($p=0,057$) *IL12B* (+1188 A/C) ($p=0,654$).

Ao se avaliar a susceptibilidade ao câncer, Feng e colaboradores (2018) em um estudo de revisão sistemática afirmam que a associação entre o gene *BAX* e tal

susceptibilidade tem sido estudada, contudo a maioria dos estudos avaliados demonstrou que o polimorfismo do gene *BAX* não está relacionado à susceptibilidade ao câncer. Entretanto, os autores afirmam que mesmo com análises estatisticamente insignificantes não foi possível ignorar a interação entre a ocorrência do câncer com outros genes como *TP53* e *BCL2*.⁵¹

Marcadores tumorais são moléculas presentes nos tumores, um marcador biológico ideal deve ser específico e sensível para que os tipos de tumor possam ser mais facilmente identificados e sua gravidade e estadiamento caracterizados. A glândula Tireoide é controlada pelo TSH produzido pela hipófise com finalidade de estimular a tireoide a produzir T3 e T4⁹⁰. Figuera e colaboradores (2015) revisaram retrospectivamente os prontuários médicos de 622 pacientes com bócio uni multi-nodular, observando que TSH > 1,64 mU/L persiste como fator de risco para malignidade, independentemente de outras variáveis. Pacientes com lesão folicular apresentaram níveis mais altos de TSH em comparação com pacientes com diagnóstico citológico benigno sendo concluído que níveis séricos elevados do TSH, têm sido associados com maior agressividade do câncer de tireoide e maior risco de nódulos malignos de tireoide.⁹¹

O presente estudo apresentou a dosagem de TSH em relação aos diferentes tipos de genótipos do polimorfismo *BAX* (-248 G/A), sendo a mediana 77,90; 71,96 e 68,57 µUI/mL para os genótipos GG, GA e AA, respectivamente (p=0,973). Avaliando o polimorfismo *BCL2* (128 G/A) também é notado um alto valores quanto à mediana de TSH associado ao genótipo Ala43Ala (76,65 µUI/mL), não sendo possível avaliar estatisticamente devido à ausência de outros genótipos no grupo, também foram observados altos valores relacionados à mediana de TSH no estudo do polimorfismo *MAOA uVNTR*, sendo que para o genótipo 3R@+3R/4R foi 76,65 µUI/mL e para o genótipo 4@ 77,90 µUI/mL (p=0,824). Avaliando o polimorfismo *IL1B* (+3954 C/T) pode-se observar a mediana dos genótipos CC (77,90 µUI/mL), CT (60,91 µUI/mL) e TT (116,72 µUI/ml) (p=0,378), quanto ao polimorfismo *IL5* (-703 C/T) observou-se para o genótipo CC (110,30 µUI/ml), CT (71,96 µUI/ml) e TT (41,78 µUI/ml) (p=0,359) e para o polimorfismo *IL12B* (+1188 A/C) avaliou-se o TSH dos genótipos AA (103,36 µUI/mL), AC (71,96 µUI/mL) e CC (51,44 µUI/mL) (p=0,431). A observação de tais valores altos para a concentração de TSH pode ser explicado devido à terapia com ¹³¹I dos pacientes que era precedida pela suspensão da levotiroxina utilizada, não necessariamente sendo um pior prognóstico.

Gudmundsson e colaboradores (2009) para pesquisar variantes de sequência que conferem risco de câncer de tireoide, realizaram um estudo de associação caso e controle na Islândia, seguido por um estudo de replicação em indivíduos de descendência europeia. Demonstrando duas variantes comuns associadas à doença, o gene FOXE1 (TTF2) e NKX2-1 (TTF1). Ambas as variantes contribuíram para um risco aumentado de câncer de tireoide papilar e folicular. Aproximadamente 3,7% dos indivíduos foram homozigotos para ambas as variantes, e seu risco estimado de câncer de tireoide aumentou em 5,7 vezes quando comparada a não portadores. Diferente dos demais estudos, os autores ainda afirmam que ambos os alelos de risco estão associados a baixas concentrações de hormônio TSH e o gene FOXE1 (TTF2) está associado a baixa concentração de tiroxina (T4) e alta concentração de triiodotironina (T3).⁹²

A tireoglobulina é uma glicoproteína de alto peso molecular sintetizada exclusivamente pelas células foliculares. Portanto, é utilizado como um marcador altamente sensível para detectar a presença de câncer de tireoide além da presença de metástases. Seus níveis devem ser indetectáveis em pacientes normais ou com tireoidectomia total.⁹³

Os anticorpos antitireoglobulina são produzidos por células do sistema imunológico, principalmente linfócitos, que respondem aos autoantígenos da tireoide e invadem gradualmente a glândula tireoide. A incidência de anticorpos antitireoglobulina é aproximadamente duas vezes mais alta em pacientes com câncer diferenciado de tireoide, especialmente no carcinoma papilífero da tireoide quando comparado a população geral, sugerindo uma associação entre doença autoimune da tireoide e carcinoma diferenciado da tireoide.⁹⁴

A radiação ionizante emitida pelo radiofármaco ¹³¹I ativa fatores pró e antiinflamatórios, altera o equilíbrio homeostático entre sobrevivência e morte celular e afeta fatores envolvidos na regulação gênica e na progressão do ciclo celular, podendo causar inflamação e indução de morte celular.³⁶

O iodo radioativo é utilizado como forma de complementar a tireoidectomia, afim de realizar ablação das células remanescentes. O ¹³¹I atua entrando nas células da tireoide por meio dos transportadores de iodeto de sódio emitindo raios beta de ondas curtas, levando à morte celular. Doses administradas de radioiodo de 100 mCi são usadas em pacientes de risco baixo ou intermediário (que fazem diálise e/ou

apresentam linfonodos comprometidos), doses de 150 mCi são indicadas para pacientes de médio risco e 200 mCi para pacientes de alto risco.³¹

Gontijo e colaboradores (2022)⁷⁶ em um estudo de associação do polimorfismo genético da Cromogranina A (Glu264Asp) em pacientes diagnosticados com câncer de tireoide não observou associação entre tal polimorfismo e as concentrações de antitireoglobulina nem com as doses administradas de iodo radioativo, pois não houve diferença estatística significativa entre os diferentes genótipos.

No presente estudo, observou-se que não há associação entre o polimorfismo do gene *BAX* (-248 G/A) com concentrações de antitireoglobulinas ($p=0,616$) e de doses administradas de iodo radioativo ($p=0,622$), uma vez que, não houve diferença estatística significativa entre os diferentes genótipos dos pacientes com CPT, tal ausência de diferença estatística também foi observada nos demais polimorfismos deste estudo ao se analisar antitireoglobulina *MAOA* uVNTR ($p=0,594$), *IL1B* (+3954 C/T) ($p=0,551$), *IL5* (-703 C/T) ($p=0,378$), *IL12B* (+1188 A/C) ($p=0,999$) e ao analisar a variável dose administrada *MAOA* uVNTR ($p=0,573$), *IL1B* (+3954 C/T) ($p=0,551$), *IL5* (-703 C/T) ($p=0,140$), *IL12B* (+1188 A/C) ($p=0,267$).

Liu e colaboradores (2018)⁹⁵ analisaram polimorfismos genéticos como forma de contribuição para toxicidade induzida por ¹³¹I em pacientes com câncer diferenciado de tireoide e encontraram associações entre os SNPs selecionados e dor cervical induzida por radiação para sexo, idade, IMC, tipo patológico, estágio TNM e dose de ¹³¹I, revelando que os polimorfismos *TNF α* (rs1800629), *ATM* (rs11212570), *NF-k β* (rs230493) e *TGF- β* (rs1800469) e (rs2241716) foram significativamente associados com dor de garganta induzida por radiação após o tratamento com ¹³¹I. De forma distinta, neste estudo ao se analisar as diferentes doses de ¹³¹I, ≤ 150 mCi e >150 mCi, associadas aos genótipos dos polimorfismos estudados não obteve-se diferença estatisticamente significativa *BAX* (-248 G/A) ($p=0,622$), *IL1B* (+3954 C/T) ($p=0,176$), *IL5* (-703 C/T) ($p=0,140$), *IL12B* (+1188 A/C) ($p=0,267$) e *MAOA* uVNTR ($p=0,488$).

Kelly e colaboradores (2019)⁹⁶ em um estudo retrospectivo observacional incluíram 1093 pacientes tratados com carcinoma diferenciado de tireoide entre 1995 e 2010, sendo a tireoidectomia realizada em todos os pacientes incluídos no estudo e observou-se que as mulheres (78%) eram predominantes no estudo. Os autores ainda afirmam que o carcinoma papilar de tireoide foi o mais frequente (88%) e o

estadiamento T1 presente em 55,8%, T2 em 19,4%, T3 em 22,1% e T4 2,4% dos casos avaliados. A presença de metástases a distância foi observada em 3,1% dos participantes da pesquisa.

No presente estudo foi encontrado que o sexo biológico não se correlacionou com o polimorfismo *MAOA uVNTR* ($p = 0,148$; Tabela 18), mesmo com mais pacientes do sexo feminino com CPT com pelo menos um alelo 3R ($n = 10$; 76,9%) do que do sexo masculino ($n = 3$; 23,1%), também não foi vista diferença estatística quanto ao sexo nos polimorfismos *BAX* (-248 G/A) ($p=0,438$), *IL1B* (+3954 C/T) ($p=0,452$), *IL5* (-703 C/T) ($p=0,125$), *IL12B* (+1188 A/C) ($p=0,705$).

Feng e colaboradores (2018)⁵¹ em uma metanálise a respeito do polimorfismo *BCL2* (128 G/A) associado a diferentes tipos de câncer como: câncer de mama, leucemia linfocítica crônica, melanoma câncer de ovário e câncer gástrico, observaram em três estudos que a análise de AA + GA *versus* GG de tal polimorfismo estava relacionado a uma piora na sobrevida do paciente ($p=0,000$, OR=1,73, IC=1,38-2,20), indicando que o indivíduo que possui pelo menos um alelo variante tem um impacto negativo na sua sobrevida.

Tal fato não pôde ser observado no presente estudo, ao se analisar o estadiamento dos participantes quanto às análises do polimorfismo *BCL2* (128 G/A) todos possuíam genótipo GG, no qual os dois alelos codificavam o aminoácido Alanina, não havendo diferença estatística entre os dados, também não sendo observada diferença estatística ao se analisar o estadiamento TNM nos polimorfismos *BAX* (-248 G/A) T ($p=0,999$), N ($p=0,222$); *IL1B* (+3954 C/T) T ($p=0,233$), N ($p=0,111$), M ($p=0,999$); *IL5* (-703 C/T) T ($p=0,657$), N ($p=0,0667$), M ($p=0,999$); e *IL12B* (+1188 A/C) T ($p=0,119$) e N ($p=0,236$).

Ao analisar o polimorfismo *MAOA uVNTR* a presença do alelo 3R parece estar associada à gravidade da patogênese do CPT. Estudando a influência do polimorfismo *MAOA uVNTR* no estadiamento TNM em pacientes com CPT, a presença de pelo menos um alelo 3R foi associada a um tumor maior (estadiamento T3+T4) ($p=0,018$). Por outro lado, 77,8% ($n= 7$) dos pacientes com PTC com genótipo 4R@ encontravam-se no estadiamento T1+T2 (Tabela 19).

No presente estudo foi realizada a dosagem da IL-1 β dos pacientes diagnosticados com CPT em diferentes momentos da pesquisa, antes da iodoterapia com o radiofármaco I131 e após o tratamento, tais valores foram associados com os diferentes genótipos do grupo caso e também comparados com o grupo controle. Nas

análises foi possível verificar uma elevação considerável dos níveis de IL-1 β do grupo caso quando comparado ao grupo controle independente do momento (antes ou após a iodoterapia) e ainda foi possível avaliar diferenças estatísticas na dosagem de IL-1 β do grupo caso antes e após o tratamento quando avaliados os genótipos CC ($p < 0,001$) e TT ($p < 0,001$), quando comparados ao grupo controle.

Pessoa e colaboradores (2022)⁹⁷ em um estudo de associação do polimorfismo da *IL1B* -511 em uma população diagnosticada com CPT do Distrito Federal ao avaliar a diferença das médias dos níveis da citocina nos diferentes genótipos e em diferentes momentos do estudo (antes e pós a iodoterapia) verificou diferença estatística apenas no nível sérico de IL-1 β após o tratamento com radiofármaco, sendo que o genótipo CC foi associado à maior produção média da citocina sérica.

6 CONCLUSÕES

Este estudo é pioneiro na análise dos polimorfismos *BAX* (-248 G/A), *BCL-2* (128 G/A), *MAOA* uVNTR, *IL1B* (+3954 C/T), *IL5* (-703 C/T), *IL12B* (+1188 A/C) associados ao Carcinoma Papilífero de Tireoide em uma amostra do Distrito Federal, Brasil. O estudo concluiu que quanto a presença do alelo G no polimorfismo do gene *BAX* (-248 G/A) e a ocorrência de câncer de tireoide, o alelo G é mais comum entre os grupos ($p=0,009$) e, ao se analisar os genótipos dicotomizados, o genótipo GG é um fator de proteção para a ocorrência do Carcinoma Papilífero de Tireoide ($p=0,012$; OR= 0,313; IC=0,123-0,794). Contudo ao se avaliar os diferentes genótipos e as características clínicas não foi observada associação com os níveis de tireoglobulina, TSH, IMC, antitireoglobulina, sexo, dose administrada de radiofármaco (^{131}I) e o estadiamento do tumor.

Estudando o polimorfismo *BCL2* (128 G/A), que envolve a inserção do códon ACC ao invés do códon GCC, gerando uma troca de aminoácido relevante na proteína, treonina por alanina na posição 43 da proteína (Thr43Ala), observou-se que os 30 (100%) dos indivíduos do grupo caso e do grupo controle possuíam genótipo GG, Ala43Ala, não sendo possível calcular diferenças estatística entre o genótipo e as características clínicas estudadas.

Ao se analisar o polimorfismo *MAOA* uVNTR no CPT os alelos encontrados foram 2R, 3R, 4R e 5R, e os genótipos mais frequentes foram 3R@ (homozigoto feminino 3R/3R ou hemizigoto masculino 3R*; $n=12$, 20%), 3R/4R ($n=16$, 26,7%) e 4R@ (homozigoto feminino 4R/4R ou hemizigoto masculino 4R*; $n=24$, 40%). Não foi encontrada diferença significativa entre o genótipo dos grupos caso e controle nem a distribuição de frequência 4R@ vs. 3R@+3R/4R. O polimorfismo *MAOA* uVNTR também não influenciou os níveis de tireoglobulina, hormônio estimulador da tireoide e antitireoglobulina ou seu índice de massa corporal, sexo e dose administrada de radiofármaco (^{131}I). No entanto, ao analisar o polimorfismo no estadiamento TNM do PTC, o alelo 3R parece associar-se à gravidade da patogênese do CPT, uma vez que a presença de pelo menos um alelo 3R foi associada a maior tamanho do tumor (estadiamento T3+T4) e 77,8% ($n= 7$) dos pacientes com CPT do genótipo 4R@ foram categorizados no estadiamento T1+T2 ($p=0,018$).

No presente estudo, ao analisar o polimorfismo *IL1B* (+3954 C/T) e sua distribuição genotípica CC, CT e TT entre os diferentes grupos caso e controle, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p=0,297$), ao se dicotomizar os genótipos CC e CT+TT também não foi possível encontrar diferença estatística ($p=0,191$). Além de não ter sido encontrada associação entre o polimorfismo e as características clínicas avaliadas, os níveis de tireoglobulina, TSH, IMC, antitireoglobulina, sexo, dose administrada de radiofármaco (^{131}I) e o estadiamento do tumor.

Ao se analisar a dosagem da IL-1 β dos pacientes diagnosticados com CPT em diferentes momentos da pesquisa, antes e após a iodoterapia e associar com os diferentes genótipos do grupo caso e também comparar com o grupo controle foi possível verificar uma elevação considerável dos níveis de IL-1 β do grupo caso quando comparado ao grupo controle independente do momento (antes ou após a iodoterapia) e ainda foi possível avaliar diferenças estatísticas na dosagem de IL-1 β do grupo caso antes e após o tratamento quando avaliados os genótipos CC ($p<0,001$) e TT ($p<0,001$), quando comparados ao grupo controle.

Ao estudar o polimorfismo IL 5 (-703 C/T) associado ao CPT não foi possível observar diferenças estatísticas ao avaliar os diferentes genótipos e os grupos caso e controle ($p=0,273$), nem ao associar os genótipos com características clínicas, bem como o estudo do polimorfismo *IL12B* (+1188 A/C) não se obteve diferença estatisticamente significativa entre os genótipos e os grupos caso e controle ($p=0,180$), nem entre os genótipos e as diferentes características clínicas estudadas.

Avaliar associações genéticas com características clínicas de pacientes com diagnóstico de CPT pode auxiliar como um método promissor para diferenciar condições benignas de malignas da tireoide, além ser uma importante ferramenta para avaliar o diagnóstico, tratamento e prognóstico em pacientes diagnosticados com Carcinoma Papilífero da Tireoide. O potencial impacto deste estudo na expressão gênica ainda precisa ser elucidado, portanto, mais estudos de associação devem ser realizados para esclarecer se tais polimorfismos representam uma associação com a CPT.

REFERÊNCIAS

1. Salman FM, Abu-Naser SS. Thyroid Knowledge Based System. *Int J Acad Eng Res* [Internet]. 2019;3(5):11–20. Available from: www.ijeais.org/ijaer
2. Nilsson M, Fagman H. Development of the thyroid gland. *Development*. 2017;144(12):2123–40.
3. Samimi H, Atlasi R, Parichehreh-Dizaji S, Khazaei S, Akhavan Rahnema M, Seifirad S, et al. A systematic review on thyroid organoid models: time-trend and its achievements. *Am J Physiol Metab*. 2021;320(3):E581–90.
4. Filipović B, Šošić-Jurjević B, Ajdžanović V, Živanović J, Ristić N, Trifunović S M V. Filipovic 2017 Response of trabecular bone, thyroid C and follicular cells to synthetic salmon calcitonin in middle-aged orchidectomized male rats.pdf. *J Anat*. 2017;230(6):787–95.
5. Jabbar A, Pingitore A, Pearce SHS, Zaman A, Iervasi G, Razvi S. Thyroid hormones and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(1):39.
6. Carrazza LG. Hormônios tireoidianos, TSH, desempenho e qualidade de carcaça e carne em suínos imunocastrados alojados em diferentes sistemas de criação. 2012;
7. Citterio CE, Targovnik HM, Arvan P. The role of thyroglobulin in thyroid hormonogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(6):323–38.
8. Razvi S, Jabbar A, Pingitore A, Danzi S, Biondi B, Klein I, et al. Thyroid hormones and cardiovascular function and diseases. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71(16):1781–96.
9. Sebastião CK. Termografia como método auxiliar na identificação de nódulos de tireoide. Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2020.
10. Borges AK da M, Ferreira JD, Koifman S, Koifman RJ. Thyroid cancer in Brazil: a descriptive study of cases held on hospital-based cancer registries, 2000-2016. *Epidemiol e Serviços Saúde*. 2020;29:e2019503.
11. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*. 2014;74(11):2913–21.
12. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(10):569.
13. Valgôde FGS. Efeitos citogenético e dosimétrico do ¹³¹I em pacientes com câncer diferenciado da tireóide com e sem estimulação com r-hTSH. Estudo em células tumorais tireoidianas (WRO) tratadas com ¹³¹I e ⁶⁰Co in vitro. Universidade de São Paulo; 2015.
14. Cabanillas ME, McFadden DG, Durante C. Thyroid cancer. *Lancet* [Internet]. 2016;388(10061):2783–95. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30172-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30172-6)
15. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
16. Guignard R, Truong T, Rougier Y, Baron-Dubourdieu D, Guénel P. Alcohol drinking, tobacco smoking, and anthropometric characteristics as risk factors for thyroid cancer: a countrywide case-control study in New Caledonia. *Am J Epidemiol*. 2007;166(10):1140–9.

17. Vasconcelos R. Dia Mundial da Obesidade: Saúde prepara semana de atividades sobre o tema [Internet]. Ministério Da Saúde. 2021. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/dia-mundial-da-obesidade-saude-prepara-semana-de-atividades-sobre-o-tema>
18. Clavel-Chapelon F, Guillas G, Tondeur L, Kernaléguen C, Boutron-Ruault M. Risk of differentiated thyroid cancer in relation to adult weight, height and body shape over life: the French E3N cohort. *Int J Cancer*. 2010;126(12):2984–90.
19. Ferreira TD. Carcinoma anaplásico da tireoide. In: *Carcinoma anaplásico da tireoide*. 2019. p. 22.
20. Kitahara CM, Sosa JA. Understanding the ever-changing incidence of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2020;16(11):617–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41574-020-00414-9>
21. Kim J, Gosnell JE, Roman SA. Geographic influences in the global rise of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2020;16(1):17–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41574-019-0263-x>
22. INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Vol. 7. Janeiro – RJ; 2019. 45–46 p. Available from: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>
23. Rezende RB. Câncer de tireoide no Brasil: um estudo descritivo dos casos informados entre 2013-2020. *Res Soc Dev*. 2023;12(2):e6612239974–e6612239974.
24. INCA. Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. [Internet]. 2022. 2022. Available from: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>
25. Bernardo C. Portaria Nº7, de 3 de janeiro de 2014. 2014.
26. da Silva Mendes LF, de Araújo Neto AJ, de Sá Bezerra C, de Freitas Neto AP, Moreira JSD, Piauilino BCN, et al. Horizontes atuais da ultrassonografia na investigação de nódulos e câncer de tireoide. *Res Soc Dev*. 2022;11(12):e251111234565–e251111234565.
27. Granzotto LF, Rodrigues TL, Losso AC, Hanada TZB, Martins UK, Paliato M, et al. Carcinoma papilífero da tireoide, uma abordagem diagnóstica não usual: relato de caso. *Rev Med da UFC*. 2020;60(4):54–6.
28. Hess JR, Van Tassel DC, Runyan CE, Morrison Z, Walsh AM, Schafernak KT. Performance of ACR TI-RADS and the Bethesda System in Predicting Risk of Malignancy in Thyroid Nodules at a Large Children’s Hospital and a Comprehensive Review of the Pediatric Literature. *Cancers (Basel)*. 2023;15(15):3975.
29. Ali SZ, Cibas ES. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. Vol. 11. Springer; 2010.
30. Rosário PW, Ward LS, Carvalho GA, Graf H, Maciel RMB, Maciel LMZ, et al. Nódulo tireoidiano e câncer diferenciado de tireoide: Atualização do consenso brasileiro. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2013;57(4):240–64.
31. Nguyen QT, Lee EJ, Huang MG, Park YI, Khullar A, Plodkowski RA. Diagnosis and treatment of patients with thyroid cancer. *Am Heal drug benefits*. 2015;8(1):30.
32. INCA. Câncer [Internet]. Estadiamento. 2019 [cited 2021 Jun 28]. Available from: <https://www.inca.gov.br/estadiamento>
33. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolos

- clínicos e diretrizes terapêuticas em oncologia. Ministério Da Saúde [Internet]. 2014;1:356. Available from: <http://old.cremerj.org.br/publicacoes/148.PDF>
34. Mendes ACC, Viegas LC, Danziger LR, Gomes EV. Aspectos moleculares do carcinoma papilífero de tireoide. *Res Soc Dev*. 2023;12(2):e11812239986–e11812239986.
 35. Santos PA de L. Impacto dos níveis de TSH na qualidade de vida e na eficácia da radioiodoterapia em pacientes tireoidectomizados por câncer diferenciado da tireoide. Universidade Federal de Pernambuco; 2019.
 36. da Silva Pimenta Y, Colares WTHC, da Silva R do SM, de Arruda Reinehr T, Nunes GPS, Belém MADV, et al. Avaliação do perfil pós dose terapêutica com iodo-131 em pacientes da fcecon com carcinoma diferenciado de tireóide no período de 2012 a 2016. *Brazilian J Heal Rev*. 2020;3(4):7481–8.
 37. Moreira DC. Associação dos níveis séricos de TSH, obesidade e câncer de tireoide. Faculdade de Medicina de Marília; 2018.
 38. Rodrigues A, Gonçalves MD da C, Ferreira MAM, Veloso JG. Valor da dosagem da tireoglobulina no seguimento de pacientes com carcinoma diferenciado da tireóide submetidos à tireoidectomia parcial. *Rev Col Bras Cir*. 2002;29:25–8.
 39. Valente MF, Capela-Costa J. Carcinoma anaplásico da tiróide: tendências atuais e perspectivas futuras. *Rev Port Cir*. 2017;(41):29–39.
 40. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, 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*. 2016;26(1):1–133.
 41. Romero-Sánchez C, Gómez-Gutierrez A, Gómez PE, Casas-Gomez MC, Briceño I. C677t (rs1801133) MTFHR gene polymorphism frequency in a colombian population. *Colomb Med*. 2015;46(2):75–9.
 42. Örd T, Puurand T, Örd D, Annilo T, Möls M, Remm M, et al. A human-specific VNTR in the TRIB3 promoter causes gene expression variation between individuals. *PLoS Genet*. 2020;16(8):e1008981.
 43. Jiang P, Tang J, Shao Q, Cai Y. Interactive effect of BCL2 and BAX polymorphisms with cigarette smoking on the risk of non-small cell lung cancer: a case–control study in China. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2019;51(11):1178–81.
 44. Grivicich I, Regner A, da Rocha AB. Morte celular por apoptose. *Rev Bras Cancerol*. 2007;53(3):335–43.
 45. Peng Y, Wang L, Qing Y, Li C, Ren T, Li Q, et al. Polymorphisms of BCL2 and BAX genes associate with outcomes in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Sci Rep*. 2015;5(1):1–11.
 46. Uhliarova B, Hajtman A. Hashimoto's thyroiditis-an independent risk factor for papillary carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2018;84(6):729–35.
 47. Barillé-Nion S, Lohard S, Juin PP. Targeting of BCL-2 family members during anticancer treatment: a necessary compromise between individual cell and ecosystemic responses? *Biomolecules*. 2020;10(8):1109.
 48. Mirmajidi SH, Najafi M, Mirmajidi ST, Nasrabadi NN. Study of regulatory promoter polymorphism (-248 G> A) of Bax gene in patients with gastric cancer in the northern provinces of Iran. *Gastroenterol Hepatol from bed to bench*. 2016;9(1):36.
 49. Oliveira C de. Influência dos polimorfismos P53 ARG72PRO, MDM2 T309G,

- BCL2 C (-938) A e BAX G (-248) A, relacionados com apoptose celular, na susceptibilidade ao melanoma cutâneo= Influence of the polymorphisms P53 ARG72PRO, MDM2 T309G, BCL2 C (-938) A and BAX G (-248) . 2012;
50. Sun L, Wei L, Wei L, Li D. Correlation between Bax gene polymorphisms and esophagus cancer. *Oncol Lett*. 2018;16(6):7097–101.
 51. Feng Y, Chen X, Zheng Y, Liu Q, Chen H, Cai Y, et al. Prognostic value and susceptibility of BAX rs4645878 polymorphism in cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(29).
 52. Ghorbani F, Javadirad S-M, Amirmahani F, Fatehi Z, Tavassoli M. Associations of BCL2 CA-repeat polymorphism and breast cancer susceptibility in Isfahan Province of Iran. *Biochem Genet*. 2021;59(2):506–15.
 53. Liu Z, Sun R, Lü W, Dang C, Song Y, Wang C, et al. The-938A/A genotype of BCL2 gene is associated with esophageal cancer. *Med Oncol*. 2012;29(4):2677–83.
 54. Florczak-Wyspianska J, Rozycka A, Wolny L, Lianeri M, Kozubski W, Dorszewska J. Polymorphisms of COMT (c. 649G> A), MAO-A (c. 1460C> T), NET (c. 1287G> A) Genes and the Level of Catecholamines, Serotonin in Patients with Parkinson's Disease. *DNA Cell Biol*. 2017;36(6):501–12.
 55. Naoi M, Riederer P, Maruyama W. Modulation of monoamine oxidase (MAO) expression in neuropsychiatric disorders: genetic and environmental factors involved in type A MAO expression. *J Neural Transm*. 2016;123(2):91–106.
 56. Youdim MBH, Edmondson D, Tipton KF. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(4):295–309.
 57. White TA, Kwon EM, Fu R, Lucas JM, Ostrander EA, Stanford JL, et al. The monoamine oxidase A gene promoter repeat and prostate cancer risk. *Prostate*. 2012;72(15):1622–7.
 58. Castro Gonçalves AB, Ferreira Fratelli C, Saraiva Siqueira JW, de Abreu Cardoso Duarte L, Ribeiro Barros A, Possatti I, et al. MAOA uVNTR Genetic Variant and Major Depressive Disorder: A Systematic Review. *Cells [Internet]*. 2022;11(20). Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/20/3267>
 59. Tunbridge EM, Narajos M, Harrison CH, Beresford C, Cipriani A, Harrison PJ. Which dopamine polymorphisms are functional? Systematic review and meta-analysis of COMT, DAT, DBH, DDC, DRD1–5, MAOA, MAOB, TH, VMAT1, and VMAT2. *Biol Psychiatry*. 2019;86(8):608–20.
 60. Gonçalves RP, Bonani FA, Santos RV, Ramos DM. Fatores de risco para carcinoma bem diferenciado de tireoide: análise crítica de 463 casos. *Rev Brás Cir Cabeça Pescoço*. 2012;41:23–6.
 61. Kolla NJ, Vinette SA. Monoamine oxidase a in antisocial personality disorder and borderline personality disorder. *Curr Behav Neurosci reports*. 2017;4(1):41–8.
 62. Behzadi P, Sameer AS, Nissar S, Banday MZ, Gajdács M, García-Perdomo HA, et al. The Interleukin-1 (IL-1) superfamily cytokines and their single nucleotide polymorphisms (SNPs). *J Immunol Res*. 2022;2022.
 63. Boersma B, Jiskoot W, Lowe P, Bourquin C. The interleukin-1 cytokine family members: Role in cancer pathogenesis and potential therapeutic applications in cancer immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2021;62:1–14.
 64. Gonzaga DVB. Interleucina–1: Revisão de literatura das funções biológicas dos membros da família IL–1. *Acervo da Iniciação Científica*. 2013;(1).
 65. Xu J, Yin Z, Cao S, Gao W, Liu L, Yin Y, et al. Systematic Review and Meta-Analysis on the Association between IL-1B Polymorphisms and Cancer Risk.

- PLoS One. 2013;8(5).
66. Hameed RM, Abood HAAN, Ahmed MM. Systematic review and meta-analysis of the association between C-746T and C-703T polymorphisms of the interleukin-5 gene and asthma. *Biomed Biotechnol Res J*. 2020;4(4):323.
 67. Takatsu K. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. *Proc Japan Acad Ser B*. 2011;87(8):463–85.
 68. Hameed RM, Abood HAAN, Ahmed MM. Interleukin-5 and Interleukin-5 Receptor Polymorphism in Asthma. *Chemokines Updat*. 2022;
 69. Mestiri S, Zaaber I, Inoubli O, Abid N, Omrani A, Nejehi H, et al. Association of cytokine Th2 gene polymorphisms with autoimmune thyroid diseases in Tunisian population. *Int J Immunogenet*. 2020;47(3):294–308.
 70. Zhang W, He J, Liu M, Huang M, Chen Q, Dong J, et al. Genetic Analysis Reveals Different Mechanisms of IL-5 Involved in the Development of CAD in a Chinese Han Population. *Oxid Med Cell Longev*. 2023;2023.
 71. Mahajan R, El-Omar EM, Lissowska J, Grillo P, Rabkin CS, Baccarelli A, et al. Genetic variants in T helper cell type 1, 2 and 3 pathways and gastric cancer risk in a Polish population. *Jpn J Clin Oncol*. 2008;38(9):626–33.
 72. Karimi-Zarchi M, Abbasi H, Javaheri A, Hadadan A, Meibod B, Tabatabaei RS, et al. Association of IL-12B rs3212227 and IL-6 rs1800795 polymorphisms with susceptibility to cervical cancer: A systematic review and meta-analysis. *Asian Pacific J cancer Prev APJCP*. 2020;21(5):1197.
 73. Silva BO, Correia AN, Barros TF, Lima LPO, Morais AL, Hassan R, et al. 3' untranslated region A> C (rs3212227) polymorphism of Interleukin 12B gene as a potential risk factor for Hodgkin's lymphoma in Brazilian children and adolescents. *Klin Pädatrie*. 2020;232(02):PW-IV.
 74. Orenay-Boyacioglu S, Kasap E, Yuceyar H, Korkmaz M. Association of interleukin 12B rs3212227 polymorphism with gastric cancer, intestinal metaplasia, and helicobacter pylori infection. *Genetika*. 2020;52(1):115–26.
 75. Tao Y-P, Wang W-L, Li S-Y, Zhang J, Shi Q-Z, Zhao F, et al. Associations between polymorphisms in IL-12A, IL-12B, IL-12Rβ1, IL-27 gene and serum levels of IL-12p40, IL-27p28 with esophageal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(11):1891–900.
 76. Gontijo BR. Associação do polimorfismo genético da cromogranina A (CHGA) em pacientes com câncer de tireoide. 2022;
 77. Zolet ACT, Turchetto C, Zanella CM, Passaia G. Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações. 2017;
 78. Medeiros H. Comportamento alimentar de pacientes candidatos a cirurgia bariátrica e metabólica de um hospital público da grande Florianópolis. 2020 [cited 2021 Dec 8]; Available from: <https://www.tireoide.org.br/para-o-publico/disturbios/cancer-de-tireoide/>
 79. Lima ASN de, Fratelli CF, Freire DO, Ferreira LB, Souza HC, Silva ICR da. Associação do polimorfismo genético no gene BCL2 no Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico/Aneurisma. *Rev Divulg Científica Sena Aires*. 2020;9(1):118–24.
 80. Tzeng D-S, Huang M-F, Lee M-B. Association of the MAOA promoter uVNTR polymorphism with suicide attempts in patients with major depressive disorder. *BMC Med Genet*. 2011;12(1):1–11.
 81. Rashad NM, Soliman MH, El-Shal AS, Said D, Samir GM. Effect of interleukin-1β gene polymorphisms on clinicopathological features and disease activity of systemic lupus erythematosus. *Egypt J Intern Med*. 2019;31(2):235–42.

82. Dholariya S, Mir R, Zuberi M, Yadav P, Gandhi G, Khurana N, et al. Potential impact of (rs 4645878) BAX promoter– 248G> A and (rs 1042522) TP53 72Arg> pro polymorphisms on epithelial ovarian cancer patients. *Clin Transl Oncol*. 2016;18(1):73–81.
83. Ben-Hamo R, Zilberberg A, Cohen H, Bahar-Shany K, Wachtel C, Korach J, et al. Resistance to paclitaxel is associated with a variant of the gene BCL2 in multiple tumor types. *NPJ Precis Oncol* [Internet]. 2019 Apr 23;3:12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31044156>
84. Boraschi D. What is IL-1 for? The functions of interleukin-1 across evolution. *Front Immunol*. 2022;13:872155.
85. Lurje I, Gaisa NT, Dahl E, Knüchel R, Strnad P, Trautwein C, et al. Genetic polymorphisms in interleukin-1 β (rs1143634) and interleukin-8 (rs4073) are associated with survival after resection of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Sci Rep*. 2023;13(1):12283.
86. rs1143634 RefSNP Report [Internet]. 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1143634>
87. Gitto SB, Beardsley JM, Nakkina SP, Oyer JL, Cline KA, Litherland SA, et al. Identification of a novel IL-5 signaling pathway in chronic pancreatitis and crosstalk with pancreatic tumor cells. *Cell Commun Signal*. 2020;18(1):1–14.
88. Erdei E, Kang H, Meisner A, White K, Pickett G, Baca C, et al. Polymorphisms in cytokine genes and serum cytokine levels among New Mexican women with and without breast cancer. *Cytokine*. 2010;51(1):18–24.
89. Kong C, Chen M, Fan X, Chen X. Associations between hepatocellular carcinoma risk and rs3212227 and rs568408 polymorphisms: a systematic review and meta-analysis. *J Int Med Res* [Internet]. 2020 Aug;48(8):300060520943420–300060520943420. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32809897>
90. Mayrhofer BF, Santos C, Cristine G, Montani G, Mazzo I. Utilização dos Hormônios Calcitonina, Catecolaminas E Tireoglobulina Como Marcadores Tumoriais: Uma Revisão Bibliográfica. *Saúde e Desenvolv*. 2019;11(6).
91. Figuera TM, Perez CLS, Faris N, Scarabotto PC, Silva TT, Cavalcanti TCS, et al. TSH levels are associated with increased risk of thyroid carcinoma in patients with nodular disease. *Endokrynol Pol*. 2015;66(6):480–5.
92. Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Jonasson JG, Sigurdsson A, Bergthorsson JT, et al. Common variants on 9q22. 33 and 14q13. 3 predispose to thyroid cancer in European populations. *Nat Genet*. 2009;41(4):460–4.
93. Golbert L, Wajner SM, Rocha AP da, Maia ALS, Gross JL. Carcinoma diferenciado de tireóide: avaliação inicial e acompanhamento. *Arq Bras Endocrinol Metabol Brazilian Arch Endocrinol Metab São Paulo Vol 49, n 5 (out 2005)*, p 701-710. 2005;
94. Bueno F, Falcone MGG, Peñaloza MA, Abelleira E, Pitoia F. Dynamics of serum antithyroglobulin antibodies in patients with differentiated thyroid cancer. *Endocrine*. 2020;67(2):387–96.
95. Liu J, Tang X, Shi F, Li C, Zhang K, Liu J, et al. Genetic polymorphism contributes to ¹³¹I radiotherapy-induced toxicities in patients with differentiated thyroid cancer. *Pharmacogenomics*. 2018;19(17):1335–44.
96. Kelly A, Barres B, Kwiatkowski F, Batisse-Lignier M, Aubert B, Valla C, et al. Age, thyroglobulin levels and ATA risk stratification predict 10-year survival rate of differentiated thyroid cancer patients. *PLoS One*. 2019;14(8):e0221298.
97. Pessoa VG, Bonasser LSS, de Souza JNG, de Souza Freitas R, de Souza

Silva CM, de Moraes RM, et al. Polimorfismo IL1B-511 e associação com suscetibilidade e prognóstico em pacientes com carcinoma papilífero de tireoide. Rev Divulg Científica Sena Aires. 2022;11(4):573–83.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética do Centro Universitário de Brasília (UnICEUB).

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UNICEUB 								
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
DADOS DA EMENDA Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DE ALTERAÇÕES EM PADRÕES MOLECULARES NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES PORTADORES DO CÂNCER DA TIREOIDE SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM O RADIOFÁRMACO IODETO DE SÓDIO Pesquisador: Rafael Martins de Morais Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.); Versão: 3 CAAE: 57382416.6.0000.0023 Instituição Proponente: INSTITUTO DE MEDICINA NUCLEAR E ENDOCRINOLOGIA DE BRASILIA LTDA Patrocinador Principal: Financiamento Próprio DADOS DO PARECER Número do Parecer: 2.532.976 Apresentação do Projeto: Apresentação de emenda ao projeto INFLUÊNCIA DE ALTERAÇÕES EM PADRÕES MOLECULARES NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES PORTADORES DO CÂNCER DA TIREOIDE SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM O RADIOFÁRMACO IODETO DE SÓDIO (131I), aprovado em 15 de março de 2017, parecer 1.965.528. Será incluído, ao projeto original aprovado, o Instrumento WHOQOL-BREF, constituído de 26 perguntas. Para o Instrumento WHOQOL-BREF, foi gerado um TCLE à parte que será aplicado em pessoas que já são participantes da pesquisa. Objetivo da Pesquisa: A emenda ao projeto visa incluir um questionário para avaliar a qualidade de vida dos indivíduos submetidos ao tratamento de câncer de tireoide com o Radiofármaco Iodeto de Sódio (131I). Avaliação dos Riscos e Benefícios: O risco da aplicação do Instrumento WHOQOL-BREF é mínimo, podendo ocorrer desconforto ao responder perguntas. Caso o participante da pesquisa necessite de algum acompanhamento								
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: none;">Endereço: SEPN 707/907 - Bloco B, sala 6.110, 1º andar</td> <td style="border: none;"></td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Bairro: Setor Universitário</td> <td style="border: none;">CEP: 70.790-075</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">UF: DF</td> <td style="border: none;">Município: BRASILIA</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Telefone: (61)3066-1511</td> <td style="border: none;">E-mail: cep.uniceub@uniceub.br</td> </tr> </table>	Endereço: SEPN 707/907 - Bloco B, sala 6.110, 1º andar		Bairro: Setor Universitário	CEP: 70.790-075	UF: DF	Município: BRASILIA	Telefone: (61)3066-1511	E-mail: cep.uniceub@uniceub.br
Endereço: SEPN 707/907 - Bloco B, sala 6.110, 1º andar								
Bairro: Setor Universitário	CEP: 70.790-075							
UF: DF	Município: BRASILIA							
Telefone: (61)3066-1511	E-mail: cep.uniceub@uniceub.br							

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UNICEUB



Continuação do Parecer: 3.532.975

psicológico relacionado à sua participação na pesquisa, será encaminhado ao serviço de Psicologia da Universidade de Brasília.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Aplicação do questionário (Instrumento WHOQOL-BREF) ocorrerá entre os meses de fevereiro e dezembro de 2018.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O instrumento WHOQOL-BREF (questionário) foi anexado ao projeto.

O TCLE específico para a aplicação do questionário está adequado.

Recomendações:

O CEP-UNICEUB ressalta a necessidade de desenvolvimento da pesquisa, de acordo com o protocolo avaliado e aprovado, bem como, atenção às diretrizes éticas nacionais quanto aos incisos XI.1 e XI.2 da Resolução nº 466/12 CNS/MS concernentes às responsabilidades do pesquisador no desenvolvimento do projeto:

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é Indelegável e Indelivável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

- c) desenvolver o projeto conforme delineado;
- d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;
- g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
- h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Observação: O envio de relatórios deverá ocorrer pela Plataforma Brasil, por meio de notificação de evento.

O modelo do relatório encontra-se disponível na página do UNICEUB

http://www.uniceub.br/instituicao/pesquisa/Ins030_pesquisacomitebio.aspx, em Relatório de Finalização e Acompanhamento de Pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O estudo permanece adequado segundo as considerações éticas.

Endereço: SEPN 707007 - Bloco B, sala B.110, 1º andar

Bairro: Setor Universitário

CEP: 70.790-075

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (81)3068-1511

E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB

Continuação do Parecer: 2.532.976

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda previamente avaliada, com parecer n. 2.532.976/18, tendo sido homologada na 2ª Reunião Ordinária do CEP-UNICEUB do ano, em 23 de fevereiro de 2018.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_899758 ET.pdf	05/02/2018 17:49:48		Acelto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_899758 E1.pdf	05/02/2018 17:47:06		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	NOVOPROJETO.pdf	05/02/2018 17:45:38	Rafael Martins de Moraes	Acelto
Outros	CARTA.pdf	05/02/2018 17:45:20	Rafael Martins de Moraes	Acelto
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	05/02/2018 17:45:02	Rafael Martins de Moraes	Acelto
Outros	TCLEInstrumento.pdf	05/02/2018 17:44:45	Rafael Martins de Moraes	Acelto
Outros	Proponente.pdf	19/01/2017 16:43:59	Rafael Martins de Moraes	Acelto
Outros	Coparticipante.pdf	19/01/2017 16:43:18	Rafael Martins de Moraes	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	19/01/2017 16:42:41	Rafael Martins de Moraes	Acelto
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	GUARDA.pdf	19/01/2017 16:42:16	Rafael Martins de Moraes	Acelto
Declaração de Pesquisadores	RESPONSABILIDADE_TERMOS.pdf	19/01/2017 16:40:47	Rafael Martins de Moraes	Acelto
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	19/01/2017 16:31:51	Rafael Martins de Moraes	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco B, sala 6.110, 1º andar

Bairro: Setor Universitário

CEP: 70.790-075

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3066-1511

E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB



Continuação do Parecer: 2.532.976

BRASÍLIA, 08 de Março de 2018

Assinado por:
Marília de Queiroz Dias Jacome
(Coordenador)

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco B, sala 6.110, 1º andar

Bairro: Setor Universitário

CEP: 70.790-075

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3966-1511

E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (GRUPO CASO).



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB



IMAGENS MÉDICAS DE BRASÍLIA -

IMEB

INFLUÊNCIA DE ALTERAÇÕES EM PADRÕES MOLECULARES NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES PORTADORES DO CÂNCER DA TIREOIDE SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM O RADIOFÁRMACO IODETO DE SÓDIO (^{131}I)

IMAGENS MÉDICAS DE BRASÍLIA - IMEB UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB

Pesquisador(a) responsável: Rafael Martins de Moraes e Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O texto abaixo apresenta todas as informações necessárias sobre o que será feito. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não lhe causará prejuízo.

O nome deste documento que você está lendo é Termo de Consentimento Livre e Esclarecido(TCLE).

Antes de decidir se deseja participar (de livre e espontânea vontade) você deverá ler e compreender todo o conteúdo. Ao final, caso decida participar, você será solicitado a assiná-lo e receberá uma cópia do mesmo.

Antes de assinar, faça perguntas sobre tudo o que não tiver entendido bem. A equipe deste estudo responderá às suas perguntas a qualquer momento (antes, durante e após o estudo).

Natureza e objetivos do estudo

O objetivo específico deste estudo é avaliar a influência de alterações genéticas e concentrações de proteínas no sangue no tratamento de câncer de tireoide submetido ao tratamento com o Radiofármaco Iodeto de Sódio(^{131}I).

Você está sendo convidado a participar exatamente por possuir idade maior que 18 anos, de ambos os sexos, é portador de câncer da tireoide e está em tratamento com o Radiofármaco Iodeto de Sódio (^{131}I) na empresa Imagens Médicas de Brasília(IMEB).

Procedimentos do estudo

Sua participação consiste em assinar o TCLE, coletar cerca de 5 mL de sangue venoso com material adequado, novo e descartável, A sua participação se dará por meio de coleta de sangue total venoso (cerca de 5mL), realizada por um profissional devidamente treinado, com um tempo estimado de 10 minutos para cada visita (a primeira antes da administração do Radiofármaco Iodeto de Sódio (^{131}I), a segunda no dia do pós-dose e a terceira quando o Senhor(a) realizar a etapa o controle da doença).

Será avaliada sua parte genética que está possivelmente relacionada com as alterações para o câncer e problemas na tireoide. Os resultados serão devolvidos pela profa. Izabel Cristina Rodrigues da Silva, biomédica e geneticista, professora da UnB. Se houver alterações que comprometam sua saúde, você será encaminhado ao serviço de atendimento hospitalar.

Para uma melhor compreensão do estudo, anotaremos do seu prontuário os exames bioquímicos complementares, tais como anti-tireoglobulina, anti-tireoideperoxidase, hemograma, tireoglobulina, TSH, imagens do leito tireoidiano/PCI outros.

Não haverá nenhuma outra forma de envolvimento ou comprometimento neste estudo.

A pesquisa será realizada na Empresa IMAGENS MÉDICAS DE BRASÍLIA – IMEB e as análises laboratoriais no laboratório de análises clínicas da FCE/UnB

Riscos e benefícios

Este estudo possui riscos, entre eles mínimas formações de hematomas ou dor, possíveis infecções e em casos mais raros lesão nervosa e punção acidental arterial. Medidas preventivas serão tomadas durante a coleta para minimizar qualquer risco ou incômodo. São elas: os materiais de coleta serão adequados ao procedimento, novos e descartáveis. A sala de coleta deverá ser única e exclusivamente para coleta, permanecendo no local somente o paciente e o flebotomista, com exceções para participantes que necessitam a presença de algum acompanhante, além da sala estar prontamente higienizada. Caso ocorra alguma contaminação, o local deverá ser imediatamente desinfetado, comunicando ao superior imediato do acidente ocorrido. Caso esse procedimento possa gerar algum tipo de constrangimento, você não precisa realizá-lo.

Os resultados desta pesquisa serão compartilhados, sem revelar seu nome, instituição a qual pertence ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade, com a comunidade científica envolvida sob a forma de publicação de artigos científicos sobre o

assunto, além de contribuir para maior conhecimento sobre os aspectos fisiopatológicos, diagnóstico, tratamento e prognóstico da doença do câncer da tireoide.

Participação, recusa e direito de se retirar do estudo

Sua participação é voluntária. Você não terá nenhum prejuízo se não quiser participar. Você poderá se retirar desta pesquisa a qualquer momento, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis.

Conforme previsto pelas normas brasileiras de pesquisa com a participação de seres humanos, você não receberá nenhum tipo de compensação financeira pela sua participação neste estudo.

Confidencialidade

Seus dados serão manuseados somente pelos pesquisadores e não será permitido o acesso a outras pessoas.

Os dados e instrumentos utilizados (sangue coletado, exames de imagens, histopatológicos, laboratoriais e prontuário) ficarão guardados sob a responsabilidade dos pesquisadores Rafael Martins de Moraes e Izabel Cristina Rodrigues da Silva com a garantia de manutenção do sigilo e confidencialidade, e arquivados por um período de 5 anos; após esse tempo serão destruídos.

Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas. Entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição a qual pertence ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade.

Se houver alguma consideração ou dúvida referente aos aspectos éticos da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário de Brasília – CEP/Uniceub, que aprovou esta pesquisa, pelo telefone 3966.1511 ou pelo e-mail cep.uniceub@uniceub.br. Também entre em contato para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo.

Eu, _____ RG _____,
após receber a explicação completa dos objetivos do estudo e dos procedimentos envolvidos nesta pesquisa concordo voluntariamente em fazer parte deste estudo.

Este Termo de Consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida ao senhor(a).

Brasília, _____ de _____ de _____.

Participante

Rafael Martins de Moraes

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (GRUPO CONTROLE).



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB



IMAGENS MÉDICAS DE BRASÍLIA -

IMEB

INFLUÊNCIA DE ALTERAÇÕES EM PADRÕES MOLECULARES NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES PORTADORES DO CÂNCER DA TIREOIDE SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM O RADIOFÁRMACO IODETO DE SÓDIO (^{131}I)

IMAGENS MÉDICAS DE BRASÍLIA - IMEB UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB

Pesquisador(a) responsável: Rafael Martins de Moraes e Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O texto abaixo apresenta todas as informações necessárias sobre o que será feito. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não lhe causará prejuízo.

O nome deste documento que você está lendo é Termo de Consentimento Livre e Esclarecido(TCLE).

Antes de decidir se deseja participar (de livre e espontânea vontade) você deverá ler e compreender todo o conteúdo. Ao final, caso decida participar, você será solicitado a assiná-lo e receberá uma cópia do mesmo.

Antes de assinar, faça perguntas sobre tudo o que não tiver entendido bem. A equipe deste estudo responderá às suas perguntas a qualquer momento (antes, durante e após o estudo).

Natureza e objetivos do estudo

O objetivo específico deste estudo é avaliar a influência de alterações genéticas e concentrações de proteínas no sangue no tratamento de câncer de tireoide submetido ao tratamento com o Radiofármaco Iodeto de Sódio (^{131}I) e comparar com indivíduos que não serão/não foram submetidos ao tratamento.

Você está sendo convidado a participar exatamente por possuir idade maior que 18 anos, de ambos os sexos, não possuir registro de câncer e não ser submetido ao tratamento com o Radiofármaco Iodeto de Sódio (^{131}I), não aparentados dos pacientes do grupo caso.

Procedimentos do estudo

Sua participação consiste em assinar o TCLE, coletar cerca de 5 mL de sangue venoso com material adequado, novo e descartável. A sua participação se dará por

meio de coleta de sangue total venoso (cerca de 5mL), realizada por um profissional devidamente treinado, com um tempo estimado de 10 minutos.

Não haverá nenhuma outra forma de envolvimento ou comprometimento neste estudo.

Será avaliada sua parte genética que está possivelmente relacionada com as alterações para o câncer e problemas na tireoide. Os resultados serão devolvidos pela profa. Izabel Cristina Rodrigues da Silva, biomédica e geneticista, professora da UnB. Se houver alterações que comprometam sua saúde, você será encaminhado ao serviço de atendimento hospitalar.

A pesquisa será realizada na Empresa IMAGENS MÉDICAS DE BRASÍLIA – IMEB e as análises laboratoriais no laboratório de análises clínicas da FCE/UnB

Riscos e benefícios

Este estudo possui riscos, entre eles mínimas formações de hematomas ou dor, possíveis infecções e em casos mais raros lesão nervosa e punção acidental arterial. Medidas preventivas serão tomadas durante a coleta para minimizar qualquer risco ou incômodo. São elas: os materiais de coleta serão adequados ao procedimento, novos e descartáveis. A sala de coleta deverá ser única e exclusivamente para coleta, permanecendo no local somente o paciente e o flebotomista, com exceções para participantes que necessitam a presença de algum acompanhante, além da sala estar prontamente higienizada. Caso ocorra alguma contaminação, o local deverá ser imediatamente desinfetado, comunicando ao superior imediato do acidente ocorrido. Caso esse procedimento possa gerar algum tipo de constrangimento, você não precisa realizá-lo.

Com sua participação nesta pesquisa você poderá compartilhar entre a comunidade envolvida sob a forma de publicação de artigos científico sobre o assunto, além de contribuir para maior conhecimento sobre os aspectos fisiopatológicos, diagnóstico, tratamento e prognóstico da doença do câncer da tireoide.

Participação, recusa e direito de se retirar do estudo

Sua participação é voluntária. Você não terá nenhum prejuízo se não quiser participar. Você poderá se retirar desta pesquisa a qualquer momento, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis.

Conforme previsto pelas normas brasileiras de pesquisa com a participação de seres humanos, você não receberá nenhum tipo de compensação financeira pela sua participação neste estudo.

Confidencialidade

Seus dados serão manuseados somente pelos pesquisadores e não será permitido o acesso a outras pessoas.

Os dados e instrumentos utilizados (sangue coletado, exames de imagens, histopatológicos, laboratoriais e prontuário) ficarão guardados sob a responsabilidade dos pesquisadores Rafael Martins de Moraes e Izabel Cristina Rodrigues da Silva com a garantia de manutenção do sigilo e confidencialidade, e arquivados por um período de 5 anos; após esse tempo serão destruídos.

Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas. Entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição a qual pertenceu qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade.

Se houver alguma consideração ou dúvida referente aos aspectos éticos da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário de Brasília – CEP/Uniceub, que aprovou esta pesquisa, pelo telefone 3966.1511 ou pelo e-mail cep.uniceub@uniceub.br. Também entre em contato para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo.

Eu, _____ RG _____,
após receber a explicação completa dos objetivos do estudo e dos procedimentos envolvidos nesta pesquisa concordo voluntariamente em fazer parte deste estudo.

Este Termo de Consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida ao senhor(a).

Brasília, _____ de _____ de _____.

Participante

Rafael Martins de Moraes

ANEXO D - Termo de guarda de material biológico.

Este documento é chamado é chamado Termo de Guarda de Material Biológico. Ele contém explicações sobre a guarda do material biológico (sangue) do paciente sob sua responsabilidade. Você poderá autorizar ou não a guarda do material biológico do paciente sob sua responsabilidade.

Toda nova pesquisa a ser feita com o material guardado será submetida para aprovação do CEP da instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

A qualquer momento você terá acesso aos dados do paciente sob sua responsabilidade e de seus dados genéticos, assim como terá o direito de retirar o material biológico do banco onde se encontra armazenado.

Todas as informações estarão sempre à sua disposição, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores.

Os trabalhos resultantes destas pesquisas mostrarão apenas os resultados e nunca o nome do paciente ou qualquer outra informação que ponha em risco sua privacidade.

As amostras de sangue serão identificadas com um número e não com o nome do paciente sob sua responsabilidade. Somente os pesquisadores saberão a quem pertence cada número.

O sangue será utilizado somente em pesquisas que tenham como objetivos verificar se determinadas sequências no DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) e se as concentrações de algumas proteínas séricas podem estar relacionadas com o prognóstico, tratamento, estadiamento e acompanhamento da doença, em um estudo prospectivo e de caso controle.

O sangue do paciente sob sua responsabilidade, coletado no presente estudo, ficará guardado no Laboratório de Análises Clínicas na Faculdade de Ceilândia (FCE) da Universidade de Brasília (UnB), no banco de amostras “Câncer da tireoide”, sob a responsabilidade e guarda do pesquisador Rafael Martins de Moraes e da pesquisadora Izabel Cristina Rodrigues da Silva.

Eu,

_____, RG _____, após receber uma explicação completa dos procedimentos envolvidos na guarda de material biológico, venho através deste termo consentir a guarda do material biológico (sangue) do paciente sob minha responsabilidade.

Paciente sob minha responsabilidade:

Assinatura do participante

Brasília, _____ de _____ de _____

ANEXO E - Prontuário do paciente do grupo caso.

Ficha para Dose Terapêutica com Radiofármaco Iodeto de Sódio (^{131}I)		
Nome:		
Sexo:		
Telefone para contato:		
e-mail:		
Idade:		
Sexo:	Masculino ()	Feminino ()
Indicação e CID:		
1) História Clínica		
Medicamentos em uso:		
Fumante:	Sim ()	Não ()
Pré-disposição:	Sim ()	Não ()
2) Exames Complementares		
Anti-tireoglobulina:		
Anti-tireoide peroxidase:		
B-HCG:		
Hemograma:		
Leito tireoidiano/PCI:		
Tireoglobulina:		

ANEXO F - Artigo científico publicado na revista científica *The international Journal of Biological Markers*.

Original Research Article

IJBM | The International
Journal of Biological
Markers

BAX gene (–248 G > A) polymorphism in a sample of patients diagnosed with thyroid cancer in the Federal District, Brazil

The International Journal of Biological
Markers
1–6

© The Author(s) 2021
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/17246008211057576
journals.sagepub.com/home/ijbm



Ligia C.A. Cardoso-Duarte¹ , Caroline F. Fratelli¹ ,
Alexandre S.R. Pereira¹, Jéssica Nayane Gomes de Souza¹,
Renata de Souza Freitas², Rafael Martins de Moraes³,
Alaor Barra Sobrinho⁴, Calliandra M. Sousa Silva⁵ ,
Jamila Reis de Oliveira⁵ , Diêgo Madureira de Oliveira¹
and Izabel Cristina R. Silva¹

Abstract

Introduction: Papillary thyroid cancer corresponds to approximately 1% of all carcinomas; nevertheless, it is the most prevalent endocrine neoplasm in the world. Studies reveal that the BAX (–248 G > A) polymorphism may be associated with negative regulation of BAX gene transcription activity, causing a decrease in its protein expression.

Objective: The present study aimed to describe the genotype and allele frequencies of BAX single nucleotide polymorphisms (–248 G > A) (rs4645878) in the research patients, and to associate its presence with susceptibility to papillary thyroid cancer.

Methods: This case-control study was conducted with 30 patients with papillary thyroid cancer. For the evaluation of genetic polymorphisms, the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique was employed. Allele and genotype frequencies were estimated using the SPSS program, and significant associations were considered when $p < 0.05$.

Results: There was a significant genotypic difference between papillary thyroid cancer and the control group ($p = 0.042$). The GG genotype provided a protective factor for papillary thyroid cancer ($p = 0.012$, odds ratio (OR) = 0.313; confidence interval (CI) = 0.123–0.794). Likewise the G allele was a protective factor for papillary thyroid cancer ($p = 0.009$; OR = 0.360; CI = 0.163–0.793). The BAX gene polymorphism (–248 G > A) was associated with papillary thyroid cancer.

Conclusion: BAX (–248 G > A) GG genotype carriers, or at least one mutated allele, was associated with papillary thyroid cancer in the Brazilian population studied, and the G allele presence is considered a protective factor against papillary thyroid cancer occurrence.

Keywords

Genetic polymorphism, thyroid gland neoplasm, BAX, cancer

Date received: 7 June 2021; revised: 8 October 2021; accepted: 18 October 2021

¹Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde - Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil

²Centro Universitário do Distrito Federal (UDF), Brasília, DF, Brazil

³Hospital Sírio-Libanês, Brasília, DF, Brazil

⁴Imagens Médicas de Brasília (IMEB), Brasília, DF, Brazil

⁵Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil

Corresponding author:

Ligia C.A. Cardoso-Duarte, Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde - Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil.
Email: ligia.canongia@gmail.com



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access page (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

Introduction

Thyroid carcinomas are classified into papillary thyroid carcinoma (PTC), follicular thyroid carcinoma, medullary thyroid carcinoma, thyroid carcinoma poorly differentiated, and anaplastic thyroid carcinoma, based on histopathology.¹ PTC is the most common histological type of thyroid cancer; nevertheless, it is also the least aggressive.² PTC incidence is more common in women and Caucasians and its incidence increases with age.³

In Brazil, thyroid gland carcinoma corresponds to approximately 1% of all carcinomas and is the most prevalent endocrine neoplasm globally. The number of new thyroid cancer cases estimated for each year of the 2020–2022 triennium will be 1830 new cases in men and 11,950 in women. For the Federal District, the estimate is 140 new cases.⁴

B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) associated with protein X (BAX) is a crucial pro-apoptosis protein in the Bcl-2 family, mainly existing in the cytoplasm. When cells receive apoptotic signals, the BAX proteins transfer to the mitochondrial membrane, where they recognize and bind the membrane-bound Bcl-2 proteins to form the BAX-Bcl-2 heterodimer, thus inhibiting the Bcl-2 proteins' anti-apoptosis function. BAX proteins can also form the BAX-BAX homodimer in the mitochondrial membrane, thereby increasing the mitochondrial membrane's permeability and releasing cytochrome C, an apoptotic factor, into the cytoplasm to activate the apoptosis cascade response. Therefore, BAX has a vital role in regulating the signaling pathway for mitochondrial apoptosis.⁵

The association between *BAX* gene polymorphisms and cancer is related to cancer occurrence and the patient's prognosis. Studies show that the (–248 G>A) polymorphism may be associated with negative regulation of *BAX* gene transcription activity, causing a decrease in its protein expression, which increases the Bcl-2 and BAX ratio and may inhibit the apoptotic process of tumor cells.⁶

Thyroglobulin serum measurement and a ¹³¹I scintigraphy are generally accepted as a key part of the diagnostic strategy in patients with well-differentiated thyroid cancer (DTC) after thyroidectomy. However, neither planar nor single photon emission computed tomography (SPECT) acquisitions are able to determine the location of lesions correctly. Spanu et al.⁷ state that the combination of SPECT and computed tomography (SPECT/CT) provides a better anatomical image and improves the ¹³¹I planar image's ability to detect iodine-avid foci suggesting that SPECT/CT is the best technique for the follow-up of thyroidectomized DTC patients. ¹³¹I-SPECT/CT appears to be superior to whole-body scintigraphy (WBS) in detecting malignant lesions and cervical lymph node metastases that could be used as a complementary tool to the WBS.^{8,9}

Thyroid cancer molecular markers are found in more than 70% of differentiated carcinomas, and the understanding of its different molecular mechanisms is favorable to

new perspectives for its diagnosis and treatment.¹⁰ Among the various molecular markers described are the genetic variants; that is, a molecular alteration in at least 1% of the population, and when such molecular variations occur in only one nucleotide, these polymorphisms are called SNPs (single nucleotide polymorphisms).¹¹

To this end, the present study aimed to describe the genotype and allele frequencies of *BAX* SNP (–248 G>A) (rs4645878) in the research patients and to associate its presence with susceptibility to papillary thyroid cancer.

Material and methods

Subjects

The Centro Universitário de Brasília (UnICEUB) Ethics Committee approved this study for genetic analysis under CAAE No 57382416.6.0000.0023.

The sample size was calculated using the Raosoft software (Sample Size Calculator), estimating a prevalence of 1% of thyroid cancer among the cancer types in the adult population, a 5% sampling error and 95% confidence interval (CI) in the number of 8450 patients a sample size of 12 participants was reached. A sample size of 30 PTC patients was admitted considering possible compensation of losses.

As a case-control study, the research participants were divided into two groups. The case group consisted of 30 PTC patients (20 female, 11 male) over 18 years old (average age: 48 ± 13 years) that underwent thyroidectomy and radioiodine therapy at a Federal District private clinic. The control group consisted of 81 healthy volunteers (43 female, 38 male) with a mean age of 52 ± 5 years, paired and unrelated to the case group. The participants were excluded from both groups if they were younger than 18 years old, were not eligible for radioiodine therapy, and refused to participate in the research or for whom legal representatives did not consent.

Laboratory methods

After signing the Free and Informed Consent Terms and the Biological Material Guard Terms, and answering a proposed questionnaire, each participant had 10 mL of venous blood collected.

For the evaluation of genetic polymorphisms, DNA was extracted from peripheral blood using the PureLink® Genomic DNA Mini Kit from Invitrogen (catalog # K1820-02, lot # 19339891) and had an average concentration of 20 ng/μL. Then, the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique was applied to study the SNPs' distribution.

The polymerase chain reaction (PCR) technique was performed for *BAX* genotyping (–248 G>A) (rs4645878). The primers used were 5'–CATTAGAGCTGCGATTGGACCG –3' (sense) and 5'–GCTCCCTCGGGAGGTTTGGT –3' (antisense).

The thermocycling conditions were 96°C/5 min (initial denaturation), followed by 35 denaturation cycles at 96°C/45 s, succeeded by 56°C/40 s for the primers' annealing, and 72°C/30 s for the fragments' extension. The final extension was performed at 72°C/10 min.

These primers amplified a 109 bp DNA fragment that was then digested using the *MspI* Fast Digest restriction enzyme (Fermenta, Lote 00066274, Exp. 03.2014). This digestion was performed in a water bath at 37°C for 2 hours and then revealed through a 4% agarose gel, stained with 4 µL of ethidium bromide (10 mg/mL) using the transilluminator. The following genotypic pattern was observed: the wild homozygote (GG) produced two bands (89 bp and 20 bp), the heterozygote (GA) produced three bands (20 bp, 89bp, and 109 bp), and the mutated homozygous allele (AA) produced only one 109 bp band.

Statistical analysis

Allelic and genotypic frequencies were estimated using the SPSS version 20.0 program by direct counting and expressed as a percentage. The Chi-square test and the odds ratio (OR) were applied to compare the frequency distributions and analyze possible associations with the alleles and genotypes between the two groups evaluated (case and control) and describe their summary statistics. Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test were used to compare PTC patients' genotype frequencies with their clinical characteristics: thyroglobulin, TSH, and BMI. Fisher's exact test and OR was used to analyze the association between the distribution of antithyroglobulin (IU/mL), sex, and administered radiopharmaceutical dose

(mCi) in PTC patients and their genotype. Fisher's exact test and OR were also used to examine the association between PTC patients' tumor staging, per TNM classification, and their genotype. Significant associations were recognized if probabilities were less than 5% ($p < 0.05$).

Results

Thirty participants (mean age 43 years $\pm$ 13 years) with PTC constituted the case group, whereas 81 healthy participants (mean age 40 years $\pm$ 9 years) constituted the control group. The *BAX* (-248 G > A) polymorphism genotype frequency in the control group was in Hardy-Weinberg equilibrium ($p = 0.130$).

Table 1 describes the genotypic and allelic distribution in the case and control group, in which most of the PTC group (60.0%) had a GG genotype. The same occurred in the control group (82.7%). Furthermore, the genotypic difference between the groups was statistically significant ($p = 0.041$).

When assessing the allelic distribution, 76.7% of the PTC patients had the G allele, against 90.1% in the control group, and a statistical difference between the alleles studied and protection for the PTC occurrence in the wild allele carriers was observed ($p = 0.009$; OR = 0.360; 95% CI = 0.163–0.793). Moreover, when dichotomizing the genotypes, it was possible to observe a statistical difference between the data, suggesting that the GG genotype presence was a protection against the PTC occurrence ($p = 0.012$; OR = 0.313; 95% CI = 0.123–0.794).

From the results obtained, the associations between the genetic variant and clinical characteristics linked to PTC patients were analyzed, such as thyroglobulin serum concentration, thyroid-stimulating hormone (TSH), antithyroglobulin, body mass index (BMI), sex, administered dose, and tumor staging (tumor node metastasis (TNM) classification). No statistical differences were found between the *BAX* genetic variant and these variables (Table 2).

Table 3 describes the association of the genetic variant studied and the antithyroglobulin concentration in PTC patients, in addition to their sex and the administered drug dose. Regarding antithyroglobulin concentration, 10 of the PTC participants (76.9%) with the GG genotype had a concentration > 20 IU/mL. Furthermore, most of the PTC carriers with the GG genotype (70.6%) were female compared to the male. It is worth mentioning that there was no statistical difference between the genotypic groups and the variables studied. Regarding the dose of the radiopharmaceutical administered, 14 patients (82.4%) with the GG genotype received doses $\leq$ 150 mCi and only 3 (17.6%) with the GG genotype received the dose > 150 mCi. None of these three studied characteristics presented a statistically significant difference.

Analyzing tumor staging per TNM classification system, half of the PTC patients with the GG genotype had T1 + T2 staging, while the other half had T3 + T4 staging. It was also

Table 1. *BAX* (-248 G > A) polymorphism genotypic distribution in the case and control groups.

	PTC		Control		p	OR	CI
	N	%	N	%			
GG	18	60.0	67	82.7	0.0421*	N/A	N/A
GA	10	33.3	12	14.8			
AA	2	6.6	2	2.5			
TOTAL	30	100	81	100	0.009*	0.360	(0.163–0.793)
G	46	76.7	146	90.1			
A	14	23.3	16	9.9	0.012*	0.313	(0.123–0.794)
TOTAL	60	100.0	162	100.0			
GG	18	60.0	67	82.7			
GA + AA	12	40.0	14	17.3			
TOTAL	30	100.0	81	100.0			

*Statistically different, Chi-square test.

CI: confidence interval; OR: odds ratio; PTC: papillary thyroid cancer; N/A: not apply.

Table 2. Median, 25th percentile (P25), 75th percentile (P75), and p-values of the variables: thyroglobulin, TSH, and BMI in PTC patients, according to the genotype.

BAX (-248 G>A)	(Thyroglobulin) ng/mL			(TSH) μ U/mL			BMI		
	p 25	Median	p 75	p 25	Median	p 75	p 25	Median	p 75
GG	1.63	4.40	9.00	38.30	77.90	117.23	24.44	27.60	30.64
GA	0.52	0.81	1.06	7.46	71.96	121.00	22.57	24.37	33.30
AA	8.09	97.25	186.40	7.07	68.57	130.07	23.24	23.93	24.62
TOTAL ^{&}	0.77	3.08	9.00	17.65	77.28	118.08	23.75	25.73	31.21
p-value [#]		0.102			0.973			0.460	
GG	1.63	4.40	9.00	38.30	77.90	117.23	24.44	27.60	30.64
GA + AA	0.55	1.04	20.04	7.46	71.96	121.00	22.91	24.37	32.51
p-value*		0.506			0.845			0.324	

&All patients without considering the genotype.

#p-value of measurement between genotypes, Kruskal-Wallis H test. *p-value of measurement between genotypes, Mann-Whitney U test.

BMI: body mass index; PTC: papillary thyroid cancer; TSH: thyroid-stimulating hormone.

noted that when assessing the N stage in GG genotype individuals (two), one (50%) had N0 staging, the other (50%) had N1 staging. In the statistical evaluation of the characteristics studied, no significant differences were observed. As for metastasis (M), one participant with the GG genotype and one with the GA + AA genotype presented M1 staging (Table 4).

Discussion

The present study found a statistically significant difference between the G allele presence in the *BAX* gene

polymorphism (-248 G>A) and PTC occurrence, and the G allele is the most common allele among the PTC and control groups ($p=0.009$).

Likewise, an Indian study on ovarian cancer and *BAX* -248 G/A polymorphism detected an association and an increased risk in individuals with the AA genotype and ovarian cancer occurrence (ORs=4.1; 95% CI=1.23–13.97).¹² Mirmajidi et al.,¹³ in a polymorphic analysis of the *BAX* (-248 G>A) gene in a sample of patients with gastric cancer, also noted that the G allele was more frequent between the case and control group. This study's

Table 3. Analysis of the association between the distribution of antithyroglobulin (IU/mL), sex, and administered radiopharmaceutical dose (mCi) in PTC patients, according to the genotype.

			BAX (-248 G>A)			p [#]	OR	CI
			GG	GA + AA	TOTAL			
Antithyroglobulin (IU/mL)	<20	N	10	8	18	0.616	0.417	(0.36–4.81)
		%	76.9	88.8	81.8			
	>20	N	3	1	4			
		%	23.1	11.2	18.2			
	Total	N	13	9	22			
		%	100	100	100			
Sex	Female	N	12	6	18	0.438	2.4	(0.52–11.19)
		%	70.6	50	62.1			
	Male	N	5	6	11			
		%	29.4	50	37.9			
	Total	N	17	12	29			
		%	100	100	100			
Administered dose (mCi)	≤150	N	14	11	25	0.622	0.42	(0.39–4.66)
		%	82.4	91.7	86.2			
	>150	N	3	1	4			
		%	17.6	8.3	13.8			
	Total	N	17	12	29			
		%	100	100	100			

Fisher's exact test.

CI: confidence interval; OR: odds ratio; PTC: papillary thyroid cancer.

Table 4. Analysis of the association between tumor staging per TNM classification and PTC patients, according to genotype.

		BAX (−248 G > A)			TOTAL	p [#]	OR	CI
		GG	GA + AA					
T	T1 + T2	N	3	5	8	0.999	0.6	(0.70– 5.14)
		%	50	62.5	57.1			
	T3 + T4	N	3	3	6			
		%	50	37.5	42.9			
	Total	N	6	8	14			
N	N0	%	100	100	100	0.222	N/ A	N/A
		N	1	-	1			
	N1	%	50	-	11.1			
		N	1	7	8			
	Total	%	50	100	88.9			
M	MI	N	2	7	9	N/A	N/ A	N/A
		%	100	100	100			
		N	1	1	1			
		%	100	100	100			

Fisher's exact test.

CI: confidence interval; OR: odds ratio; PTC: papillary thyroid cancer; TNM: tumor node metastasis; N/A: not apply.

in silico analysis demonstrated that the BAX (−248 G > A) alteration removed the SP1 transcription factor from AA genotype samples, affecting the cell's gene expression. Thus, BAX (−248 G > A) polymorphism might affect its protein expression, and the G allele presence might be protective against cancer occurrence.

A retrospective study of the medical records of patients undergoing thyroidectomy at a public oncology referral hospital in the São Paulo State from 2009 to 2010 observed, among other factors, an increase in the percentage of patients with well-differentiated thyroid cancer as the BMI (defined by the ratio of weight to height squared) increased, though without a statistical difference.¹⁴ Conversely, the present study found no statistical differences between the genetic variant studied with BMI values.

Tumor markers are molecules that might be present in tumors. An ideal biological marker must be specific and sensitive, identifying the tumor's type and characterizing its severity and staging. For instance, the TSH, produced by the pituitary gland, stimulates the thyroid gland to produce triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4).¹⁵ Moreover, all three hormones are used as thyroid cancer markers.

Figuera et al.¹⁶ retrospectively reviewed the medical records of 622 patients with uni/multi-nodular goiter, noting that a TSH > 1.64 mU/L persisted as a risk factor for malignancy regardless of other variables. Patients with

follicular lesions had higher TSH levels than patients with a benign cytological diagnosis and concluded that elevated TSH serum levels increased the risk of malignant thyroid nodules and thyroid cancer aggressiveness. No statistical differences were detected between the BAX genetic variant and the thyroglobulin serum concentration, TSH, and BMI values ($p = 0.102$, 0.973 , and 0.460 , respectively).

Antithyroglobulin antibodies are produced by immune cells, mainly by lymphocytes that react against auto-thyroid antigens and progressively infiltrate the thyroid gland. The antithyroglobulin antibody incidence is approximately twice as high in patients with differentiated thyroid carcinoma, especially in PTC, compared to the general population, suggesting an association between autoimmune thyroid disease and differentiated thyroid carcinoma.¹⁷ The present study observed no association between the BAX gene (−248 G > A) polymorphism and antithyroglobulin concentrations or the administered radioiodine dose, as there was no statistically significant difference between the PTC patients' genotype groups.

Bilous et al.¹⁸ states that BAX RNA messenger levels decrease in patients with elevated anti-thyroglobulin and anti-thyroid peroxidase serum autoantibody levels, and increase in patients with hypothyroidism resulting from autoimmune thyroiditis and postoperative hypothyroidism.

Kelly et al.,¹⁹ in a retrospective observational study, included 1093 patients with differentiated thyroid carcinoma treated between 1995 and 2010, with thyroidectomy performed on all patients included in the study. Women (78%) were predominant in this study—a fact also noted in the present study. PTC was the most frequent (88%), and T1 staging was present in 55.8%, T2 in 19.4%, T3 in 22.1%, and T4 in 2.4%. Concurrently, distant metastases presence was observed in 3.1% of the research participants. An analysis of tumor staging per TNM classification system revealed that half of the PTC patients with the GG genotype had T1 + T2 staging, while the other half had T3 + T4 staging.

Difficulties and limitations encountered during this research were a request for departure from one of the participants, and the results from specific exams were not obtainable for some participants.

In conclusion, BAX (−248 G > A) GG genotype carriers, or at least one mutated allele, was associated with PTC in the Brazilian population studied, and that the G allele presence is considered a protective factor against PTC occurrence. As for the other PTC characteristics and prognoses, no significant associations were detected linked to BAX (−248 G > A) gene.

Analyzing genetic variants assist and facilitate the comprehension of diseases that affect the population. Accordingly, studies that further new forms of early diagnosis, improve the quality of life, and identify risk factors—whether environmental or genetic—must be developed.

Acknowledgments

This work was supported by the Higher Education Personnel Improvement Coordination – Brazil (CAPES)–Financing Code 001. DPI/UnB.

CAPES–Financing Code 001 is a post-graduation scholarship and independent of the research subject.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, or publication of this article.

Funding

The author(s) received the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Financing Code 001, N° 0004/2021), Decanato de Pós-Graduação (DPG)/UnB and Decanato de Pesquisa e Inovação (DPI)/UnB.

ORCID iDs

Ligia C.A. Cardoso-Duarte  <https://orcid.org/0000-0002-9335-999X>

Caroline F Fratelli  <https://orcid.org/0000-0002-0511-9452>

Calliandra M. Sousa Silva  <https://orcid.org/0000-0002-9064-0735>

Jamila Reis de Oliveira  <https://orcid.org/0000-0002-9577-0344>

Izabel Cristina R. Silva  <https://orcid.org/0000-0002-6836-3583>

References

- Pan D, Wen D, Luo Y, et al. The diagnostic and prognostic values of Ki-67/MIB-1 expression in thyroid cancer: a meta-analysis with 6,051 cases. *Onco Targets Ther* 2017; 10: 3261.
- Steck JH. *Validade do mapeamento do linfonodo sentinela na detecção de metástase linfática cervical do carcinoma papilífero da glândula tireoide*. PhD Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, Brazil, 2016.
- Heidari Z, Eskandari M, Aryan A, et al. The effect of CASP3 rs4647610 and rs4647602 polymorphisms on tumour size and cancer stage in papillary thyroid carcinoma. *Br J Biomed Sci* 2020; 77: 129–134.
- INCA. Estimativa 2020 Incidência de Câncer no Brasil. Brasil: Rio de Janeiro, 2019, p. 44–45.
- Uhlirarova B and Hajtman A. Hashimoto's thyroiditis-an independent risk factor for papillary carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol* 2018; 84: 729–735.
- Sun L, Wei L, Wei L, et al. Correlation between Bax gene polymorphisms and esophagus cancer. *Oncol Lett* 2018; 16: 7097–7101.
- Spanu A, Solinas ME, Chessa F, et al. 131I SPECT/CT in the follow-up of differentiated thyroid carcinoma: incremental value versus planar imaging. *J Nucl Med* 2009; 50: 184–190.
- Spanu A, Nuvoli S, Gelo I, et al. Role of diagnostic 131I SPECT/CT in long-term follow-up of patients with papillary thyroid microcarcinoma. *J Nucl Med* 2018; 59: 1510–1515.
- Spanu A, Nuvoli S, Marongiu A, et al. Neck lymph node metastasis detection in patients with differentiated thyroid carcinoma (DTC) in long-term follow-up: a 131I-SPECT/CT study. *BMC Cancer* 2020; 20: 1–10.
- Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 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* 2015; 2016; 26:1–133.
- Romero-Sánchez C, Gómez-Gutiérrez A, Gómez PE, et al. C677t (rs1801133) MTFHR gene polymorphism frequency in a Colombian population. *Colomb Med* 2015; 46: 75–79.
- Dholariya S, Mir R, Zuberi M, et al. Potential impact of (rs 4645878) BAX promoter–248G> A and (rs 1042522) TP53 72Arg> pro polymorphisms on epithelial ovarian cancer patients. *Clin Transl Oncol* 2016; 18: 73–81.
- Mirmajidi SH, Najafi M, Mirmajidi ST, et al. Study of regulatory promoter polymorphism (–248 G>A) of Bax gene in patients with gastric cancer in the northern provinces of Iran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2016; 9: 36.
- Gonçalves RP, Bonani FA, Santos RV, et al. Fatores de risco para carcinoma bem diferenciado de tireoide: análise crítica de 463 casos. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço* 2012; 41: 23–26.
- Mayrhofer BF, Santos C, Cristine G, et al. Utilização dos hormônios calcitonina, catecolaminas E tireoglobulina como marcadores tumorais: uma revisão bibliográfica. *Saúde e Desenvol* 2019; 11: 60–69.
- Figuera TM, Perez CLS, Faris N, et al. TSH Levels are associated with increased risk of thyroid carcinoma in patients with nodular disease. *Endokrynol Pol* 2015; 66: 480–485.
- Bueno F, Falcone MGG, Peñaloza MA, et al. Dynamics of serum antithyroglobulin antibodies in patients with differentiated thyroid cancer. *Endocrine* 2020; 67: 387–396.
- Bilous I, Pavlovych L, Krynytska I, et al. Apoptosis and cell cycle pathway-focused genes expression analysis in patients with different forms of thyroid pathology. *Open Access Maced J Med Sci* 2020; 8: 784–792.
- Kelly A, Barnes B, Kwiatkowski F, et al. Age, thyroglobulin levels and ATA risk stratification predict 10-year survival rate of differentiated thyroid cancer patients. *PLoS One* 2019; 14: e0221298.

ANEXO G - Normas de publicação do periódico no International Journal of Biological Markers.

This Journal is a member of the Committee on Publication Ethics.

This Journal recommends that authors follow the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals formulated by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

Please read the guidelines below then visit the journal's submission site <https://mc.manuscriptcentral.com/tijbm> to upload your manuscript. Please note that manuscripts not conforming to these guidelines may be returned.

Only manuscripts of sufficient quality that meet the aims and scope of *The International Journal of Biological Markers* will be reviewed.

As part of the submission process you will be required to warrant that you are submitting your original work, that you have the rights in the work, that you are submitting the work for first publication in the Journal and that it is not being considered for publication elsewhere and has not already been published elsewhere, and that you have obtained and can supply all necessary permissions for the reproduction of any copyright works not owned by you.

1. Open Access

The International Journal of Biological Markers is an open access, peer-reviewed journal. Each article accepted by peer review is made freely available online immediately upon publication, is published under a Creative Commons license and will be hosted online in perpetuity. Publication costs of the journal are covered by the collection of article processing charges which are paid by the funder, institution or author of each manuscript upon acceptance. There is no charge for submitting a paper to the journal.

For general information on open access at Sage please visit the [Open Access page](#) or view our [Open Access FAQs](#)

2. Article processing charge (APC)

If, after peer review, your manuscript is accepted for publication, a one-time article processing charge (APC) is payable. This APC covers the cost of publication and ensures that your article will be freely available online in perpetuity under a [Creative Commons license](#).

The APC for this journal is 2200 USD. From 1st September 2023, the article processing charge (APC) is 2650 USD.

[Back to top](#)

3. What do we publish?

3.1 Aims & Scope

Before submitting your manuscript to *The International Journal of Biological Markers*, please ensure you have read the [Aims & Scope](#).

3.2 Article Types

Original research articles

Previously unpublished manuscripts, describing clinical, pre-clinical, epidemiological investigations, clinical trials, clinical observations, and other relevant investigations that are based on sound patient series, validated analytical methods, and appropriate statistical evaluation.

Original research articles should be structured as follows: Introduction (clearly stating an objective or hypothesis), Methods (describing the study design and methods applied, including the study setting and dates, patients or participants

with inclusion and exclusion criteria, and/or participation or response rates, or data sources, and how these were selected for the study), Results (describing the results of the study in context with the published literature and addressing study limitations), and Discussion (addressing relevant implications for clinical practice or health policy). A structured abstract is required.

Words: max 3000 (excluding figures and tables)

Figures/Tables: max 5

References: max 50

Clinical trial protocols

A clinical trial is defined as any research project that prospectively assigns human participants to intervention or comparison groups to study the cause-and-effect relationship between an intervention and a health outcome. Each manuscript should be divided as follows: Introduction (stating an objective or hypothesis of the protocols), Methods (describing the design and statistical methods applied, including the study setting and dates, patients or participants with inclusion and exclusion criteria), Results (including data on recruitment, etc.), and Discussion (placing the protocol in context with the published literature). A structured abstract is required, and trial registration information (name, number, and URL) must be listed in the title page.

Words: max 3000 (excluding figures and tables)

Figures/Tables: max 6

References: max 50

Reviews

Reviews are solicited by the Editor in Chief on topics that are deemed to be relevant to the audience of the Journal. Containing the current state of knowledge or practice, integrating recent advances with accepted principles and practice, or summarizing and analyzing consensus view of controversial issues in knowledge of practice. A non-structured abstract is required.

Words: max 5000 (excluding figures and tables)

Figures/Tables: max 5

References: no limit

Editorials

The purpose of the editorials is to provide the reader with a balanced overview of relevant and up to date subjects concerning the Journal's aim or future direction. A non-structured abstract is not required.

Words: max 1500 (excluding figures and tables)

Figures/Tables: max 2

References: max 15

Technical briefs

Technical briefs are papers on methodological comparisons, new method development or other methodological approaches. They should have a short Introduction, Methods, Results and a brief Conclusion.

Words: max 3000 (excluding figures and tables)

Figures/Tables: max 5

References: max 20

Short communications

This article type reports of results from original researches. They must provide conclusive findings: preliminary observations or incomplete findings cannot be considered for publication. A non-structured abstract is required.

Words: max 2000 (excluding figures and tables)

Figures/Tables: max 3

References: max 20

Case reports

Case reports will be accepted if they describe a previously undescribed clinical case and are of very high importance for dissemination. Case reports must be structured as follows: Introduction (explaining the importance of the case), Case Description (providing all relevant information), and Conclusions (describing the detailed outcome of the report). A structured abstract is required.

Words: max 2000 (excluding figures and tables)

Figures/Tables: max 3

References: max 10

Correspondence

Letters to the Editor are intended to present opinions or comments on articles published in the Journal. Letters are subject to abridgement and editing for style and content. An abstract is not required.

If you are the corresponding author of an article cited in a Letter to the Editor and receive an email invitation to comment on it, you must log in to the system, accept the invitation immediately, and then upload and submit your reply to the Editorial Office. The response must cite the title of the letter, e.g., “Response to (Title of Letter)”.

Words: max 750 (excluding figures and tables)

Figures/Tables: 1

References: max 5

Perspectives

Papers in this section should present a new vision or perspective of recent developments. Articles in this section may comment on the role of research policies and infrastructures. They may also address unsolved controversies arising in current research. A non-structured abstract of no longer than 200 words is required.

Words: max 2000 (excluding figures and tables)

Figures/Tables: max 2

References: max 10

3.3 Writing your paper

The Sage Author Gateway has some general advice and on [how to get published](#), plus links to further resources.

3.3.1 Make your article discoverable

When writing up your paper, think about how you can make it discoverable. *The title, keywords and abstract are key to ensuring readers find your article through search engines such as Google. For information and guidance on how best to title your article, write your abstract and select your keywords, have a look at this page on the Gateway: [How to Help Readers Find Your Article Online](#)*

4. Editorial policies

4.1 Peer review policy

Manuscripts that do not adhere to the guidelines for submission will be returned to the corresponding author for technical revision before undergoing the peer review process. Manuscripts with insufficient priority for publication will be rejected promptly.

Peer review is the process we use to assess the quality of a manuscript to see if it is suitable for publication. Independent researchers with similar competencies assess submitted manuscripts for originality, validity and importance to help our Editors determine if a manuscript is suitable for publication in their journal.

We utilise a single-anonymize peer-review system, which is considered to be self-regulating. Reviewers are aware of the names and affiliations of the authors, but the reviewer assessments provided to authors are completely anonymous.

The single-anonymize peer review system is the most commonly-used method of review and most Reviewers are comfortable with this approach, as it facilitates an impartial appraisal of a manuscript.

Submitted manuscripts are reviewed by two or more referees who evaluate whether the manuscript is scientifically logical and well-constructed, focussing specifically on if it duplicates previously published work, and if there are clear grounds for it to be considered for publication. The Editors establish their decision based on these reports and, if necessary, they can discuss with members of the Editorial Board.

We aim to provide authors with a first decision (of accept, reject or revisions required whether minor or major) within 4 weeks.

All correspondence related to the submission, including editorial decisions, will be sent by email to the corresponding author. In case of revision, detailed revision instructions will be sent and a point-by-point response will be required. The Journal does not reveal the identity of its reviewers.

Authors can check the status of their manuscript at any time by logging into the journal's submission system, Sage track.

Appeals and complaints

If you would like to appeal a rejection decision or make a complaint, please contact the Publisher who will outline the journal's complaints procedure.

As part of the submission process you will be asked to provide the names of a minimum of 2 peers who could be called upon to review your manuscript. Recommended reviewers should be experts in their fields and should be able to provide an objective assessment of the manuscript. Please be aware of any conflicts of interest when recommending reviewers. Examples of conflicts of interest include (but are not limited to) the below:

- The reviewer should have no prior knowledge of your submission
- The reviewer should not have recently collaborated with any of the authors
- Reviewer nominees from the same institution as any of the authors are not permitted

You will also be asked to nominate peers who you do not wish to review your manuscript (opposed reviewers).

Please note that the Editors are not obliged to invite/reject any recommended/opposed reviewers to assess your manuscript.

The Editor or members of the Editorial Board may occasionally submit their own manuscripts for possible publication in the journal. In these cases, the peer review process will be managed by alternative members of the Board and the submitting Editor/Board member will have no involvement in the decision-making process.

The International Journal of Biological Markers is committed to delivering high quality, fast peer-review for your paper, and as such has partnered with Publons. Publons is a third party service that seeks to track, verify and give credit for peer review. Reviewers for Journal Title can opt in to Publons in order to claim their reviews or have them automatically verified and added to their reviewer profile. Reviewers claiming credit for their review will be associated with the relevant journal, but the article name, reviewer's decision and the content of their review is not published on the site. For more information visit the [Publons](#) website.

4.2 Authorship

Papers should only be submitted for consideration once consent is given by all contributing authors. Those submitting papers should carefully check that all those whose work contributed to the paper are acknowledged as contributing authors.

The list of authors should include all those who can legitimately claim authorship. This is all those who:

- Made a substantial contribution to the concept or design of the work; or acquisition, analysis or interpretation of data,
- Drafted the article or revised it critically for important intellectual content,
- Approved the version to be published,
- Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content.

Authors should meet the conditions of all of the points above. When a large, multicentre group has conducted the work, the group should identify the individuals who accept direct responsibility for the manuscript. These individuals should fully meet the criteria for authorship.

Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group alone does not constitute authorship, although all contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in the Acknowledgments section. Please refer to the [International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\) authorship guidelines](#) for more information on authorship.

Please note that AI chatbots, for example ChatGPT, should not be listed as authors. For more [information see the policy on Use of ChatGPT and generative AI tools](#).

4.3 Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an Acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, or a department chair who provided only general support.

Any acknowledgements should appear first at the end of your article prior to your Declaration of Conflicting Interests (if applicable), any notes and your References.

4.3.1 Third party submissions

Where an individual who is not listed as an author submits a manuscript on behalf of the author(s), a statement must be included in the Acknowledgements section of the manuscript and in the accompanying cover letter. The statements must:

- Disclose this type of editorial assistance – including the individual's name, company and level of input
- Identify any entities that paid for this assistance
- Confirm that the listed authors have authorized the submission of their manuscript via third party and approved any statements or declarations, e.g. conflicting interests, funding, etc.

Where appropriate, Sage reserves the right to deny consideration to manuscripts submitted by a third party rather than by the authors themselves.

4.3.2 Writing assistance

Individuals who provided writing assistance, e.g. from a specialist communications company, do not qualify as authors and so should be included in the Acknowledgements section. Authors must disclose any writing assistance – including the individual's name, company and level of input – and identify the entity that paid for this assistance. It is not necessary to disclose use of language polishing services.

4.4 Funding

The International Journal of Biological Markers requires all authors to acknowledge their funding in a consistent fashion under a separate heading. Please visit the [Funding Acknowledgements](#) page on the Sage Journal Author Gateway to confirm the format of the acknowledgment text in the event of funding, or state that: This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

4.5 Declaration of conflicting interests

It is the policy of *The International Journal of Biological Markers* to require a declaration of conflicting interests from all authors enabling a statement to be carried within the paginated pages of all published articles.

Please ensure that a 'Declaration of Conflicting Interests' statement is included at the end of your manuscript, after any acknowledgements and prior to the references. If no conflict exists, please state that 'The Author(s) declare(s) that there is no conflict of interest'.

For guidance on conflict of interest statements, please see the ICMJE recommendations [here](#)

4.6 Research ethics and patient consent

Medical research involving human subjects must be conducted according to the [World Medical Association Declaration of Helsinki](#)

Submitted manuscripts should conform to the [ICMJE Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#), and all papers reporting animal and/or human studies must state in the methods section that the relevant Ethics Committee or Institutional Review Board provided (or waived) approval. Please ensure that you have provided the full name and institution of the review committee, in addition to the approval number.

For research articles, authors are also required to state in the methods section whether participants provided informed consent and whether the consent was written or verbal.

Information on informed consent to report individual cases or case series should be included in the manuscript text. A statement is required regarding whether written informed consent for patient information and images to be published was provided by the patient(s) or a legally authorized representative.

Please also refer to the [ICMJE Recommendations for the Protection of Research Participants](#)

All research involving animals submitted for publication must be approved by an ethics committee with oversight of the facility in which the studies were conducted. Experimental research performed on animals must comply with the [NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#) or equivalent. A statement that research has been performed according to the NIH Guidelines must be included in the Methods section.

4.7 Clinical trials

The International Journal of Biological Markers endorses the [ICMJE requirement](#) that clinical trials are registered in a WHO-approved public trials registry at or before the time of first patient enrolment. However, consistent with the [AllTrials campaign](#), retrospectively registered trials will be considered if the justification for late registration is acceptable. The trial registry name and URL, and registration number must be included at the end of the abstract.

4.8 Reporting guidelines

The relevant [EQUATOR Network](#) reporting guidelines should be followed depending on the type of study. For example, all randomized controlled trials submitted for publication should include a completed [CONSORT flow chart](#) as a cited figure and the completed [CONSORT checklist](#) should be uploaded with your submission as a supplementary file. Systematic reviews and meta-analyses should include the completed [PRISMA](#) flow chart as a cited figure and the completed PRISMA checklist should be uploaded with your submission as a supplementary file. The [EQUATOR wizard](#) can help you identify the appropriate guideline.

Other resources can be found at [NLM's Research Reporting Guidelines and Initiatives](#)

4.9 Data

Sage acknowledges the importance of research data availability as an integral part of the research and verification process for academic journal articles.

The International Journal of Biological Markers requests all authors submitting any primary data used in their research articles alongside their article submissions to be published in the online version of the journal, or provide detailed information in their articles on how the data can be obtained. This information should include links to third-party data repositories or detailed contact information for third-party data sources. Data available only on an author-maintained website will need to be loaded onto either the journal's platform or a third-party platform to ensure continuing accessibility. Examples of data types include but are not limited to statistical data files, replication code, text files, audio files, images, videos, appendices, and additional charts and graphs necessary to understand the original research. The editor can also grant exceptions for data that cannot legally or ethically be released. All data submitted should comply with Institutional or Ethical Review Board requirements and applicable government regulations. For further information, please contact the editorial office at: journal.biomarkers@aulss3.veneto.it

5. Publishing Policies

5.1 Publication ethics

Sage is committed to upholding the integrity of the academic record. We encourage authors to refer to the Committee on Publication Ethics' [International Standards for Authors](#) and view the Publication Ethics page on the [Sage Author Gateway](#)

5.1.1 Plagiarism

The International Journal of Biological Markers and Sage take issues of copyright infringement, plagiarism or other breaches of best practice in publication very seriously. We seek to protect the rights of our authors and we always investigate claims of plagiarism or misuse of published articles. Equally, we seek to protect the reputation of the journal against malpractice. Submitted articles may be checked with duplication-checking software. Where an article, for example, is found to have plagiarised other work or included third-party copyright material without permission or with

insufficient acknowledgement, or where the authorship of the article is contested, we reserve the right to take action including, but not limited to: publishing an erratum or corrigendum (correction); retracting the article; taking up the matter with the head of department or dean of the author's institution and/or relevant academic bodies or societies; or taking appropriate legal action.

5.1.2 Prior publication

If material has been previously published it is not generally acceptable for publication in a Sage journal. However, there are certain circumstances where previously published material can be considered for publication. Please refer to the guidance on the [Sage Author Gateway](#) or if in doubt, contact the Editor at the address given below.

5.2 Contributor's publishing agreement

Before publication Sage requires the author as the rights holder to sign a Journal Contributor's Publishing Agreement. The International Journal of Biological Markers publishes manuscripts under [Creative Commons licenses](#). The standard license for the journal is Creative Commons by Attribution Non-Commercial (CC BY-NC), which allows others to re-use the work without permission as long as the work is properly referenced and the use is non-commercial. For more information, you are advised to visit [Sage's OA licenses page](#).

Alternative license arrangements are available, for example, to meet particular funder mandates, made at the author's request.

6. Preparing your manuscript for submission

6.1 Formatting

The preferred format for your manuscript is Word. LaTeX files are also accepted. Word and (La)Tex templates are available on the [Manuscript Submission Guidelines](#) page of our Author Gateway.

6.2 Artwork, figures and other graphics

For guidance on the preparation of illustrations, pictures and graphs in electronic format, please visit Sage's [Manuscript Submission Guidelines](#)

Figures supplied in colour will appear in colour online regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For specifically requested colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Sage after receipt of your accepted article.

6.3 Supplementary material

This journal is able to host additional materials online (e.g. datasets, podcasts, videos, images etc) alongside the full-text of the article. For more information please refer to our [guidelines on submitting supplementary files](#)

6.4 Reference style

The International Journal of Biological Markers adheres to the [Sage Vancouver](#) reference style. View the [Sage Vancouver](#) guidelines to ensure your manuscript conforms to this reference style.

If you use [EndNote](#) to manage references, you can download the [Sage Vancouver EndNote output file](#)

6.5 English language editing services

Authors seeking assistance with English language editing, translation, or figure and manuscript formatting to fit the journal's specifications should consider using Sage Language Services. Visit [Sage Language Services](#) on our Journal Author Gateway for further information.

7. Submitting your manuscript

The International Journal of Biological Markers is hosted on Sage track, a web based online submission and peer review system. Visit <https://mc.manuscriptcentral.com/tijbm> to login and submit your article online.

IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the journal in the past year it is likely that you will have had an account created. For further guidance on submitting your manuscript online please visit ScholarOne [Online Help](#).

7.1 Title, keywords and abstracts

Please supply a title, short title, an abstract and keywords to accompany your article. The title, keywords and abstract are key to ensuring readers find your article online through online search engines such as Google. Please refer to the information and guidance on how best to title your article, write your abstract and select your keywords by visiting the Sage Journal Author Gateway for guidelines on [How to Help Readers Find Your Article Online](#).

7.2 Information required for completing your submission

Provide full contact details for the corresponding author including email, mailing address and telephone numbers. Academic affiliations are required for all co-authors. These details should be presented separately to the main text of the article to facilitate anonymous peer review.

You will be asked to provide contact details and academic affiliations for all co-authors via the submission system and identify who is to be the corresponding author. These details must match what appears on your manuscript. At this stage please ensure you have included all the required statements and declarations and uploaded any additional supplementary files (including reporting guidelines where relevant).

7.3 ORCID

As part of our commitment to ensuring an ethical, transparent and fair peer review process Sage is a supporting member of ORCID, the Open Researcher and Contributor ID.

ORCID provides a unique and persistent digital identifier that distinguishes researchers from every other researcher, even those who share the same name, and, through integration in key research workflows such as manuscript and grant submission, supports automated linkages between researchers and their professional activities, ensuring that their work is recognized.

The collection of ORCID iDs from corresponding authors is now part of the submission process of this journal. If you already have an ORCID iD you will be asked to associate that to your submission during the online submission process. We also strongly encourage all co-authors to link their ORCID ID to their accounts in our online peer review platforms. It takes seconds to do: click the link when prompted, sign into your ORCID account and our systems are automatically updated. Your ORCID iD will become part of your accepted publication's metadata, making your work attributable to you and only you. Your ORCID iD is published with your article so that fellow researchers reading your work can link to your ORCID profile and from there link to your other publications.

If you do not already have an ORCID iD please follow this [link](#) to create one or visit our [ORCID homepage](#) to learn more.

7.4 Permissions

Authors are responsible for obtaining permission from copyright holders for reproducing any illustrations, tables, figures or lengthy quotations previously published elsewhere. For further information including guidance on fair dealing for criticism and review, please visit our [Frequently Asked Questions](#) on the [Sage Journal Author Gateway](#).

. On acceptance and publication

If your paper is accepted for publication after peer review, you will first be asked to complete the contributor's publishing agreement. Once your manuscript files have

been checked for Sage Production, the corresponding author will be asked to pay the article processing charge (APC) via a payment link. Once the APC has been processed, your article will be prepared for publication and can appear online within an average of 30 days. Please note that no production work will occur on your paper until the APC has been received.

8.1 Sage Production

Your Sage Production Editor will keep you informed as to your article's progress throughout the production process. Proofs will be made available to the corresponding author via our editing portal Sage Edit, or by email to the corresponding author and should be returned promptly. Authors are reminded to check their proofs carefully to confirm that all author information, including names, affiliations, sequence and contact details are correct, and that Funding and Conflict of Interest statements, if any, are accurate.

8.2 Online publication

One of the many benefits of publishing your research in an open access journal is the speed to publication. With no page count constraints, your article will be published online in a fully citable form with a DOI number as soon as it has completed the production process. At this time it will be completely free to view and download for all.

8.3 Promoting your article

Publication is not the end of the process! You can help disseminate your paper and ensure it is as widely read and cited as possible. The Sage Author Gateway has numerous resources to help you promote your work. Visit the [Promote Your Article](#) page on the Gateway for tips and advice.

[Back to top](#)

9. Further information

Any correspondence, queries or additional requests for information on the manuscript submission process should be sent to *The International Journal of Biological Markers* editorial office as follows: journal.biomarkers@aulss3.veneto.it

ANEXO H - Avaliação Scopus percentil 76%

Scopus preview - Scopus - Source X

https://www.scopus.com/sources.uri

[View CiteScore methodology.](#)

ine list

[Clear filters](#)

options

only Open Access

4-year timeframe

imum selected

um citations

um documents

ighest quartile

only titles in top 10

1 result

[Download Scopus Source List](#) [Learn more about Scopus Source List](#)

☐ All [Export to Excel](#) [Save to source list](#)

View metrics for year: 2021

Source title ↓	CiteScore ↓	Highest percentile ↓	Citations 2018-21 ↓	Documents 2018-21 ↓	% Cited ↓
☐ 1 International Journal of Biological Markers	4.9	76% 46/193 Pathology and Forensic Medicine	1.017	208	81

[Top of page](#)

Windows taskbar: Pesquisar, 25°C Chuva fraca, 17:30 12/04/2023

ANEXO I - Certificado de Premiação Prêmio Rui Curi de MELHOR TRABALHO APRESENTADO no IV Simpósio de Farmácia da UnB: E-SIMPFAR.



ANEXO J - Produtos associados direta e indiretamente com a tese.

Polimorfismo do gene CYP2D6 1846 G/A em associação com o Acidente Vascular Encefálico/Aneurisma em uma população do Distrito Federal (Brasil)

CYP2D6 1846 G/A gene polymorphism in association with Hemorrhagic Stroke/Aneurysm in patients from the Federal District (Brazil)

Lígia Canongia de Abreu Duarte¹, Caroline Ferreira Fratelli², Calliandra Maria Souza Silva², Luzitana Brandão Ferreira³,
Hélia Carla Souza³, Izabel Cristina Rodrigues da Silva²

Como citar: Duarte LCA, Fratelli CF, Silva CMS, Ferreira LB, Souza HC, Silva ICR. Polimorfismo do gene CYP2D6 1846 G/A em associação com o Acidente Vascular Encefálico/Aneurisma em uma população do Distrito Federal (Brasil). REVISA. 2019; 8(4): 496-504. Doi: <https://doi.org/10.36239/revisa.v8.n4.p496a504>

REVISA

1. Universidade de Brasília,
Programa de Pós Graduação
em Ciências e Tecnologias em
Saúde. Brasília, Distrito
Federal, Brasil.

2- Universidade de Brasília,
Brasília, Distrito Federal,
Brasil.

3- Centro Universitário de
Brasília, Brasília, Distrito
Federal, Brasil.

Recebido: 10/07/2019
Aceito: 09/09/2019

RESUMO

Objetivo: Investigar uma possível associação do gene CYP2D6 1846 G/A em pacientes que possuem AVEH/Aneurisma, residentes no Distrito Federal (Brasil) além de cruzar as informações obtidas com as manifestações clínicas e o prognóstico. **Método:** Tratou-se de um estudo caso-controle de base populacional, envolvendo 81 casos com AVEH e/ou Aneurisma. Para a genotipagem dessas amostras utilizou-se a técnica laboratorial PCR-RFLP e adotou-se o nível de significância de 5%. **Resultados:** Ao associar as frequências genotípicas e alélicas em relação ao AVEH/Aneurisma, percebeu-se que não houve diferença estatística. Em relação à média de glicemia, participantes com genótipo GG, apresentavam índices elevados desse marcador no grupo caso quando comparado ao grupo controle. **Conclusão:** A presença do polimorfismo CYP2D6 1846 G/A deve ser amplamente estudada em pesquisas futuras, pois é necessário esclarecer se tais polimorfismos representam associações ao AVEH/Aneurisma.

Descritores: Acidente Vascular Cerebral; Polimorfismo Genético; Citocromo P-450 CYP2D6; Hipertensão; Diabetes Mellitus.

ABSTRACT

Objective: To investigate a possible association of the CYP2D6 1846 G/A gene in HS/aneurysm patients residing in the Federal District (Brazil), as well as to crosscheck the information obtained with clinical manifestations and prognosis. **Method:** The investigation was a population-based case-control study involving 81 cases with HS/aneurysm. The samples genotyping employed the PCR-RFLP technique with a significance level of 5%. **Results:** The attempt to associate genotypic and allelic frequencies to the HVA/Aneurysm resulted in no statistical difference. Nevertheless, in patients with the GG genotype and hypertension, the risk for HS increased 44 times. Participants with GG genotype also had statistically higher glycemia mean levels in the case group. **Conclusion:** The presence of the CYP2D6 1846 G/A polymorphism should be extensively, as it is necessary to clarify whether such polymorphisms represent associations with HS and Intracerebral Aneurysm.

Descriptors: Stroke; genetic polymorphism; Cytochrome P-450 CYP2D6; Hypertension; Diabetes Mellitus.

ORIGINAL

Duarte LCA, Fratelli CF, Silva CMS, Ferreira LB, Souza HC, Silva ICR

Introduction

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) corresponde a uma disfunção neurológica aguda causada pela interrupção do fluxo sanguíneo em áreas do encéfalo, ocasionando diversas incapacidades, sendo que o acometimento global interfere em atividades diárias da vida do paciente.¹ Estimativas têm demonstrado que mais de um milhão de pessoas têm um AVC todo ano na Europa e que em 2025, esperam que essa estimativa suba para 1,5 milhão, devido ao envelhecimento populacional.²

Essa patologia pode ser dividido em duas categorias que apresentam semelhanças, porém diferem quanto à etiologia, fisiopatologia, tratamento médico e cirúrgico.³

O AVE hemorrágico (AVEH) é uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo sendo responsável por 10-15% de todos os casos de AVE.⁴ Essa envolve a ruptura de uma artéria intracerebral, resultando no derramamento de sangue, formando assim um hematoma.⁵ É uma doença multifatorial resultante da combinação de fatores genéticos e ambientais. Esses fatores contribuem para o aumento do risco na ocorrência do AVEH.⁶⁻⁷

O citocromo p450 família 2 subfamília D membro 6 (CYP2D6) está presente no braço longo do cromossomo 22 (22q13.1) e é responsável pela metabolização de diversos fármacos, como beta bloqueadores.⁸ Embora a enzima CYP2D6 seja mais extensivamente estudada devido a sua importância clínica, a evolução da subfamília CYP2D ainda não foi completamente compreendida.⁹ O polimorfismo CYP2D6*4 G/A resulta em uma capacidade limitada para metabolizar substâncias, tal diminuição prolonga o tempo de exposição a neurotoxinas, podendo levar a ocorrência de AVE.¹⁰

Contudo, o objetivo deste presente estudo foi investigar uma possível associação do gene CYP2D6 1846 G/A em pacientes que possuem Acidente Vascular Encefálico e ou Aneurisma Intracerebral, residentes no Distrito Federal (Brasil) além de cruzar as informações obtidas com as manifestações clínicas e o prognóstico.

Método

Sujeitos

Por ser um estudo observacional, descritivo do tipo caso-controle, os participantes da pesquisa foram divididos em dois grupos.

O grupo caso era formado por 81 pacientes, de ambos os sexos e maiores de 18 anos, que possuíam o diagnóstico de AVEH e/ou aneurisma intracerebral. Todos esses pacientes eram residentes do Distrito Federal (Brasil) e tiveram a patologia comprovada por meio de tomografia computadorizada. Neste grupo, dos 81 participantes de pesquisa encontrados, 48 pacientes (59,3%) eram portadores de AVEH e 33 pacientes (40,7%) tinham aneurisma.

Já o grupo controle, era formado por 81 indivíduos que não apresentavam a patologia em questão; de ambos os sexos; maiores de 18 anos e que não possuíam parentesco com o grupamento caso. Para serem inclusos, os

Duarte LCA, Fratelli CF, Silva CMS, Ferreira LB, Souza HC, Silva ICR

participantes do grupo controle deveriam ter realizado, há pelo menos 15 dias, alguns exames bioquímicos, como por exemplo glicemia sérica.

Logo, neste estudo, a maioria dos participantes de pesquisa eram mulheres, tanto no grupo caso (59,3%) quanto no grupo controle (53,1%). Em relação idade da população estudada, o grupo caso apresentava uma média de 53,49 anos ($\pm 5,94$), enquanto o grupo controle tinha uma média de 52,27 anos ($\pm 5,75$).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FEPECS e todos os participantes tiveram o histórico clínico detalhado e a evolução clínica acompanhados.

Métodos laboratoriais

Cada participante, após assinar o Termo de Compromisso Livre e Esclarecido (TCLE), teve 10 mL de seu sangue venoso, coletado. A partir desse sangue, algumas técnicas genéticas foram aplicadas.

O ácido desoxirribonucleico (DNA) foi extraído do sangue coletado utilizando o Invisorb Spin Blood Mini Kit (250) da Invitex (catálogo #CA10-0005, lote #1031100300) e uma concentração média de 20 ng/ μ L foi alcançada. A genotipagem do polimorfismo do *CYP2D6* foi realizada utilizando a técnica de Polymerase chain reaction (PCR) combinada com a análise de restrição do fragmento estudado no polimorfismo. Os primers utilizados na amplificação da *CYP2D6* 1846 G/A foi Senso 5'- GCC TTC GCC AAC CAC TCC -3' e Antisenso 5'- AAA TCC TGC TCT TCC GAG GC -3'. A amplificação foi realizada utilizando as seguintes condições de termociclagem: 94°C por 5 minutos (denaturação inicial), seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, acompanhada de 60 °C por 15 segundos e 72°C por 20 segundos para o anelamento dos oligonucleotídeos. A extensão final ocorreu a 72°C por 7 minutos (11).

Por fim, Os produtos da PCR de 355 pb foram incubados por 90 minutos a 60°C com a enzima BseBI (*Jena, Alemanha*). O alelo A, ou alelo mutado, não sofreu clivagem pela enzima, tendo assim um fragmento de 355pb. O alelo G apresentou dois fragmentos de DNA, um de 106 pb e outro de 250 pb. Os fragmentos foram visualizados em um gel de agarose a 4%, com brometo de etídio e exposto a luz ultravioleta.

Análise estatística

O grupo controle foi considerado dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg e a frequência dos genótipos e alelos em pacientes com AVEH e/ou Aneurisma foi estimada utilizando o programa SPSS versão 23.0. Para a comparação da distribuição das frequências dos dois grupos, o teste Qui-Quadrado foi utilizado. Associações com probabilidades menores que 5% ($p < 0,05$) foram consideradas.

Também foram estimadas as frequências de características dos participantes da pesquisa, a saber: sexo, tabagismo, etilismo, presença de hipertensão arterial sistêmica (HAS), e diabetes; por outro lado, as variáveis quantitativas idade e glicemia foram descritas em termos de suas estatísticas-resumo (média e erro padrão).

Duarte LCA, Fratelli CF, Silva CMS, Ferreira LB, Souza HC, Silva ICR

Resultados

Na tabela 1, as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo CYP2D6 1846 G/A foram descritas. Observou-se que a maioria do grupo caso (74,1%) apresentavam o genótipo GG, enquanto que o mesmo vale para o grupo controle (71,6%). Não houve diferença estatística com relação as demais frequências genotípicas ($P=0,930$). Em relação a frequência alélica, 86,4% dos pacientes com AVEH/ Aneurisma possuíam o alelo G, contra 83,3% dos participantes do grupo controle com o mesmo alelo. Tal diferença não foi estatisticamente significativa ($P=0,764$).

Tabela 1- Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo CYP2D6 nos grupos caso e controle.

CYP2D6 1846 G/A	Grupos				P*	OR	IC
	AVEH/Aneurisma		Controle				
	N	%	N	%			
GG	60	74,1	58	71,6	0,930	NA	NA
GA	17	21,0	19	23,5			
AA	4	4,9	4	4,9			
Total	81	100,0	81	100,0			
GG	60	74,1	58	71,6	0,729	1,13	0,56-2,27
GA+AA	21	25,9	23	28,4			
Total	81	100,0	81	100,0			
G	137	86,4	135	83,3	0,764	1,09	0,60-1,98
A	25	15,4	27	16,7			
Total	162	100,0	162	100,0			

NA = Não se aplica; *Teste de qui-quadrado.

Na tabela 2 avalia-se a diferença na proporção de indivíduos segundo características clínicas (HAS, Diabetes, tabagismo e etilismo) associadas ao polimorfismo CYP2D6 1846 G/A. Contudo, não houve associação entre os genótipos e a presença de HAS ($P= 0,867$), diabetes ($P= 1,00$), tabagismo ($P= 0,938$) e etilismo ($P= 0,332$).

Tabela 2- Distribuição das características clínicas: HAS, Diabetes, tabagismo e etilismo conforme o polimorfismo CYP2D6 nos participantes do estudo.

		CYP2D6 1846 G/A				P*	OR	IC
		GG		GA+AA				
		N	%	N	%			
HAS	Yes	50	42,4%	18	40,9%	0,867	1,062	(0,526 - 2,146)
	No	68	57,6%	26	59,1%			
Diabetes	Yes	2	1,7%	1	2,3%	1	0,741	(0,066 - 8,386)
	No	116	98,3%	43	97,7%			

Duarte LCA, Fratelli CF, Silva CMS, Ferreira LB, Souza HC, Silva ICR

Tabagismo	Yes	41	34,7%	15	34,1%	0,938	1,029	(0,496 - 2,135)
	No	77	65,3%	29	65,9%			
Alcoolismo	Yes	33	28,0%	9	20,5%	0,332	1,510	(0,655 - 3,482)
	No	85	72,0%	35	79,5%			

*Teste de Qui-quadrado.

A tabela 3 mede a associação entre as características clínicas e a ocorrência de AVE, nos diferentes genótipos. Sendo que, 76,7% dos participantes do grupo caso portadores do genótipo GG apresentavam HAS, contra 6,9% do grupo controle com o mesmo genótipo. Entre os participantes com genótipo GG, o risco para AVE aumentava 44 vezes no grupo caso com HAS ($P<0,001$; OR=44; 13,65 - 144,17). 66,7% dos participantes do grupo caso com genótipo GA+AA eram hipertensos, contra 17,4% do grupo controle com o mesmo genótipo. O risco para AVEH/Aneurisma em pacientes com HAS e com genótipo GA+AA aumentou em 10 vezes, quando comparado ao grupo controle ($P=0,002$; OR=10; 2,32 - 38,87).

Table 3. Clinical characteristics associated with the occurrence of HS/Aneurysm by GG and GA + AA genotype of CYP2D6 polymorphism.

		CYP2D6 1846 G/A											
		GG				GA+AA							
		Grupos				Grupos							
		AVEH/Aneurisma		Controle		AVEH/Aneurisma		Controle		AVEH/Aneurisma		Controle	
		N	%	N	%	P	OR (IC)	N	%	N	%	P	OR (IC)
HAS	Yes	46	76,7	4	6,9	<0,001*	44,36 (13,65 - 144,17)	14	66,7	4	17,4	0,002*	9,50 (2,32 - 38,87)
	No	14	23,3	54	93,1			7	33,3	19	82,6		
	Total	60	100,0	58	100,0			21	100,0	23	100,0		
Diabetes	Yes	2	3,3	0	0,0	0,496	2,0 (1,67 - 2,40)	1	4,8	0	0,0	0,477	2,15 (1,56 - 2,96)
	No	58	96,7	58	100,0			20	95,2	23	100,0		
	Total	60	100,0	58	100,0			21	100,0	23	100,0		
Tabagismo	Yes	24	40,0	17	29,3	0,223	1,61 (0,75 - 3,46)	8	38,1	7	30,4	0,592	1,41 (0,40 - 4,92)
	No	36	60,0	41	70,7			13	61,9	16	69,6		
	Total	60	100,0	58	100,0			21	100,0	23	100,0		
Alcoolismo	Yes	17	28,3	16	27,6	0,928	1,04 (0,46 - 2,32)	5	23,8	4	17,4	0,716	0,71 (0,34 - 6,48)
	No	43	71,7	42	72,4			16	76,2	19	82,6		
	Total	60	100,0	58	100,0			21	100,0	23	100,0		

* Teste qui quadrado.

Depois de verificar as frequências genotípicas e alélicas e a associação do polimorfismo com as manifestações clínicas da doença, a tabela 4 avalia a diferença de médias de glicemia entre os grupos de estudo nos diferentes genótipos. Avaliando o genótipo GG, a média de glicose no grupo caso foi 106 mg/dL, contra 96 mg/dL do grupo controle, quanto a essas diferenças de médias foi obtida diferença estatística ($P=0,004$) e a glicemia média foi maior no grupo caso do que no grupo controle.

Duarte LCA, Fratelli CF, Silva CMS, Ferreira LB, Souza HC, Silva ICR

Tabela 4- Análise da glicemia nos grupos de estudo conforme o perfil genético no polimorfismo CYP2D6.

	CYP2D6 1846 G/A									
	GG					GA+AA				
	Grupos		Grupos		P	Grupos		Grupos		P
	AVEH/Aneurism a	Controle	AVEH/Aneurism a	Controle		AVEH/Aneurism a	Controle	AVEH/Aneurism a	Controle	
	Medida	Desvio padrão	Medida	Desvio padrão		Medida	Desvio padrão	Medida	Desvio padrão	
Glucose (mg/dL)	106	21	96	7	0,004*	107	27	96	7	0,126

*P<0.05.

Discussão

O AVE é a segunda maior causa de mortalidade global entre as doenças cardiovasculares, especialmente em adultos e idosos. Na América Latina, o Brasil permanece como um dos países com maior risco de morte prematura por AVE.¹² De acordo com o Relatório de Saúde da OMS, 5,5 milhões de pessoas morrem por ano em decorrência do AVE. Em todo o mundo, enormes quantias de dinheiro e materiais estão envolvidas no tratamento desta doença. No entanto, métodos para identificar pessoas com alto risco de ocorrência do AVE são limitados e os mecanismos moleculares envolvidos neste trabalho são fundamentais para resolver tal problema.¹³

Neste estudo, a incidência de AVEH e/ou aneurisma foi ligeiramente maior em mulheres (59,3%, n= 48) do que em homens (40,7%, n = 33), sendo que a média de idade do grupo caso foi de 53 anos.

Silva⁶, analisaram aspectos topográficos e epidemiológicos dos pacientes, bem como, o nível de gravidade na admissão e alta hospitalar e situação clínica do paciente após um ano da alta. Dos 148 pacientes com diagnóstico de AVEH, 77 (52%) eram do sexo masculino e 71 (48%) do sexo feminino. A faixa etária variou de 20 a 92 anos de idade, tendo maior número de casos no sexo masculino. Do total de casos houve 57 óbitos (38,5%), com maior número de mortes nas faixas de 40 a 59 com pequena diferença entre os gêneros, sendo a taxa de letalidade foi maior para o sexo feminino (43,7%) nas faixas de 40 a 59.

O citocromo P450 (CYP representa uma grande família de hemoproteínas. Biologicamente, participam do metabolismo de alguns componentes endógenos, como hormônios e colesterol.¹⁴ O gene CYP2D6 codifica a enzima CYP2D6. Essa enzima é pertencente ao sistema citocromo p450, expressa não somente no fígado mas também no SNC, tendo assim um papel central na catalização de metabólitos de fármacos e toxinas biológicas. A mutação CYP2D6*4 é causada pela transição de G para A, o que resulta em uma capacidade limitada para metabolizar substâncias. A diminuição da atividade de CYP2D6 pode prolongar o tempo de exposição a neurotoxinas, induzindo a danos nas células do SNC. Tal hipótese pode ser suspeita por desempenhar papel na patogênese do AVE, doenças de Parkinson e doença de Alzheimer.¹⁵

No presente estudo o polimorfismo CYP2D6*4 não evidenciou diferença estatística quanto aos diferentes genótipos (tabela 1). Contudo, foi possível observar que entre os participantes com genótipo GG, o risco para AVE

Duarte LCA, Fratelli CF, Silva CMS, Ferreira LB, Souza HC, Silva ICR

aumentava 44 vezes no grupo caso com HAS ($P < 0,001$, $OR = 44$, 13,65-144,17), e entre os participantes com genótipo GA+AA o risco para AVEH/Aneurisma em pacientes com HAS aumentou em 10 vezes (tabela 3). O genótipo parece ter influência quando dividiu-se os grupos de estudo (tabela 3), mas não quando se considerou todos os participantes de pesquisa (tabela 2), sendo que o genótipo dominante parece favorecer mais fortemente o risco de hipertensão.

Os fatores de risco que estão ligados ao AVE são: Hipertensão arterial, diabetes melitus, sedentarismo, doenças cardíacas, tabagismo, obesidade e predisposição genética.¹⁶ Na hipertensão arterial sistêmica, apesar da disponibilidade de medicamentos anti-hipertensivos com diferentes mecanismos de ação, grande parte dos hipertensos tratados, os níveis ideais de pressões sanguíneas não são alcançados. O polimorfismo CYP2D6 faz com que pacientes possam ser caracterizados como metabolizadores ultrarrápidos, metabolizadores intermediários ou metabolizadores lentos de drogas. Estes últimos correspondem a 7% a 10% da população de indivíduos caucasianos.¹⁷

Em um estudo Egípcio por ALI et al. (2013), foram comparados casos de hipertensão e controles em relação às variantes alélicas genótípicas do gene CYP2D6, os casos de hipertensão mostraram presença do genótipo homozigoto dominante significativamente maior em comparação aos controles ($P = 0,01$). Esse fenômeno também se manifestou entre os casos de subgrupos com obesidade que apresentaram formas homozigóticas mutantes significativamente menores do que os controles obesos ($P = 0,040$), casos com lesões cardíacas ($P = 0,008$) e complicações ($P = 0,010$).¹⁸

Neste trabalho, a dosagem de glicose média foi mais alta no grupo caso quando comparada ao grupo controle em ambos genótipos, GG ($P = 0,004$) e GA+AA ($P = 0,126$) do polimorfismo CYP2D6. Em um estudo de caso controle, foi estudado o polimorfismo do CYP2D6 associado ao desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2, na população da Bósnia e Herzegovina. Neste estudo, demonstrou-se que não havia uma relação do genótipo e o diabetes na população indicada. Logo, os autores citam como limitação da pesquisa as diferenças nas características étnicas, seja estilo de vida, fatores ambientais, antecedentes genéticos, além do número de participantes da pesquisa, que eram 37 participantes no grupo caso e 44 no grupo controle.¹⁹

Conclusão

A presença da Hipertensão Arterial Sistêmica é um fator de risco para a ocorrência de AVEH/Aneurisma. Além disso, foi possível perceber que existe um aumento na glicemia em pacientes diagnosticados com a patologia estudada.

Quando foi analisado as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo CYP2D6 1846 G/A, percebeu-se que não houve diferença estatística com a distribuição em associação a patologia.

Ao analisar a ocorrência de AVEH/Aneurisma, em diferentes genótipos, com as características clínicas (Hipertensão Arterial, Diabetes, Tabagismo e Etilismo), entre os participantes com genótipo GG, o risco de AVEH aumentava em 44 vezes no grupo com HAS, sendo que o risco para o desfecho em pacientes com HAS e genótipo GA+AA aumentou em 10 vezes quando comparado ao grupo controle.

Duarte LCA, Fratelli CF, Silva CMS, Ferreira LB, Souza HC, Silva ICR

Em relação a variável glicemia, a sua média foi maior no grupo caso do que no grupo controle, sendo que, no genótipo GG, a maior média de glicose no grupo caso, foi estatisticamente significativa.

A presença do polimorfismo CYP2D6 1846 G/A deve ser amplamente estudado em pesquisas futuras, e os resultados desta pesquisa podem ser úteis a outros estudos de associação a doenças ligadas a genes. A influência possível sobre a expressão dos genes desta pesquisa continua a ser elucidada, portanto mais estudos de associação, em outras populações, devem ser realizados para esclarecer se tais polimorfismos representam associações ao AVEH e Aneurisma Intracerebral.

Agradecimento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. FAP-DF.

Referências

1. Medeiros C, Fernandes S, Lopes J, Cacho E, Cacho R. Effects of mirror therapy through functional activities and motor standards in motor function of the upper limb after stroke. *Fisioter e Pesqui.* 2014;21(3):264-70.
2. Wajngarten M, Silva GS. Ischaemic Heart Disease , Stroke and Risk Factors Hypertension and Stroke : Update on Treatment Ischaemic Heart Disease , Stroke and Risk Factors. *Radcliffe Cardiol.* 2019;14(2):111-5.
3. Montaner J, Mendioroz M, Delgado P, García-Berrocso T, Giralt D, Merino C, et al. Differentiating ischemic from hemorrhagic stroke using plasma biomarkers: The S100B/RAGE pathway. *J Proteomics* [Internet]. 2012;75(15):4758-65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.01.033>
4. Mota DVN, Meireles ALF de, Viana MT, Almeida R de C de A. Mirror therapy for upper limb rehabilitation in chronic patients after stroke. *Fisioter em Mov.* 2016;29(2):287-93.
5. Kumar A, Aakriti, Gupta V. A review on animal models of stroke: An update. *Brain Res Bull* [Internet]. 2016;122:35-44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.02.016>
6. Silva MV DA. Aspectos clínicos e epidemiológicos dos casos de acidente vascular encefálico hemorrágico intraparenquimatoso: perfil epidemiológico em uma série monocêntrica no Distrito Federal. 2013.
7. Hopewell JC, Clarke R. Emerging Risk Factors for Stroke: What Have We Learned from Mendelian Randomization Studies? *Stroke.* 2016;47(6):1673-8.
8. Bezerra LS, Santos-Veloso MAO, Bezerra Junior NDS, Fonseca LC Da, Sales WLA. Impacts of Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) Genetic Polymorphism in Tamoxifen Therapy for Breast Cancer. *Rev Bras Ginecol e Obstet.* 2018;40(12):794-9.
9. Yasukochi Y, Satta Y. Molecular evolution of the CYP2D subfamily in primates: Purifying selection on substrate recognition sites without the frequent or long-tract gene conversion. *Genome Biol Evol.* 2015;7(4):1053-67.
10. De Leon J, Armstrong SC, Cozza KL. Clinical guidelines for psychiatrists for

Duarte LCA, Fratelli CF, Silva CMS, Ferreira LB, Souza HC, Silva ICR

the use of pharmacogenetic testing for CYP450 2D6 and CYP450 2C19. *Psychosomatics*. 2006;47(1):75-85.

11. Nepomnyashchikh DL, Vavilin VA, Aidagulova S V., Makarova SI, Karavaeva Y, Shchepotina EG, et al. Cytochrome P450 2D6 polymorphism is a molecular genetic marker of liver cirrhosis progression. *Bull Exp Biol Med*. 2012;152(5):633-6.

12. da Silva JK, dos Anjos KF, Santos VC, Boery RNS de O, Santa Rosa D de O, Boery EN. Intervenções para cuidadores de sobreviventes de acidente vascular cerebral: revisão sistemática. *Rev Panam Salud Pública*. 2018;42(4):1-9.

13. Gu L, Wu G, Long J, Su L, Yan Y, Chen Q, et al. The role of TNF- α 308G>A polymorphism in the risk for ischemic stroke. *Am J Med Sci*. 2013;345(3):227-33.

14. Hernández FL. Estudio de las bases genéticas de la diabetes tipo 2: Identificación de variantes de baja frecuencia mediante secuenciación masiva. Universidad politécnica de Calencia. 2019.

15. Lu Y, Qin X, Li S, Zhang X, He Y, Peng Q, et al. Quantitative assessment of CYP2D6 polymorphisms and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. *J Neurol Sci*. 2014;343(1-2):15-22.

16. Ramos JM. Análise De Equilíbrio E Funcionalidade Em Indivíduos Hemiparéticos Pós-Ave. *Ciências Biológicas e Saúde Unit* [Internet]. 2018;5(1):103-16. Available from:

http://www.scielo.br/pdf/eins/v16n1/pt_1679-4508-eins-S1679-45082018AO4247.pdf

17. Sandrim VC, Tanus-Santos JE. O conhecimento em farmacogenômica pode auxiliar no controle da pressão arterial em pacientes com hipertensão de difícil controle? *J Hypertens*. 2008;15(1):34-6.

18. Ali AAA, Wassim NM, Dowaidar MM, Yaseen AE. Genetic polymorphism of CYP2D6 gene among Egyptian hypertensive cases. *J Basic Appl Zool* [Internet]. 2013;66(4):228-33. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jobaz.2012.12.002>

19. Semiz S, Dujic T, Ostanek B, Prnjavorac B, Bego T, Malenica M, et al. Analysis of CYP2C9*2, CYP2C19*2, and CYP2D6*4 polymorphisms in patients with type 2 diabetes mellitus. *Bosn J Basic Med Sci*. 2010;10(4):287-91.

Autor Correspondente
Izabel Cristina Rodrigues da Silva.
Campus Universitário, no number, Centro
Metropolitano. CEP: 72220-275. Brasília,
Distrito Federal, Brasil.
belbiomedica@gmail.com

Associação do polimorfismo do gene *CHGA* em pacientes com acidente vascular encefálico hemorrágico e/ou aneurisma

Association of the CHGA gene polymorphism in patients with hemorrhagic stroke and/or aneurysm

Joanilson C. M. Santos Jr.¹; Caroline F. Fratelli¹; Alan Cristian F. Nóbrega¹; Suzana Cristina Rodrigues¹; Lígia Canongia A. C. Duarte¹; Calliandra Maria S. Silva¹; Jonathan D. Lima¹; Luzitana B. Ferreira²; Daniel O. Freire³; Vivian Taís F. Cipriano³; Izabel Cristina R. Silva¹; Hêlia Carla Souza²

1. Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, Brasília, Distrito Federal, Brasil. 2. Centro Universitário de Brasília (Uniceub), Brasília, Distrito Federal, Brasil. 3. Faculdade Ls, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

RESUMO

Introdução: Doenças cerebrovasculares têm sido ligadas a diversos genes. A cromogranina A (*CHGA*) é utilizada como um marcador em doenças cardiovasculares. Portanto, avaliar o polimorfismo e verificar a associação com essa patologia é muito importante para melhor compreensão dessa doença. **Objetivo:** O foco do estudo foi identificar a associação entre o polimorfismo na região codante posição -264 do gene *CHGA* (*Glu264Asp*) e o acidente vascular encefálico hemorrágico (AVEH)/aneurisma no Distrito Federal, Brasil. **Métodos:** Estudo caso-controle de base populacional, envolvendo 45 casos com AVEH e/ou aneurisma. Para a genotipagem dessas amostras, utilizou-se a técnica laboratorial reação em cadeia da polimerase-polimorfismo de comprimento de fragmento de limitação (PCR-RFLP). Nível de significância de 5% foi adotado. **Resultados:** A ausência do genótipo CC do polimorfismo *Glu264Asp* *CHGA* nos participantes do estudo e a presença significativa do genótipo heterozigoto GC foram verificadas. No entanto, a distribuição dos genótipos não diferiu estatisticamente nos grupos. **Conclusão:** O polimorfismo *Glu264Asp* *CHGA* parece não contribuir para a gênese da expressão da proteína *CHGA* nesse grupo de pacientes, mas revela se existe ou não uma possível associação da patologia em questão e se a mutação contribuirá para a terapia gênica e melhorará a qualidade de vida dos pacientes.

Unitermos: polimorfismo genético; cromogranina A; acidente vascular cerebral.

ABSTRACT

Introduction: Cerebrovascular diseases have been associated with several genes. Chromogranin A (*CHGA*) has been used as marker in cardiovascular disease. Therefore, evaluating the polymorphism and verifying its association with this pathology is very important to better understand this disease. **Objective:** The aim of this study was to identify the association between coding region polymorphism in -264 position of the *CHGA* gene (*Glu264Asp*) and hemorrhagic stroke (HS)/aneurysm in the Federal District, Brazil. **Methods:** This is a population-based case-control, involving 45 cases with HS and/or aneurysm. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method is used for genotyping these samples. A significance level of 5% was adopted. **Results:** The absence of the CC genotype the *Glu264Asp* *CHGA* polymorphism in the study participants and the significant presence of the GC heterozygote genotype were observed in this study. However, the distribution of genotypes did not differ statistically in the groups. **Conclusion:** The *Glu264Asp* *CHGA* polymorphism does not seem to contribute to the genesis of the *CHGA* protein expression in this patients group, but to understand whether or not there is a possible association of the pathology in question and whether the mutation will contribute in the gene therapy and thus to improve patients' quality of life.

Key words: genetic polymorphism; chromogranin A; hemorrhagic stroke.

Primeira submissão em 18/04/19; última submissão em 22/04/19; aceito para publicação em 04/08/19; publicado em 03/03/20

RESUMEN

Introducción: Enfermedades cerebrovasculares han sido vinculadas a diversos genes. La cromogranina A (CgA) es utilizada como un marcador en enfermedades cardiovasculares. Por consiguiente, evaluar el polimorfismo y verificar la asociación con esa patología es muy importante para la mejor comprensión de la enfermedad. **Objetivo:** El enfoque del ensayo fue identificar la asociación entre el polimorfismo en la región codificante en la posición -264 del gen *CHGA* (Glu264Asp) y el accidente cerebrovascular hemorrágico (ACVH)/aneurisma en Distrito Federal, Brasil. **Métodos:** Estudio de caso-control de base poblacional, involucrando 45 casos con ACVH y/o aneurisma. Para el genotipaje de las muestras, se utilizó la técnica de laboratorio reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Nivel de significación elegido: 5%. **Resultados:** Ausencia del genotipo CC del polimorfismo Glu264Asp *CHGA* en los participantes del ensayo y presencia significativa del genotipo heterocigoto GC. Sin embargo, la distribución de los genotipos no difirió estadísticamente en los grupos. **Conclusión:** El polimorfismo Glu264Asp *CHGA* parece no contribuir para la génesis de la expresión de la proteína CgA en este grupo de pacientes, pero revelar si existe o no una posible asociación de la patología en cuestión y si la mutación contribuirá para la terapia genética y mejorará la calidad de vida de los pacientes.

Palabras clave: polimorfismo genético; cromogranina A; accidente cerebrovascular.

INTRODUÇÃO

O acidente vascular encefálico (AVE), também conhecido como acidente vascular cerebral (AVC), consiste em uma disfunção neurológica aguda, de origem vascular, seguida de ocorrência súbita de sinais e sintomas relacionados com o comprometimento de áreas focais no cérebro, onde os sintomas persistem acima de 24 horas de duração⁽¹⁾. Segundo a Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares (2016), essa patologia é a que mais ocasiona morte em brasileiros: a cada ano, 17 milhões de indivíduos têm um AVC no mundo; 6,5 milhões morrem; e 26 milhões ficam incapacitados permanentemente⁽²⁾.

O aneurisma intracerebral pode ser definido como uma dilatação anormal em um ponto da parede das artérias do polígono arterial de Willis. Nos Estados Unidos, 27 mil novos casos de hemorragia subaracnoidea ocorrem a partir da ruptura de aneurisma, e 5% a 15% se desenvolvem para AVE hemorrágico (AVEH)^(3,4).

De modo geral, o AVE tem como principal característica a falta de aporte sanguíneo em uma determinada região cerebral, que pode ser ocasionada pela ruptura ou obstrução arterial. Divide-se em duas categorias: isquêmico e hemorrágico, que apresentam semelhanças, mas se diferem quanto a fisiologia, etiologia e tratamentos⁽⁵⁾.

O acidente vascular encefálico isquêmico (AVEI) caracteriza-se pela interrupção do fluxo sanguíneo em determinada região cerebral. Geralmente, essa interrupção ocorre pela presença de um trombo, ou seja, um processo de coagulação sanguínea inadequado, na artéria ou na veia, com agregados bacterianos e células inflamatórias⁽⁶⁾. O AVEH é resultado de uma fragilidade vascular que pode levar à ruptura de um vaso e consequentemente ao extravasamento

sanguíneo em regiões do cérebro⁽⁷⁾; possui a hipertensão arterial sistêmica (HAS) como principal patologia associada⁽⁸⁾.

Atualmente, o diagnóstico dessa patologia é dado com base no histórico clínico do paciente e com o auxílio da tomografia computadorizada (TC). Os sintomas podem variar e estão relacionados com diferentes áreas do cérebro. É comum que haja alteração neurológica que interfira na fala, na visão, na cognição, na sensibilidade, no equilíbrio e nos movimentos⁽⁹⁾. Assim como as diversas doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) encontradas comumente na população mundial, o AVE é uma doença multifatorial que se relaciona com uma série de fatores que influenciam o seu desenvolvimento: os ambientais e os genéticos^(10,11). Portanto, identificar as causas, com a ajuda de algumas tecnologias da área da saúde, é importante para compreender determinada patologia e conseguir proporcionar melhor qualidade de vida ao paciente, pois essa doença exige certa dependência física. Esse tipo de dependência gera alterações sociais, emocionais e econômicas, além de isolamento, ocasionando transtornos neuropsiquiátricos^(12,13).

A cromogranina A (CHGA) é uma glicoproteína de secreção ácida localizada no cromossomo 14q32.12. Essa glicoproteína tem sido utilizada como biomarcador de tumores em tecidos neuroendócrinos, além de doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas, hipertensão, doenças cardiovasculares e insuficiência renal e hepática⁽¹⁴⁾. Avaliar o polimorfismo de qualquer gene é um grande desafio, ainda mais em relação ao gene *CHGA*, pois são poucos os estudos que relacionam a sua mutação a uma patologia. Entre as diversas regiões desse gene, a troca de base G/A na *CHGA*-264 tem demonstrado ser um fator de diminuição da expressão dessa proteína.

Joantilson C. M. Santos Jr.; Caroline F. Pratielli; Alan Cristian F. Nóbrega; Suzana Cristina Rodrigues; Ligia Canongia A. C. Duarte; Calliandra Maria S. Silva; Jonathan D. Lima; Lutziano R. Ferreira; Daniel O. Freire; Vivian Taís F. Cipriano; Izabel Cristina R. Silva; Hêlita Carla Souza

Com base no que foi exposto, os objetivos deste estudo são verificar a frequência do polimorfismo da *CHGA-264* G/A em uma amostra populacional brasileira de indivíduos portadores de AVEH e/ou aneurisma intracerebral, bem como investigar uma possível associação entre o polimorfismo G/A da *CHGA*, na região codante, com diferentes manifestações clínicas e analisar essa associação no prognóstico dos pacientes em relação à patologia estudada.

MÉTODOS

Composição

O estudo composto por 97 pacientes foi conduzido na Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília (UnB), Brasil. As amostras que compõem este estudo caso-controle foram obtidas no Hospital de Base entre janeiro de 2011 e dezembro de 2012. No total, 45 indivíduos diagnosticados com AVEH e/ou aneurisma intracerebral (32 mulheres e 13 homens; idade média 52 ± 1 ano) foram recrutados para este estudo. Todos os pacientes apresentavam os sinais clínicos descritos na definição da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre AVE; esses sinais também foram confirmados por imagem [TC ou ressonância magnética (RM)].

O grupo-controle foi composto por 52 indivíduos (31 mulheres e 21 homens; idade média 51 ± 1 ano) considerados saudáveis; eles foram pareados por idade e sexo. Todos eram voluntários e acompanhavam os pacientes no ambulatório geral. A amostra foi calculada estimando uma prevalência de 2% de AVEH/aneurisma na população adulta; erro de amostragem de 5%; e intervalo de confiança (IC) de 95%, nos 112 pacientes avaliados segundo os critérios descritos anteriormente. No total, 24 participantes foram incluídos. Consideramos a amostra de 45 pacientes com AVEH a fim de compensar qualquer perda.

O termo de consentimento foi obtido de todos os participantes, antes da coleta das informações. O estudo foi aprovado por um comitê de ética institucional. Participantes menores de 18 anos, sem o diagnóstico de AVEH e/ou aneurisma, ou aqueles que possuíam algum tipo de parentesco com o grupo-controle foram excluídos.

Características clínicas

O histórico detalhado e a evolução clínica foram acompanhados. Pacientes foram questionados se tinham hipertensão (pressão arterial foi mensurada) ou diabetes, se eram tabagistas e se faziam uso de álcool. Escalas foram usadas para mensurar severidade, estágios da doença e incapacidade dos pacientes: Rankin Scale (RS) para verificar capacidade motora; Barthel index (BI) para mobilidade e cuidado pessoal; e Glasgow Scale para nível de consciência do paciente. Além disso, exames bioquímicos, como

glicose, creatinina e plaquetas, foram obtidos por meio da ficha clínica do paciente.

Métodos laboratoriais

Cada indivíduo deste estudo, caso e controle, forneceu amostra de 5 ml de sangue venoso. O ácido desoxirribonucleico (DNA) foi extraído do sangue coletado utilizando o *Invisorb Spin Blood Mini Kit* (250) da Invitex (catálogo #CA10-0005, lote #1031100300). A genotipagem do polimorfismo da *CHGA-264* G/A foi realizada usando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) combinada com a análise de restrição do fragmento estudado no polimorfismo. Os *primers* utilizados na amplificação da *CHGA-264* G/A foram senso 5'-AGGGTGGCAGGCAAGAG-3' e antissenso 5'-AAGGTGGAATGAGGTATGG-3'. A amplificação foi realizada com base nas seguintes condições de termociclagem: 94°C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, acompanhada de 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto para o anelamento dos *primers*. Por último, fez-se o processo de extensão a 72°C por 7 minutos. Os produtos da PCR de 235 pb foram incubados por 90 minutos a 37°C com a enzima DPN1. O alelo G não sofreu clivagem pela enzima, tendo assim um fragmento de 235 pb. O alelo A apresentou dois fragmentos de DNA, um de 106 pb e outro de 129 pb. Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose a 3% com brometo de etídio e expostos à luz ultravioleta.

Análise estatística

A frequência dos genótipos e alelos em pacientes com AVEH e/ou aneurisma foi comparada com o grupo-controle usando o teste Qui-Quadrado nos modelos recessivo e dominante. O teste Armitage foi feito para verificar se há efeito da dosagem no alelo de risco para AVEH/aneurisma. A associação com as características clínicas e cada genótipo foi analisada por meio do Qui-Quadrado, adotando um nível de significância de 5%. Para análise de diferença das médias dos exames laboratoriais nos diferentes genótipos, foi realizado um teste *t* de Student, uma vez que as pressuposições de normalidade foram observadas.

RESULTADOS

Na **Tabela 1**, as frequências genotípicas foram descritas. A ausência do genótipo CC nos dois grupos foi observada, mas uma alta prevalência de indivíduos heterozigotos (GC) na amostragem foi verificada. Com isso, observou-se que não existiu associação significativa entre a patologia aqui estudada com a mutação *Glu264Asp* *CHGA*. Quanto a associação entre a presença do alelo polimórfico e o AVEH, também não foi verificada nenhuma relação ($p > 0,05$).

TABELA 1 – Distribuição das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *Glu264Asp CHGA* nos diferentes grupos

Glu264Asp CHGA	Grupo				p	OR	IC
	AVEH/aneurisma		Controle				
	n	%	n	%			
GG	10	22,2	9	17,3			
GC	35	77,8	43	82,7	0,543	1,37	0,5-3,73
CC	0	0	0	0			
Total	45	100	52	100			
G	55	61,1	61	58,7			
C	35	38,9	43	41,3	0,729	1,11	0,62-1,97
Total	90	100	104	100			

CHGA: cromogranina A; *AVEH*: acidente vascular encefálico hemorrágico; *OR*: odds ratio; *IC*: intervalo de confiança.

As Tabelas 2 e 3 descrevem as associações entre as características clínicas laboratoriais e o prognóstico dos pacientes com o polimorfismo estudado. Nenhuma associação da mutação com as variáveis estudadas foi verificada ($p > 0,05$).

TABELA 2 – Associação entre o polimorfismo *Glu264Asp CHGA* e as características clínicas/hábitos e o prognóstico do paciente medido nas escalas

Características clínicas		<i>Glu264Asp CHGA</i>				
		GG		GC		
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>p</i>
HAS	Sim	8	22,9	27	77,1	0,848
	Não	2	20	8	80	
Diabetes	Sim	0	0	3	100	0,338
	Não	10	23,8	32	76,2	
Tabagismo	Sim	3	20	12	80	0,8
	Não	7	23,3	23	76,7	
Etilismo	Sim	1	14,3	6	85,7	0,583
	Não	9	23,7	29	76,3	
Glasgow	Coma intermediário	2	33,3	4	66,7	0,482
	Coma superficial	0	0	0	0	
	Normalidade	8	20,5	31	79,5	
Rankin	Assintomático	0	0	2	100	0,864
	Sintoma sem incapacidade	8	23,5	26	76,5	
	Incapacidade leve	0	0	1	100	
	Incapacidade moderada	0	0	2	100	
	Incapacidade moderada a grave	1	33,3	2	66,7	
	Incapacidade grave	1	33,3	2	66,7	
Índice de Barthel	Incapacidade severa	2	33,3	4	66,7	0,371
	Incapacidade moderada	0	0	0	0	
	Incapacidade leve	7	25,9	20	74,1	
Independência funcional		1	8,3	11	91,7	

HAS: hipertensão arterial sistêmica.

TABELA 3 – Estatísticas-resumo de glicemia, creatinina e plaquetas conforme a presença do polimorfismo *Glu264Asp CHGA* nos pacientes do grupo-caso

Variáveis laboratoriais	<i>Glu264Asp CHGA</i>						<i>p</i>
	GG		GC		Total		
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média	
Glicose	112	9	109	4	110	4	0,79
Creatinina	0,9	0,1	1,4	0,4	1,3	0,3	0,439
Plaquetas	321	17	339	12	335	10	0,455

CHGA: cromogranina A.

DISCUSSÃO

O AVE é uma patologia de grande impacto social que causa um déficit neurológico de origem vascular; acomete adultos e idosos. Essa doença é a primeira causa de mortalidade no Brasil e a segunda no mundo, logo após das doenças isquêmicas do coração^(15,16). Nesta pesquisa, a incidência de mulheres (71,1%) – idade de aproximadamente 52 anos – foi maior que a de homens (28,9%) no grupamento AVEH e/ou aneurisma.

Pesquisas genéticas que envolvem polimorfismos da *CHGA* associados a algumas doenças já foram descritas na literatura. Neste estudo, foi feita uma análise da associação entre a presença do polimorfismo *Glu264Asp CHGA* e os portadores do AVEH e/ou aneurisma que se encontravam em tratamento em uma unidade de saúde do Distrito Federal, Brasil.

Estudos de variação genética indicam que, do total de casos de AVE, cerca de 38% são hereditários. Também afirmam que a maior parte da contribuição genética para o AVE é poligênica e reflete efeitos de múltiplos genes, cada um exercendo pequenos efeitos⁽¹⁷⁾. Em relação ao AVEH, poucas revisões da literatura foram realizadas, quando comparadas com o desfecho isquêmico da doença.

A CHGA faz parte de um grupo de proteínas presentes em vários tecidos neuroendócrinos; tem sido considerada como marcador de diversas patologias, como hipertensão, doenças neuropsiquiátricas, insuficiência renal e hepática^(14, 18, 19). Além disso, essa proteína se destaca no grupo de marcadores na insuficiência cardíaca (IC), pois foi incluída como parte do mecanismo de disfunção neuroendócrina. A Classificação Braunwald de Biomarcadores para IC, dividida em sete categorias, aponta as cromograninas como biomarcadores para avaliação do prognóstico e do risco cardiovascular⁽²⁰⁾. Dessa forma, estudos sobre o polimorfismo genético da *CHGA* podem contribuir para a compreensão da patogênese e o prognóstico de doenças cardiovasculares, como o AVEH. No entanto, este trabalho não

Joaquim C. M. Santos Jr.; Caroline F. Frailelli; Alan Cristian F. Nóbrega; Suzana Cristina Rodrigues; Ligia Canongia A. C. Duarte; Callandra Maria S. Silva; Jonathan D. Lima; Luzilano B. Pereira; Daniel O. Pretre; Vivian Taís E. Cipriano; Izabel Cristina R. Silva; Hêlla Carla Souza

apontou associação do polimorfismo da *CHGA-264 G/A* com a ocorrência do AVEH e/ou aneurisma. Poucos estudos identificaram esse polimorfismo em um grupo de indivíduos. O estudo proposto por Salem *et al.* (2008)⁽²¹⁾ identificou que polimorfismos no gene *CHGA* estavam associados à presença da doença renal hipertensiva, porém, não observaram a relevância do polimorfismo *Glu264Asp CHGA* para a patogênese da doença⁽²¹⁾.

Outro estudo, desenvolvido por Kogawa *et al.* (2016)⁽²²⁾, constatou que o polimorfismo não estava associado à presença de diabetes, o mesmo observado neste trabalho, quando se desejou investigar essa associação entre os pacientes portadores de diabetes do grupo-caso com os do grupo-controle.

Quanto ao prognóstico, também não se verificou que o polimorfismo da *CHGA* estava associado ao perfil do paciente medido pelas escalas de avaliação neurológica. Pode-se perceber que o AVEH e/ou aneurisma é uma doença de amplo espectro na população. Porém, como limitação, o número da amostragem foi muito pequeno quando se pensa na magnitude da patologia em questão. Por essa razão, novas pesquisas em populações específicas devem ser feitas para ajudar na compreensão da doença associada à mutação genética, já que o Brasil é representado por um conjunto de indivíduos miscigenados.

Compreender os genes responsáveis pelas características normais ou patológicas permite a aplicação dos fundamentos da medicina genômica que irão modificar a terapia genética.

O princípio dessa tecnologia envolve a aplicação de genes responsáveis por proteínas que poderão ser benéficas ao indivíduo no paciente portador de doenças genéticas, ou seja, a aplicação de um gene normal poderá reverter o quadro clínico do portador. Esse procedimento poderia contribuir para a melhoria da qualidade de vida do paciente e possivelmente reduzir os índices de incidência, não somente dessa patologia, mas também de diversas outras⁽²³⁾.

CONCLUSÃO

O polimorfismo *Glu264Asp CHGA* parece não contribuir para a gênese da expressão da proteína CHGA neste grupo de pacientes, portanto, não é o embasamento ideal para compreender as razões dessa proteína ser um biomarcador do AVEH.

Entender as mutações genéticas dessa patologia contribui para o desenvolvimento da terapia gênica, uma tecnologia de grande importância para a saúde. Para tanto, novos estudos sempre devem ser feitos para melhorar a compreensão da doença e promover a qualidade de vida do paciente. Este estudo não demonstrou associação, mas verificar se existe uma possível associação em populações de diferentes países seria uma investigação interessante.

REFERÊNCIAS

1. De Carvalho MIF, de Sousa Delfino JA, Pereira WMG, Matias ACX, Santos EFS. Acidente vascular cerebral: dados clínicos e epidemiológicos de uma clínica de fisioterapia do sertão nordestino brasileiro. *Rev Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia*. 2015; 2(6).
2. Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares. Acidente vascular cerebral. Available at: http://www.sbdvc.org.br/publica_avc.asp. [Accessed on: 19 Oct 2018].
3. Magistis F, Bazak S, Martin J. Intracerebral hemorrhage: pathophysiology, diagnosis and management. *MUMJ*. 2013; 10(1): 15-22.
4. Pinto MH, Zago MME. A compreensão do significado cultural do aneurisma cerebral e do tratamento atribuídos pelo paciente e familiares: um estudo etnográfico. *Rev Latino-Americana de Enfermagem*. 2000; 8(1): 51-6.
5. Montaner J, Mendioroz M, Delgado P, et al. Differentiating ischemic from hemorrhagic stroke using plasma biomarkers: the S100B/RAGE pathway. *J Proteomics*. 2012; 75(15): 4758-65.
6. Bath PM, Krishnan K. Interventions for deliberately altering blood pressure in acute stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014; 10: CD000039.
7. Radanovic M. Características do atendimento de pacientes com acidente vascular cerebral em hospital secundário. *Arq Neuropsiquiatr*. 2000; 58(1): 99-106.
8. Vagal AS, Khatri P, Broderick JP, Tomsick TA, Yeatts SD, Eckman MH. Time to angiographic reperfusion in acute ischemic stroke: decision analysis. *Stroke*. 2014; 45(12): 3625-30.
9. Neto HS, Neville IS, Beer-Furlan A, Tavares WM, Teixeira MJ, Paiva WS. Hemodynamic stroke caused by strangulation. *Int J Clin Exp Med*. 2014; 7(9): 2932-5.
10. Baczkó I, Leprán I, Kiss L, Muntean DM, Light PE. Future perspectives in the pharmacological treatment of atrial fibrillation and ventricular arrhythmias in heart failure. *Curr Pharm Des*. 2015; 21(8): 1011-29.
11. Rolindo SJS, Oliveira LT. Acidente vascular cerebral isquêmico: revisão sistemática dos aspectos atuais do tratamento na fase aguda. *Rev Patol Tocantins*. 2016; 3(3): 18-26.
12. Marques FMLA, Martins RML. Independência funcional do doente pós AVC. Instituto Politécnico de Viseu, Escola Superior de Saúde de Viseu; 2012.
13. Silva IFGD, Neves CFDS, Vilela ACG, Bastos LMD, Henriques MILS. Viver e cuidar após o acidente vascular cerebral. *Rev Enfermagem Referência*. 2016; 8: 103-11.

14. Broedbaek K, Hilsted L. Chromogranin A as biomarker in diabetes. *Biomarkers Med.* 2016; 10(11): 1181-9.
15. Naki IK, Rodrigues TA, de Andrade TS, et al. Acidente vascular encefálico agudo: reabilitação. *Acta Fisiatr.* 2012; 19(2): 60-5.
16. Rodrigues ESR, Castro KAB, Rezende AAB, Herrera SDSC, Pereira AM, Takada JAP. Fatores de risco cardiovascular em pacientes com acidente vascular cerebral. *Rev Amazônia.* 2013; 1(2): 21-8.
17. Hopewell JC, Clarke R. Emerging risk factors for stroke what have we learned from mendelian randomization studies? *Stroke.* 2016; 47(6): 1673-8.
18. D'amico MA, Ghinassi B, Izzicupo P, Manzoli L, Di Baldassarre A. Biological function and clinical relevance of chromogranin A and derived peptides. *Endocr Connect.* 2014; 3(2): 45-54.
19. Kim T, Loh YP. Chromogranin A: a surprising link between granule biogenesis and hypertension. *J Clin Investigat.* 2005; 115(7): 1711-2.
20. Pitthan E, Martins OMO, Barbisan JN. Novos biomarcadores inflamatórios e de disfunção endotelial: predição de risco cardiovascular. *Rev AMRIGS.* 2014; 58(1): 69-77.
21. Salem A, Al Mokadem S, Attwa E, Abd El Raouf S, Ebrahim HM, Faheem KT. Nail changes in chronic renal failure patients under haemodialysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2008; 22: 1326-31.
22. Kogawa EM, Grisi DC, Falcão DP, et al. Salivary function impairment in type 2 diabetes patients associated with concentration and genetic polymorphisms of chromogranin A. *Clin Oral Invest.* 2016.
23. Nardi NB, Teixeira LAK, da Silva EFA. Terapia gênica. *Ciência Saúde Coletiva.* 2002; 7(1): 109-16.

AUTOR CORRESPONDENTE

Izabel Cristina Rodrigues da Silva  0000-0002-6836-3583
e-mail: belbiomedica@gmail.com



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

The impact of NOS3 gene polymorphism on papillary thyroid cancer susceptibility in patients undergoing radioiodine therapy

The International Journal of Biological
Markers
1–5
© The Author(s) 2020
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/1724600820961787
journals.sagepub.com/home/ijbm
SAGE

Adara Rodrigues Damasceno Cerqueira¹, Caroline Ferreira Fratelli² ,
Ligia Canongia de Abreu Cardoso Duarte²,
Alexandre Sampaio Rodrigues Pereira², Rafael Martins de Moraes¹,
Alaor Barra Sobrinho³, Calliandra Maria de Souza Silva¹,
Izabel Cristina Rodrigues da Silva¹, and Jamila Reis de Oliveira¹

Abstract

Thyroid cancer is the most common endocrine cancer in the world. Noting that the NOS3 gene polymorphism interferes with nitric oxide production, this study aims to identify and analyze the NOS3 gene polymorphism in the intron 4 region in patients with papillary thyroid cancer. A case-control study was conducted with 31 papillary thyroid cancer patients of both genders who underwent thyroidectomy and treatment with sodium iodide radiopharmaceutical (I131) compared with 81 control patients. Through papillary thyroid cancer, the results were observed, compiled, and analyzed using SPSS version 25.0. The significance level of 5% was adopted. Genotypic frequencies of healthy subjects were in the Hardy-Weinberg equilibrium ($P = 0.503$). There was a significant genotypic difference between papillary thyroid cancer and healthy individuals ($P < 0.001$). The BB genotype conferred a protective factor for papillary thyroid cancer ($P < 0.001$, odds ratio (OR) 0.16; 95% confidence interval (CI) 0.06, 0.42), while the presence of the A allele appears to be a risk factor for papillary thyroid cancer ($P < 0.001$, OR 3.54; 95% CI 1.86, 6.73). The intron 4 polymorphism of the NOS3 gene was associated with susceptibility to papillary thyroid cancer. Thus, future research into the effects of this polymorphism is essential.

Keywords

Genetic polymorphism, thyroid gland neoplasms, thyroidectomy, nitric oxide

Date received: 1 June 2020; revised: 9 August 2020; accepted: 7 September 2020

Introduction

Thyroid cancer is the most common endocrine cancer in the world.¹ In Brazil, 9610 new cases—in which 1570 were male and 8040 were female—are predicted for the 2018–2019 biennium. Therefore, the frequency of this carcinoma is observed three times more in women than men.²

Thyroid neoplasms are classified histologically by their shape, which is subdivided into tumors derived from follicular cells (papillary, follicular, and anaplastic carcinoma) and parafollicular or C cells (medullary carcinoma).³ Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common (80%) and has the highest cure rate in patients. It is also quite common in women 30–50 years old. Derived from

the follicular epithelium, this type of cancer invades the lymphatic system, generating multifocality and lymph node metastases.⁴

Nitric oxide (NO) is a radical and acts as a biological mediator in various processes, including the blood flow

¹University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

²Postgraduate Program in Health Sciences and Technologies, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

³Medical Images of Brasília, Brasília, DF, Brazil

Corresponding author:

Izabel Cristina Rodrigues da Silva, University of Brasília, University Campus, s/n, Metropolitan Center, Brasília, DF 72220-275, Brazil.
Email: belbiomedica@gmail.com



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

regulation and neuronal activity modulation. Mutations in the *nitric oxide synthase 3 (NOS3)* gene directly interfere with NO production and the regulation of *NOS3* gene expression.⁵⁻⁸ Located on human chromosome 7q36.1, its variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism in intron 4 is closely associated with an altered concentration of plasma nitric oxide and increased reactive oxygen species (ROS) production.⁹ This polymorphism has a 27-base-pairs sequence, with one larger and one smaller allele. The larger allele "b" has five tandem repeats of 27 base-pairs, while the smaller allele "a" has four repeats.¹⁰

The excessive ROS presence may cause oxidative stress in cells and, consequently, damage deoxyribonucleic acid (DNA), ribonucleic acid (RNA), lipids, and proteins. Furthermore, ROS can also affect the DNA repair system, rendering the individual more susceptible to the development of diseases, such as cancer.¹¹ Noting that the *NOS3* gene polymorphism interferes with NO production, this study endeavors to investigate whether the *NOS3* intron region 4 gene polymorphism acts as a protective or a risk factor in PTC patients.

Material and methods

Subjects

As an observational descriptive case control study, the research participants were divided into two groups. The case group consisted of 31 patients of both genders (20 female and 11 male) over 18 years old (average age: 48 ± 13 years) diagnosed with PTC. These patients were residents of the Federal District (Brazil) and underwent thyroidectomy and radioiodine therapy at a private clinic in the Federal District. The control group consisted of 81 participants (43 female and 38 male) with a mean age of 52 ± 5 years, healthy volunteers, paired and unrelated to the case group.

Participants from both groups were excluded if they were (a) younger than 18 years old, (b) had a thyroid cancer diagnosis but were not eligible for radioiodine therapy, and (c) refused to participate in the research or for whom legal representatives did not consent.

The attending physician chose participating candidates for iodotherapy from their current clinical condition and treatment indication.¹² The following items were assessed: (a) the extent of surgery, complications, residual or metastatic presence; (b) the histopathological diagnosis; (c) the date of diagnosis; (d) the initial disease presentation; (e) the tumor extension; (f) the use of levothyroxine and others (radiotherapy and previous surgery); (g) evaluation of risk factors and medications that may interfere with treatment efficacy; and (h) recent exposure to iodinated contrast. A whole-body survey (WBS) with low iodine-131 doses was requested to estimate the volume of remaining tissue or metastatic disease. In summary, iodotherapy is indicated in patients with incomplete tumor resection or apparent

metastases after thyroidectomy and who are not candidates for surgical reintervention, and in patients with presumably complete tumor resection but classified as a high or intermediate risk for persistent disease.¹² The potential adverse effects were also considered: transient changes in gonadal function; acute sialadenitis; advanced menopause; persistent xerostomia and xerophthalmia; increased risk of second cancer; hypersensitivity reactions; spinal depression; leukopenia; thrombocytopenia; acute leukemia; anemia; chromosomal abnormalities; radiation syndromes; thyroiditis; gastritis; sore throat; cough; and death.

The number of participants in the case group was determined according to the sample calculation: estimating a 1% thyroid cancer prevalence among the cancer types in the adult population, a sampling error of 5% and a 95% confidence interval (CI). In the number of patients ($n = 8450$) registered with this cancer in the studied geographical region, the sample size reached was 12 participants. With the compensation of losses, a sample of 31 PTC patients was considered.

The UNICEUB Ethics Committee approved this study under CAAE No. 57382416.6.0000.0023, and all participants had a detailed clinical history, and their resulting evolution followed.

Laboratory methods

After signing the Free and Informed Consent Terms and the Biological Material Guard Terms, and having answered a proposed questionnaire, each participant had 10 mL of their venous blood collected.

DNA was extracted from blood collected by Invitex's Invisorb Spin Blood Mini Kit (250) (catalog # CA10-0005, lot # 1031100300) and had an average concentration of 20 ng/ μ L. *NOS3* polymorphism genotyping was performed using the polymerase chain reaction-restriction on fragment length polymorphism (PCR-RFLP)-based analysis. The primers used to evaluate *NOS3* intron 4 polymorphism were: Sense 5'AGG CCC TAT GGT AGT GCC TT 3' and Antisense 5'TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC 3'.

The DNA amplification used the following thermocycling conditions: 94°C/4 min (initial denaturation), succeeded by 36 denaturation cycles at 94°C/1 min, followed by 60°C/30 s and 72°C/1 min for oligonucleotide annealing. The final extension occurred at 72°C/10 min. The PCR products were the 393bp allele "a" (mutated) and the 420bp allele "b" (ancestral) fragments.

Statistical analysis

The Chi-square test evaluated departures from Hardy-Weinberg equilibrium and frequency differences between groups. The data comparison of quantitative measurements between genotypes groups underwent a normality test that resulted in an abnormal distribution and, hence, was analyzed by the Kruskal-Wallis statistic test. The statistical

analyses were carried out with SPSS (version 26.0, SPSS, Chicago, IL, USA) for Windows, with a 5% significance level adopted a priori.

Results

Table 1 describes the genotypic and allelic frequencies of the *NOS3* intron 4 polymorphism. Most participants in the case group had at least one mutated allele. In the genotypic analysis, a statistically significant difference was noted between the studied groups, and that the bb genotype appears to act as a protective factor against PTC ($P < 0.001$; odds ratio (OR) 0.16; 95% CI 0.06, 0.42). A statistical difference was also found between the groups when analyzing the allele frequencies; however, the presence of the "a" allele seems to be a risk factor for PTC ($P < 0.001$; OR 3.54; 95% CI 1.86, 6.73). Nevertheless, the control group's genotype distribution abided by the Hardy-Weinberg principle ($P > 0.05$).

Clinical characteristics of PTC patients analyzed in relation to polymorphism were: serum thyroglobulin concentration, thyroid-stimulating hormone (TSH), antithyroglobulin, gender, body mass index (BMI), and administered dose. No associations were found between the *NOS3* intron 4 polymorphism and these variables (Tables 2 and 3).

Discussion

The present study revealed that the presence of a polymorphism in the *NOS3* intron 4 gene region was associated with susceptibility to PTC (Table 1). Currently, there are no studies that relate PTC with the *NOS3* gene intron 4

Table 1. Genotypic and allelic distribution of papillary thyroid carcinoma (PTC) patients and control subjects.

NOS3 intron 4	Groups				P	OR (CI)
	PTC		Control			
	N	%	N	%		
aa	4	12.9	3	3.7		
ab	19	61.3	23	28.4	<0.001*	N/A
bb	8	25.8	55	67.9		
Total	31	100	81	100		
bb	8	25.8	55	67.9	<0.001*	0.16 (0.06, 0.42)
ab+aa	23	74.2	26	32.1		
Total	31	100	81	100		
a	27	43.5	29	17.9	<0.001*	3.54 (1.86, 6.73)
b	35	56.5	133	82.1		
Total	62	100	162	100		0.28 (0.15, 0.54)

* $P < 0.05$; Chi-square test.

CI: confidence interval; N: number; OR: odds ratio.

Table 2. Medians, median intervals, and *P*-value of thyroglobulin, TSH, and BMI measurements in PTC patients, according to genotype.

NOS3 intron 4	Thyroglobulin ng/mL			TSH μ UI/mL			BMI (kg m^{-2})		
	Lower CL	Median	Upper CL	Lower CL	Median	Upper CL	Lower CL	Median	Upper CL
	95% for median		95% for median	95% for median		95% for median	95% for median		95% for median
aa	0.59	2.59	9.00	7.46	26.29	136.13	24.62	30.47	33.69
ab	1.02	2.88	31.90	55.90	76.65	130.07	24.25	26.22	31.71
bb	3.00	5.58	31.99	1.20	86.66	118.08	20.81	25.30	30.80
<i>P</i> -value [#]		0.687			0.747			0.460	

[#]Kruskal-Wallis statistic Test.

BMI: body mass index; CL: confidence level; PTC: papillary thyroid cancer; TSH: thyroid-stimulating hormone.

Table 3. Distribution of antithyroglobulin concentration, gender, and the radiopharmaceutical administered dose in PTC patients, according to genotype.

NOS3 intron 4	Antithyroglobulin (UI/mL)				Gender				Administered dose (mCi)									
	<20		>20		Female		Male		50		100		150		200		250	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
aa	3	16.7	0	0	2	10	2	18.2	0	0	2	22.2	2	12.5	0	0	0	0
ab	11	61.1	4	100	11	55	8	72.7	1	100	3	33.3	11	68.75	2	100	1	50
bb	4	22.2	0	0	7	35	1	9.1	0	0	4	44.4	3	18.75	0	0	1	50
<i>P</i> -value [#]	0.320				0.276				0.651									

[#]Kruskal-Wallis statistic test.

N: number.

region, making this work a pioneer in its field. Nonetheless, some studies verified the association of this polymorphism with other cancers.^{13–18}

A meta-analysis study observed that the many studies linking *NOS3* G894T and *NOS3* intron 4 polymorphisms with cancer risk were conflicting.^{18,20} The 14 case control studies examined suggested that the analyzed polymorphisms do not alter susceptibility to cancer.¹⁷ Nonetheless, Haque et al.¹⁸ suggest that further studies should be done with more detailed information so the possible association could be more precisely evaluated. The authors also recommended that these studies consider gene–gene and gene–environment interactions.

Some studies considered whether there was an association of this polymorphism with prostate cancer.^{13,14} However, the results are conflicting. A meta-analysis investigated polymorphisms in three *NOS3* regions, including intron 4, for an association with prostate cancer. From 11 articles reviewed, Nikolić et al.²¹ concluded that the a allele presence is a risk factor for prostate cancer (OR 2.29; 95% CI 1.51, 3.49; $P < 0.01$). In contrast, another study analyzed paraffined prostate tissue and concluded that *NOS3* intron 4 polymorphism was not associated with prostate cancer ($P = 0.301$).²²

A case-control study with Mexican women sought to associate the *NOS3* intron 4 polymorphism with breast cancer. In this study, the association between the polymorphism and breast cancer was statistically significant, and the presence of the “a” allele seemed to be a risk factor for its development ($P = 0.001$; OR 1.9; 95% CI 1.29, 2.95).¹⁶

In contrast, Fu et al.⁽¹⁹⁾, analyzing a meta-analysis by Hao et al.⁽²⁰⁾, did not find an association between *NOS3* G894T polymorphism and breast cancer risk.

In a case-control study involving Caucasian women with vulvar cancer, two *NOS3* gene polymorphisms were analyzed for a possible association. The *NOS3* intron 4 polymorphism appeared to reduce the duration of disease-free survival ($P = 0.03$) but was not related to the neoplasia phenotype. The other polymorphism studied in *NOS3* exon 7, Glu298Asp, had no relation to disease development or disease-free survival time.¹⁷

The *NOS3* intron 4 polymorphism was associated with susceptibility to PTC in the Brazilian population studied. No associations were detected between this polymorphism and the patients' clinical characteristics analyzed: serum thyroglobulin concentration, TSH, antithyroglobulin, gender, BMI, and dose administered. Information on genetic analysis can be a valuable method to help treat and understand diseases that affect the population. Hence, further population studies should be conducted to increase our comprehension of PTC and thus contribute to the diagnosis, prognostic analysis, and gene therapies, which will promote a better quality of life for the carrier.

Acknowledgement

This work was carried out with the support of the Higher Education Personnel Improvement Coordination - Brazil (CAPES) - Financing Code 001. DPI/UnB. CAPES - Financing Code 001 is a postgraduation scholarship and independent of the research subject.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This research received financial support from CAPES and DPI/UnB.

Ethical approval

All procedures performed in studies involving human participants were per the institutional ethical standards, national research committee, or both (UNICEUB Ethics Committee - CAAE No. 57382416.6.0000.0023) and 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

ORCID iD

Caroline Ferreira Fratelli  <https://orcid.org/0000-0002-0511-9452>

References

1. Kitahara CM and Sosa JA. The changing incidence of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* 2016; 12: 646–653.
2. Ferreira ADM, Santos LDM, Rebelo MS, et al. *Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância; 2017.
3. Lopes JP and Fonseca E. Mutação do gene BRAF na história natural do carcinoma papilar da tireóide: Implicações diagnósticas e prognósticas. *Acta Med Port* 2011; 24: 855–868 [in Portuguese].
4. Shore SL. Thyroid cancer pathology. In: Vinjamuri S, editor. *PET/CT in Thyroid Cancer*. Cham: Springer; 2018, pp.9–13.
5. Abd Elneam AI, Boghdady AM, Abd Alrheam AI, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (T-786C) and cerebrovascular stroke with or without smoking. *Int J Adv Res* 2015; 3: 619–624.
6. Dosenko VE, Zagoriy VY, Haytovich NV, et al. Allelic polymorphism of endothelial NO-synthase gene and its functional manifestations. *Acta Biochim Pol* 2006; 53: 299–302.
7. Oliveira-Paula GH, Lacchini R and Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene* 2016; 575: 584–599.
8. Nasr HB, Dimassi S, M'hadhbi R, et al. Functional G894T (rs1799983) polymorphism and intron-4 VNTR variant of nitric oxide synthase (NOS3) gene are susceptibility biomarkers of obesity among Tunisians. *Obes Res Clin Pract* 2016; 10: 465–475.

9. Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, et al. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arter Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 3147–3153.
10. Özçelik AT, Can Demirdöğen B, Demirkaya Ş, et al. Importance of NOS3 genetic polymorphisms in the risk of development of ischemic stroke in the Turkish population. *Genet Test Mol Biomarkers* 2014; 18: 797–803.
11. da Silva CT and Jasiulionis MG. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. *Cienc Cult* 2014; 66: 38–42 [in Portuguese].
12. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2016; 26: 1–133.
13. Diler S and Oden A. The T-786C, G894T, and intron 4 VNTR (4a/b) polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in prostate cancer cases. *Russ J Genet* 2016; 52: 220–225.
14. Safarinejad MR, Safarinejad S, Shafiei N, et al. Effects of the T-786C, G894T, and Intron 4 VNTR (4a/b) polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene on the risk of prostate cancer. *Urol Oncol* 2013; 31: 1132–1140.
15. Pehlivan M, Tomatır AG, Şahin HH, et al. The endothelial nitric oxide synthase gene variants as a risk factor for chronic lymphocytic leukemia. *Uluslararası Hematol Derg* 2017; 27: 85–90.
16. Ramírez-Patiño R, Figueroa LE, Puebla-pérez AM, et al. Intron 4 VNTR (4a/b) polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with breast cancer in Mexican women. *J Korean Med Sci* 2013; 28: 1587–1594.
17. Riener EK, Hefler LA, Grimm C, et al. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in women with vulvar cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 686–690.
18. Haque S, Mandal RK, Akhter N, et al. G894T and 4a/b polymorphisms of NOS3 gene are not associated with cancer risk: A meta-analysis. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2015; 16: 2929–2937.
19. Fu H, Zhang Y, Jin L, et al. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) G894T polymorphism is not associated with breast cancer risk: new evidence. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 128: 595–598.
20. Hao Y, Montiel R and Huang Y. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 894 G>T polymorphism is associated with breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 124: 809–813.
21. Nikolić ZZ, Pavićević DLS, Romac SP, et al. Genetic variants within endothelial nitric oxide synthase gene and prostate cancer: A meta-analysis. *Clin Transl Sci* 2015; 8: 23–31.
22. Polat F, Turaçlar N, Yılmaz M, et al. ENOS gene polymorphisms in paraffin-embedded tissues of prostate cancer patients. *Turkish J Med Sci* 2016; 46: 673–679.

Associação do polimorfismo genético da Cromogranina A com pacientes portadores de câncer de tireoide

Association of chrogranin A (CHGA) genetic polymorphism with patients with thyroid cancer

Asociación del polimorfismo genético de la cromogranina A (CHGA) con pacientes con cáncer de tiroides

Bruna Rodrigues Gontijo¹, Isabella Maria Leite e Silva², Isabella Possatti³, Caroline Ferreira Fratelli⁴, Ligia Canongia de Abreu Cardoso Duarte⁵, Rafael Martins de Moraes⁶, Jamila Reis de Oliveira⁷, Isabel Cristina Rodrigues da Silva⁸

Como citar: Gontijo BR, Silva IML, Possatti I, Fratelli CF, Duarte LCAC, Moraes RM, et al. Associação do polimorfismo genético da Cromogranina A com pacientes portadores de câncer de tireoide. REVISA. 2022; 11(4): 630-9. Doi: <https://doi.org/10.36239/revisa.v11.n4.p630a639>

REVISA

1. Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0001-6662-7138>
2. Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0001-9292-0126>
3. Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0001-9302-2232>
4. Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-0911-9832>
5. Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-9335-9993>
6. Hospital Sírio-Libanês, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0003-0777-9404>
7. Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-9577-0344>
8. Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-6836-3583>

Revisão: 14/07/2022
Aprovação: 17/09/2022

RESUMO

Objetivo: Descrever a presença do polimorfismo da região codante do gene CHGA Glu264Asp e associá-lo com as características clínicas da doença. **Método:** Trata-se de um estudo transversal, descritivo e de caso controle para investigar o polimorfismo da CHGA Glu264Asp por meio de amostras de sangue de 53 indivíduos sendo o grupo caso, formado por 23 pacientes, de ambos os sexos, que sofreram a tireoidectomia e foram submetidos ao tratamento com o Radiofármaco Iodeto de Sódio (I131). Para a genotipagem foi utilizada a técnica PCR-RFLP. Foi adotado o nível de significância de 5%. **Resultados:** Houve diferença estatística significativa na distribuição alélica entre indivíduos com câncer papilífero da tireoide e os saudáveis. Com tudo, a presença do alelo G é um fator de risco para o câncer papilífero da tireoide. Observou-se uma correlação entre o genótipo GG com o aumento do nível de TSH em pacientes que apresentavam essa patologia. **Conclusão:** Demonstrou-se que o alelo selvagem pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da neoplasia tireoidiana do tipo papilar. Por ser uma doença de etiologia multifatorial, são necessários outros estudos em populações diferentes para melhor compreensão da doença.

Descritores: Cromogranina A; Polimorfismo Genético; Neoplasias da Glândula Tireoide.

ABSTRACT

Objective: To describe the presence of polymorphism of the codant region of the CHGA Glu264Asp gene and to associate it with the clinical characteristics of the disease. **Method:** This is a cross-sectional, descriptive and case-control study to investigate chga glu264Asp polymorphism through blood samples from 53 individuals, consisting of 23 patients of both sexes who underwent thyroidectomy and underwent treatment with the Radiopharmaceutical Sodium Iodide (I131). Pcr-RFLP technique was used for genotyping. The significance level of 5% was adopted. **Results:** There was a statistically significant difference in the allelic distribution between individuals with papillary thyroid cancer and healthy individuals. With everything, the presence of the G allele is a risk factor for papillary thyroid cancer. A correlation was observed between the GG genotype and the increased level of TSH in patients with this pathology. **Conclusion:** It was shown that the wild allele may be a risk factor for the development of the thyroid neoplasm of the papillary type. As it is a disease of multifactorial etiology, further studies in different populations are needed to better understand the disease.

Descriptors: Chromogranin A; Genetic Polymorphism; Neoplasms of the Thyroid Gland.

RESUMEN

Objetivo: Describir la presencia de polimorfismo de la región codante del gen CHGA Glu264Asp y asociarlo con las características clínicas de la enfermedad. **Método:** Estudio transversal, descriptivo y de casos y controles para investigar el polimorfismo chga glu264Asp a través de muestras de sangre de 53 individuos, constituido por 23 pacientes de ambos sexos sometidos a tireoidectomía y tratamiento con yoduro de sodio radiofarmacéutico (I131). Se utilizó la técnica Pcr-RFLP para el genotipado. Se adoptó el nivel de significancia del 5%. **Resultados:** Hubo una diferencia estadísticamente significativa en la distribución alélica entre individuos con cáncer papilar de tiroides e individuos sanos. Con todo, la presencia del G allele es un factor de riesgo para el cáncer papilar de tiroides. Se observó una correlación entre el genotipo GG y el aumento del nivel de TSH en pacientes con esta patología. **Conclusión:** Se demostró que el alelo silvestre puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de la neoplasia tiroidea del tipo papilar. Como es una enfermedad de etiología multifactorial, se necesitan más estudios en diferentes poblaciones para comprender mejor la enfermedad.

Descriptores: Cromogranina A; Polimorfismo Genético; Neoplasias de la glándula tiroides

ORIGINAL

Introdução

O câncer de tireoide é a neoplasia endócrina mais comum e o aumento da sua incidência tem sido constatada, em diversos países, nas últimas décadas¹. No ano de 2014, a neoplasia de tireoide foi o câncer mais diagnosticado na Coreia, seguido de câncer de estômago, colorretal, pulmão e mama². Nos Estados Unidos, a incidência de pacientes diagnosticados com esta neoplasia, entre o período de 1974-2013, aumentou 3% ao ano.³ No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2018), foi estimado, para o biênio 2018-2019, 1.570 casos novos de câncer de tireoide no sexo masculino e 8.040 para o sexo feminino. Enquanto, para o risco foi estimado, 1,49 casos a cada 100 mil homens e 7,57 casos a cada 100 mil mulheres.⁴ Este aumento, no número de incidência das neoplasias tireoidianas, deve-se a uma ampliação de agentes cancerígenos ambientais, médicos e sociais, além do aumento na triagem e no diagnóstico da patologia.⁵

O câncer de tireoide, por sua vez, é classificado pela sua forma histológica, subdividindo-se em tumores derivados das células foliculares (carcinoma papilar, folicular e anaplásico) e das células C ou parafoliculares (carcinoma medular). Para tanto, o carcinoma papilar da tireoide (CPT) é o subtipo mais comum e apresenta o melhor prognóstico geral.⁶

A investigação inicial de qualquer nódulo tireoidiano recém-descoberto deve incluir um nível sérico de hormônio estimulador da tireoide (TSH), pois permite a diferenciação entre nódulos funcionais e não funcionais. Caso haja alteração no TSH, deve ser realizado uma ultrassonografia da tireoide para verificar a funcionalidade do nódulo. Entretanto, os nódulos não funcionais exigirão o uso de aspiração por agulha fina (PAAF) para avaliação citológica. Os tratamentos variam de acordo com o estágio e o tipo do câncer e incluem cirurgia (tireoidectomia), iodo radioativo, inibidores de tirosina quinase (TKIs) e radiação externa do feixe.⁷

A Cromogranina A (CHGA) é um membro da família cromogranina-secreto granina, referida de forma abreviada como graninas, que inclui um grupo de proteínas caracterizadas por seu perfil ácido geral armazenado em grânulos secretores.⁸ Seu peso molecular é de 48 kDa composto por 439 aminoácidos que são precursores de proteínas biologicamente ativas com uma ampla gama de atividades, como por exemplo as vasostatina I, parastatina, pancreastatina, secreção inibidora de catestatina de catecolaminas das células cromafinas.⁹ O gene CHGA humano está localizado no cromossomo 14q32.12.¹⁰ E está organizado em nove exons e sete íntrons.¹¹

Este estudo tem como objetivo verificar a distribuição do polimorfismo genético da região codante da CHGA Glu 264 Asp, em participantes portadores do câncer da tireoide que serão submetidos ao tratamento com o Radiofármaco Iodeto de Sódio (¹³¹I) e relacionar as manifestações clínicas da doença.

Método

Amostra e descrição

Por ser um estudo transversal, descritivo e de caso controle, a coleta da amostra dos participantes da pesquisa ocorreu entre os meses de junho a dezembro de 2017. Sendo assim, o presente estudo foi composto por dois grupos.

Gontijo BR, Silva IML, Possatti I, Fratelli CF, Duarte LCAC, Moraes RM, et al

O grupo caso, portador do carcinoma papilífero de tireoide, foi formado por 23 participantes de ambos os sexos (média de idade 48 anos $\pm$ 12 anos). Enquanto, o grupo controle foi composto por 33 participantes, sendo esse constituído por indivíduos saudáveis, voluntários, pareados e que não possuíam nenhum parentesco com o grupo caso.

Comitê de ética, critérios de inclusão e exclusão

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os participantes do presente estudo, sendo que, a coleta de dados foi executada após a aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética do UNICEUB sob o nº 57382416.6.0000.0023.

Pacientes de ambos os sexos, idade maior que 18 anos, com diagnóstico de câncer da tireoide e que foram submetidos a iodoterapia (I^{131}) no serviço de Medicina Nuclear Imagens Médicas de Brasília (IMEB) constituíram os critérios de inclusão para o grupo caso. Para o grupo controle, os critérios de inclusão foram indivíduos de ambos os sexos, que não possuísem câncer e não tinham algum grau de parentesco com os pacientes do grupo caso.

Participantes de pesquisa foram excluídos, em ambos os grupos, se possuísem alguns critérios, como: idade inferior a 18 anos, diagnóstico de câncer da tireoide, porém não eram eletivos a iodoterapia, além dos que não aceitaram participar da pesquisa ou representantes legais não consentiram a participação.

Extração de DNA e genotipagem

Para a análise laboratorial, foi colhido 5 mL do sangue total por meio de uma punção venosa no grupo controle e nos portadores do câncer de tireoide que sofreram a tireoidectomia, sendo a primeira coleta anterior ao tratamento com o Radiofármaco Iodeto de Sódio (I^{131}). A amostra biológica coletada foi distribuída em tubos evacuados com EDTA como anticoagulante, conforme requisitado na norma H1-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Posteriormente, o DNA foi extraído do sangue periférico com uso do Invisorb Spin Blood Mini Kit (250) da empresa Invitex (catálogo #CA10-0005, lote #1031100300, Alemanha). A concentração do DNA obtido foi estimada pelo espectrofotômetro (NANODROP Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). A concentração média alcançada foi de 20 ng/ μ L. O DNA obtido foi estocado a -20°C até o momento da análise.

Em seguida, foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) no qual consiste na amplificação de um fragmento específico de DNA. Os primers utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1- Primers utilizados na PCR

Forward	5'-TCTCTCAGGGTCTGGTGGAC-3'
Reverse	5'-GTTGAGGTCTTCGCCATCAT-3'

Para este processo de amplificação, as seguintes condições de termociclagem foram realizadas: 94°C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguida por 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. A extensão final foi realizada a 72°C por 8 minutos. O produto dessa reação gera um fragmento de 218 pares de base (pb).

Gontijo BR, Silva IML, Possatti I, Fratelli CF, Duarte LCAC, Moraes RM, et al

Após uma PCR bem sucedida, o produto foi digerido utilizando a enzima de restrição DpnI (Thermo Fisher) e encubado por 2 horas a 37°C. O alelo G não sofreu clivagem pela enzima, tendo assim um fragmento de 218pb. O alelo A apresentou dois fragmentos de DNA, um de 177pb e outro de 41pb.

Características clínicas

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos por meio da revisão de prontuários médicos. Esses dados clínicos descrevem o tempo do diagnóstico da doença, sistema inicialmente envolvido, história atual da doença, antecedentes patológicos, antecedentes epidemiológicos e sociais, antecedentes familiares, exames complementares.

Análise estatística

Para a análise estatística a aderência ao equilíbrio Hardy-Weinberg para a frequência genotípica em controles foi analisada pelo teste do qui-quadrado com um grau de liberdade. As frequências genotípicas e alélicas dos pacientes portadores do câncer papilífero da tireoide que foram submetidos a iodoterapia foram comparadas ao grupo controle por meio do teste qui-quadrado em modelos recessivos e dominantes. A associação de características clínicas para cada genótipo foi analisada com o teste qui-quadrado e foi adotado o nível de significância de 5%. Também foram calculadas Odds Ratio (OR) das frequências alélicas e genotípicas, com intervalo de confiança (IC) de 95%. Quando estas variáveis clínicas eram quantitativas, os testes para comparação de medianas foram executados, quando não foram observados os requisitos de normalidade dos dados. O programa estatístico utilizado foi o SPSS (versão 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Para comparação dos genótipos as demais características clínicas, foram utilizados o teste qui quadrado e o teste exato de fisher.

Resultados

Frequência genotípica e alélica do polimorfismo *CHGA* Glu264Asp no estudo caso-controle.

No estudo em questão, a frequência genotípica do polimorfismo do gene *CHGA* Glu264Asp no grupo controle estava em equilíbrio Hardy-Weinberg ($P=0,59$). A distribuição genotípica no grupo caso e controle estão descritas na Tabela 2, no qual observou-se que, a maioria dos pacientes da pesquisa (87%), que possuem câncer de tireoide do tipo papilar, manifestam o genótipo G/G. O mesmo ocorre no grupamento controle, no qual 63,6% são homozigotos dominante.

Na distribuição alélica do mesmo gene, observou-se uma diferença estatística significativa entre os grupos ($P=0,033$), sendo que a presença do alelo selvagem é um fator de risco 3 vezes maior CPT (OR=3,86).

Gontijo BR, Silva IML, Possatti I, Fratelli CF, Duarte LCAC, Morais RM, et al

Tabela 2 - Distribuição genotípica e alélica do gene *CHGA* Glu264Asp no grupo caso e no grupo controle

CHGA Glu264Asp	Grupo				P	OR	IC
	CPT		Controle				
	N	%	N	%			
GG	20	87	21	63,6	0,126	NA	NA
GA	3	13	10	30,3			
AA	0	0	2	6,1			
Total	23	100	33	100			
GG	20	87	21	63,6	0,052	3,81	(0,93-15,53)
GA + AA	3	13	12	36,4			
Total	23	100	33	100			
G	43	93,5	52	78,8	0,033*	3,86	(1,04-14,31)
A	3	6,5	14	21,2			
Total	46	100	66	100			

P<0,05; Teste qui quadrado; NA = Não se aplica

Genotipagem e suas associações com as características clínicas dos portadores de CPT submetidos a iodoterapia

A partir dos resultados obtidos, foram analisadas a relação do polimorfismo com outras características clínicas dos pacientes portadores da patologia, tais como: concentração sérica de tireoglobulina, TSH, antitireoglobulina; sexo, o IMC, além da dose administrada.

Não houve uma diferença estatística significativa do polimorfismo em questão relacionado aos valores de concentração sérica de tireoglobulina (P=0,824) e ao IMC (P=0,929). Porém, observou-se que houve uma diferença estatisticamente significativa entre o genótipo GG com o aumento da concentração sérica de TSH (P=0,047) (Tabela 3).

Tabela 3 - Mediana, Percentil 25, Percentil 75 e P-valores das variáveis tireoglobulina, TSH e IMC nos pacientes portadores de CPT, conforme o genótipo.

<i>CHGA</i> Glu264Asp	[Tireoglobulina] ng/mL			[TSH] uUI/mL			IMC (kg m ⁻²)		
	P25	Mediana	P75	P25	Mediana	P75	P25	Mediana	P75
GG	0,77	2,94	20,00	65,91	95,42	121,00	23,96	26,24	31,66
GA	0,59	1,63	500,00	0,05	7,46	55,90	17,58	28,73	33,69
AA									
P-valor	0,824			0,047*			0,929		

P-valor<0,05; Teste de Mann-Whitney.

Em relação a tabela 4, acerca da concentração de antitireoglobulina, a maioria dos pacientes portadores de CPT (86,7%) que apresentam o genótipo GG, obtiveram uma concentração de ≤ 20 UI/mL. Além disso, verificou-se que a maioria dos portadores da patologia e do genótipo GG (68,4%) eram do sexo feminino, quando comparado ao masculino. Com relação a dose de radiofármaco administrada, 78,9% dos pacientes, que apresentam o genótipo GG, receberam doses ≤ 150 mCi e apenas 21,1% deste grupo com o mesmo genótipo, receberam a dose >150 mCi. Nas três características estudadas, não foram vistas diferenças estatísticas significativas.

Gontijo BR, Silva IML, Possatti I, Fratelli CF, Duarte LCAC, Morais RM, et al

Tabela 4 - Estudo da associação entre a distribuição da antitireoglobulina (UI/mL), sexo e dose administrada (mCi) do radiofármaco nos pacientes portadores de CPT conforme o genótipo.

		CHGA Glu264Asp			P	OR	IC
		GG	GA+AA				
Antitireoglobulina (UI/mL)	≤20	N	13	1	0,108 (a)	13	(0,77-219,12)
		%	86,7	33,3			
	>20	N	2	2			
		%	13,3	66,7			
Total		N	15	3			
		%	100	100			
Sexo	Feminino	N	13	2	0,999 (b)	1,08	(0,81 - 14,41)
		%	68,4	66,7			
	Masculino	N	6	1			
		%	31,6	33,3			
Total		N	19	3			
		%	100	100			
Dose administrada (mCi)	≤ 150	N	15	3	0,999 (b)	NA	NA
		%	78,9	100			
	>150	N	4	0			
		%	21,1	0			
Total		N	19	3			
		%	100	100			

(a) Teste qui quadrado; (b) Teste exato de fisher; NA= Não se aplica

Discussão

A cromogranina A (CHGA) pertence à família de proteínas dos grânulos que são comuns nos tecidos nervosos endócrino, neuroendócrino, periférico e central, onde são tipicamente encontrados em grânulos secretórios.¹² A CHGA, em plasma, é um biomarcador estabelecido de tumores neuroendócrinos, no qual possui diversas atividades biológicas, pois ativa biologicamente diversos peptídeos. Ela é usada como marcador diagnóstico e para monitorar a progressão ou regressão do tumor durante o tratamento.⁸ No estudo em questão, não se pode afirmar que houve uma relação da distribuição genotípica entre polimorfismo estudado em relação ao câncer de tireoide, dado que não houve diferença estatística entre os grupos caso-controle. Porém, observou-se que há associação entre a presença do alelo ancestral G e a susceptibilidade ao câncer papilífero da tireoide.

Em um estudo caso controle de Ma e seus colaboradores (2010) foi verificado dois tipos de polimorfismo do gene da CHGA na região promotora 415 T/C (rs9658635) e na região codante Glu264Asp. Foram incluídos no estudo 751 homens ao total, sendo deles, 435 pacientes com câncer de próstata e 316 saudáveis. Semelhante ao resultado do presente estudo, a análise relacionada ao câncer de próstata revelou associação significativa entre o alelo G do polimorfismo CHGA Glu264Asp e o risco deste tipo de neoplasia na população japonesa, sugerindo que o polimorfismo da CHGA Glu264Asp pode ser um marcador útil para estimar o risco de câncer de próstata. Em relação ao polimorfismo da CHGA na região promotora 415 T/C (rs9658635) não mostrou

Gontijo BR, Silva IML, Possatti I, Fratelli CF, Duarte LCAC, Morais RM, et al

associação significativa entre os níveis de proteína CHGA com o ET-1 (Endotelina-1) e refere-se que esta falta de relação significativa deve-se a idade dos pacientes (homens com mais de 60 anos).¹³

A tireoglobulina é uma glicoproteína de alto peso molecular originada somente por células foliculares normais ou neoplásicas, e por virtude disso, é utilizada como marcador tumoral em neoplasias de tireoide. Entretanto, não há uma conformidade acerca do valor de tireoglobulina que sugerisse a presença do câncer diferenciado de tireoide, apresentando valores variados na literatura, entre qualquer nível sérico detectado até 3ng/mL, por meio de ensaios de quimioluminescência.¹⁴ Acerca do Índice de Massa Corpórea (IMC) um estudo de coorte-retrospectivo chinês realizado por Wu e seus colaboradores (2017), no período de 2010 a 2015, analisou 823 pacientes que apresentavam CPT submetidos a tireoidectomia total ou lobectomia. Foi constatado que o aumento do IMC estava associado ao metástases linfonodais (LNMs) de pacientes com CPT e outras características invasivas, incluindo grande tamanho do tumor, invasão extra-tireoidiana e multifocalidade.¹⁵ Porém, neste estudo, não foi observado uma associação entre a presença do polimorfismo na região codante do gene CHGA Glu264Asp ao aumento das concentrações de tireoglobulinas e IMC.

O presente estudo demonstrou uma relação estatística significativa, no qual o genótipo GG é associado com o aumento dos níveis séricos de TSH. No estudo realizado por Ma e seus colaboradores (2010), o polimorfismo alélico da Glu264Asp na região do exon 6 causou a mudança na proteína de CHGA de 264 aminoácidos mudando de glutâmico para ácido aspártico. A pancreastatina, está localizado nessa região codificadora de CHGA, sendo esta responsável pela inibição da liberação de insulina estimulada por glicose das ilhotas pancreáticas.¹³ Existe uma relação entre a resistência à insulina e a função da tireoide (principalmente os níveis de TSH).¹⁶ Uma hipótese é que a resistência à insulina seria um fator de risco para o desenvolvimento de câncer diferenciado da tireoide, pois a leptina interfere no feedback negativo no eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireoide (HPT) elevando, assim, a secreção de TSH.¹⁷ A leptina pode regular a expressão e secreção do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) através da mediação da entrada do núcleo arqueado para os neurônios TRH no núcleo paraventricular (PVN). Além disso, o eixo HPT também é indiretamente regulado por ações da leptina na via da melanocortina, como hormônio estimulador de alfa-melanócitos (-MSH) aumentando a liberação TRH, e consequentemente de TSH.¹⁸

Níveis mais altos de TSH têm sido associados não apenas a frequência aumentada, mas também com um estágio mais agressivos de câncer de tireoide.¹⁹ É importante ressaltar que a Cromogranina A também é secretada por neoplasias endócrinas que produzem Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), Hormônio folículo-estimulante (FSH), somatotropina (GH), Hormônio luteinizante (LH) e o TSH.²⁰

Em um estudo realizado por Mosca e seus colaboradores (2014), verificou se existe associação entre os níveis séricos de TSH com o risco de câncer diferenciado de tireoide e se estes teriam relação com a agressividade da doença. Eles realizaram um estudo em que analisaram 1180 pacientes brasileiros que realizaram tireoidectomia total ou lobectomia, sendo 57,9% devido a doenças benignas e 42,1% a neoplasias malignas de tireoide, no período de janeiro de 2010 a abril de 2013, no serviço de cirurgia de Cabeça e pescoço do HC-FMUSP. Foi

Gontijo BR, Silva IML, Possatti I, Fratelli CF, Duarte LCAC, Morais RM, et al

demonstrado que a associação entre os níveis de TSH estratificado nos pacientes com doenças benignas e com neoplasias malignas demonstrou uma associação estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), que permite inferir que pacientes com valor de TSH sérico maior de $1,16 \mu\text{IU/mL}$ tem maior risco de serem portadores de câncer diferenciado de tireoide do que aqueles que tem níveis de TSH menor ou igual a este valor.²¹

Os anticorpos anti tireoglobulina são produzidos por células imunes, principalmente por linfócitos que reagem contra auto antígenos da tireoide e se infiltram progressivamente na glândula da tireoide.²² O iodo radioativo (I^{131}) desempenha um papel importante no tratamento do câncer de tireoide. Ele é utilizado juntamente com a tireoidectomia para eliminar o possível câncer residual. O I^{131} funciona inserindo-se nas células da tireoide, por meio de transportadores de iodeto de sódio, e emitindo raios beta de comprimento de onda curta, causando assim, morte celular aguda.⁷ As doses administradas de iodo radioativo de 100mCi são utilizadas em pacientes que apresentam baixo risco ou em pacientes que apresentam o risco intermediário, no qual fazem dialise e apresentam comprometimento nos linfonodos. Já a dose de 150mCi é utilizada em pacientes de risco intermediário, enquanto que as doses de 200mCi são em pacientes de alto risco.²⁰ No estudo em questão, observou-se que não há associação entre o polimorfismo da *CHGA* Glu264Asp com concentrações de antitireoglobulinas e de doses administradas de iodo radioativo, visto que, não houve diferença estatística significativa entre os grupos de genótipos dos pacientes com esta patologia.

Em relação ao sexo, o câncer diferenciado de tireoide é marcadamente mais comum em mulheres que em homens.²³ Essa diferença também foi encontrada neste estudo, pois constatou-se um maior número de mulheres no grupo de pacientes portadores da patologia quando comparado aos homens.

Conclusão

Neste estudo de polimorfismo da região codante do gene *CHGA* Glu264Asp, o alelo selvagem foi associado com o maior risco a susceptibilidade ao câncer papilífero da tireoide na população brasileira estudada.

Associações foram encontradas entre este polimorfismo e a concentração sérica de TSH. Os indivíduos portadores do CPT eram predominantemente femininos, conforme registrado na literatura e a maioria dos participantes, eram expostos a dose baixas e intermediária do radiofármaco.

A análise genética pode ser um método favorável ao diagnóstico da patologia, entretanto, facilita a compreensão de doenças que afetam a população. Logo, esse tipo de estudo pode providenciar a identificação de fatores de risco, sejam genéticos ou ambientais, para determinados grupos de indivíduos, colaborando, na implantação de novas formas de diagnóstico precoce e na melhora da qualidade de vida dos pacientes.

Agradecimento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Gontijo BR, Silva IML, Possatti I, Fratelli CF, Duarte LCAC, Morais RM, et al

Referências

1. Vecchia CL, Malvezzi M, Bosetti C, Garavello W, Bertuccio P, Levi F, et al. Thyroid cancer mortality and incidence: A global overview. *International Journal of Cancer*. 2014 10;136(9):2187 – 2195.
2. Jung K, Won Y, Kong H, Lee ES. Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival, and prevalence in 2015. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association*. 2018 04;50(2):303 – 303.
3. Lim H, Devesa SS, Sosa JA, Check D, Kitahara CM. Trends in Thyroid Cancer Incidence and Mortality in the United States, 1974-2013. *JAMA*. 2017 4;317: 1338 – 1348
4. BRASIL. Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. *Rev. Brasileira De Cancerologia* [Internet]. 30º de março de 2018 [citado 18º de novembro de 2019];64(1):119-20. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/revista/index.php/revista/article/view/115>
5. Sanabria A, Kowalski LP, Shah JP, Nixon IJ, Angelos P, Williams MD, et al. Growing incidence of thyroid carcinoma in recent years: Factors underlying overdiagnosis. *Head & neck*. 2017 12;40:855 – 866.
6. Kitahara CM, Schneider AB, Brenner AV. Thyroid cancer. *Cancer epidemiology and prevention*. 2018;4:839– 860.
7. Nguyen QT, Lee EJ, Huang MG, Park YI, Khullar A, Plodkowski RA. Diagnosis and treatment of patients with thyroid cancer. *American health & drug benefits*. 2015 5;8:30 – 40.
8. Broedbaek K, Hilsted L. Chromogranin A as biomarker in diabetes. *Biomarkers in medicine*. 2016 9;10:1181 – 1189.
9. Gut P, Czarnywojtek A, Fischbach J, B, aczyk M, Ziemnicka K, Wrotkowska E, et al. Chromogranin A unspecific neuroendocrine marker. Clinical utility and potential diagnostic pitfalls. *Archives of medical science : AMS*. 2016 3;12:1 – 9.
10. D'amico MA, Ghinassi B, Izzicupo P, Manzoli L, Baldassarre AD. Biological function and clinical relevance of chromogranin A and derived peptides. *Endocrine connections*. 2014 3;3:R45 – 54.
11. NCBI et al. CHGA chromogranin A [Homo sapiens (human)] p. Online. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1113> . Acesso em: 19/11/2019.
12. Bottoni P, Michele TD, Scatena R. A Critical Approach to Clinical Biochemistry of Chromogranin A. *Advances in experimental medicine and biology*. 2015 11;867:317 – 23.
13. Ma Z, Tsuchiya N, Yuasa T, Huang M, Obara T, Narita S. et al. Clinical Significance of polymorphism and expression of chromogranin a and endothelin-1 in prostate cancer. *The journal of urology*. 2010 7;184: 1182-8.
14. Mayrhofer BF, Santos C, Cristine G, Montani G, Mazzo I. Utilização dos Hormônios Calcitonina, Catecolaminas E Tireoglobulina Como Marcadores Tumoriais: Uma Revisão Bibliográfica. *Caderno Saúde e Desenvolvimento*. 2017 abr/jul;11(6):59 – 69.

Gontijo BR, Silva IML, Possatti I, Fratelli CF, Duarte LCAC, Moraes RM, et al

15. Wu C, Wang L, Chen W, Zou S, Yang A. Associations between body mass index and lymph node metastases of patients with papillary thyroid cancer: A retrospective study. *Medicine*. 2017 3;96:e6202 -.
16. de Souza LL, Guedes EP, Teixeira PFD, Moreira RO, Godoy-Matos AF, Vaisman M. Serum TSH levels are associated with cardiovascular risk factors in overweight and obese adolescents. *Jornal de pediatria*. 2016 6;92:532 - 8.
17. Gursoy A. Rising thyroid cancer incidence in the world might be related to insulin resistance. *Medical hypotheses*. 2009 9;74:35 - 6.
18. Bétry C, Challan-Belval MA, Bernard A, Charrié A, Drai J, Laville M, et al. Increased TSH in obesity: Evidence for a BMI-independent association with leptin. *Diabetes & metabolism*. 2014 12;41:248 - 51.
19. Michèle d'Herbomez, Bauters C, Cortet-Rudelli C, Dewailly D, DoCao C, Wémeau J. Biomarqueurs em endocrinologie. *La Presse Médicale*. 2014 January;43(1):40- 56.
20. Louthan O. Chromogranin a in physiology and oncology. *Folia biologica*. 2011 11;57:173 - 81.
21. de Moraes Mosca L, da Silva CA, Yoon HS, Aisawa RK, Araújo Filho VJF, Matos LL, et al. The association of serum TSH with the risk of well-differentiated thyroid cancer and its relation with disease aggressiveness. *Rev bras cir cabeça pescoço*. 2014 jul a set;43(3):127 - 131.
22. Bueno F, Falcone MGG, Peñaloza MA, Abelleira E, Pitoia F. Dynamics of serum antithyroglobulin antibodies in patients with differentiated thyroid cancer. *Endocrine*. 2019 10;.
23. Prado Júnior LM, Marino FM, Prado LM, Mosci K, Navarrete B, Agrizzi L, et al. Análise epidemiológica de portadores de câncer diferenciado de tireóide tratados com iodoterapia. *Revista de Medicina e Saúde de Brasília*. 2012 Out;1(3):131 - 136.

Autor de correspondência

Isabel Cristina Rodrigues da Silva.
Campus Universitário, s/n, Centro Metropolitano.
CEP: 72220-275, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
belbiomedica@gmail.com



Review

MAOA *uVNTR* Genetic Variant and Major Depressive Disorder: A Systematic Review

Ana Beatriz Castro Gonçalves ¹, Caroline Ferreira Fratelli ², Jhon Willatan Saraiva Siqueira ¹,
Ligia Canongia de Abreu Cardoso Duarte ², Aline Ribeiro Barros ², Isabella Possatti ², Mauricio Lima dos Santos ³,
Calliandra Maria de Souza Silva ³ and Isabel Cristina Rodrigues da Silva ^{3,*}

¹ Pharmacy Course, Faculty of Ceilândia, University of Brasília (UnB), Brasília—Federal District (DF), Brasília 72220-900, Brazil

² Postgraduate Program in Health Sciences and Technologies, Faculty of Ceilândia, University of Brasília (UnB), Brasília—Federal District (DF), Brasília 72220-900, Brazil

³ Clinical Analysis Laboratory, Molecular Pathology Sector, Pharmacy Department, Faculty of Ceilândia, University of Brasília (UnB), Brasília—Federal District (DF), Brasília 72220-900, Brazil

* Correspondence: belbiomedica@gmail.com; Tel.: +55-(61)-3107-8400



Citation: Castro Gonçalves, A.B.; Ferreira Fratelli, C.; Saraiva Siqueira, J.W.; Canongia de Abreu Cardoso Duarte, L.; Ribeiro Barros, A.; Possatti, I.; Lima dos Santos, M.; de Souza Silva, C.M.; Rodrigues da Silva, I.C. MAOA *uVNTR* Genetic Variant and Major Depressive Disorder: A Systematic Review. *Cells* 2022, 11, 3267. <https://doi.org/10.3390/cells11203267>

Academic Editors: Boldizsár Cséhi and Luisa Alexandra Meites Pinto

Received: 11 July 2022

Accepted: 16 September 2022

Published: 17 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Major Depressive Disorder (MDD) is a highly prevalent multifactorial psychopathology affected by neurotransmitter levels. Monoamine Oxidase A (MAOA) influences several neural pathways by modulating these levels. This systematic review (per PRISMA protocol and PECOS strategy) endeavors to understand the MAOA *uVNTR* polymorphism influence on MDD and evaluate its 3R/3R and 3R* genotypic frequencies fluctuation in MDD patients from different populations. We searched the Web of Science, PubMed, Virtual Health Library, and EMBASE databases for eligible original articles that brought data on genotypic frequencies related to the MAOA *uVNTR* variant in patients with MDD. We excluded studies with incomplete data (including statistical data), reviews, meta-analyses, and abstracts. Initially, we found 43 articles. After removing duplicates and applying the inclusion/exclusion criteria, seven articles remained. The population samples studied were predominantly Asians, with high 3R and 4R allele frequencies. Notably, we observed higher 3R/3R (female) and 3R* (male) genotype frequencies in the healthy control groups and higher 4R/4R (female) and 4R* (male) genotype frequencies in the MDD groups in the majority of different populations. Despite some similarities in the articles analyzed, there is still no consensus on the MAOA *uVNTR* variant's role in MDD pathogenesis.

Keywords: Major Depressive Disorder; Monoamine Oxidase A; MAOA *uVNTR*; genetic polymorphism; pharmacogenetics; risk-factors

1. Introduction

Major Depressive Disorder (MDD) is a psychiatric condition marked by various mood changes (e.g., sad, empty, or irritable) and reduced interest and pleasure for at least two weeks, among other varying symptoms. Considered one of the most prevalent mood disorders [1,2], the intensity of symptoms can be disabling with clinically significant suffering [3]. The high rates of first-line treatment remission (30–40%) have patients often undergoing multiple subsequent courses of antidepressants or augmentation strategies, making MDD a formidable public health challenge for front-line clinicians and researchers [4].

Worldwide more than 350 million people were estimated to suffer from MDD in 2017 [3,5], and by the year 2030, MDD should become the highest global burden of disease, according to the World Health Organization (WHO) [1,6,7]. This burden would represent not only a critical compromise of the affected population's quality of life but also a significant economic impact—even without not considering the impact of the COVID-19 pandemic on the disorder. The COVID-19 pandemic triggered a 25% increase in depression

($p = 0.029$) and anxiety ($p = 0.0001$) prevalence worldwide in just its first year [8]. Its actual impact on the world's mental health is still to be determined [9,10].

The mechanisms for developing MDD are not well understood as the cause seems to involve a complex interaction of several factors, including biological (genetic/physiological) and psychosocial (environmental) [7]. Among the various theories to explain this disease onset, the most cited is the monoaminergic hypothesis [11], in which the scarcity of neurotransmitters, such as serotonin and norepinephrine in the synaptic cleft contributes significantly to symptomatological manifestations. However, this theory does not explain all aspects of the disease, reinforcing the multifactorial aspect of its etiology [12]. Several genetic and environmental models have been proposed to relate these diverse aspects to MDD etiology.

The Monoamine Oxidase A (MAOA) gene, located in the p11.23 region of the X chromosome, is an attractive candidate for genetic studies due to its influence on several neural pathways [13]. As MAOA is an X-linked gene, males are considered hemizygotes (have only one allele, e.g., A* or B*, with * indicating the missing chromosome) for the gene, given that males only have one X chromosome, whereas females can be homozygotes (have two of the same allele, e.g., A/A) or heterozygotes (have two different alleles, e.g., A/B) for the gene. This gene is responsible for producing the MAOA mitochondrial outer membrane enzyme isotype that acts in the oxidative catalysis of monoamines in the synaptic cleft, regulating the brain's monoamine levels [13]. The MAOA enzyme has a higher affinity for hydroxylated amines, such as serotonin, dopamine, and noradrenaline [6], and is mainly expressed in catecholaminergic presynaptic neurons [14]. Dysfunctions in this enzyme function or levels may lead to neuropsychiatric disorder pathogenesis and clinical manifestations, including depression [15]. Consequently, the MAOA genetic variants (polymorphisms) that alter its gene transcriptional activity or enzyme function/activity may contribute to an imbalance in the monoaminergic neurotransmission system [16].

Sabol et al. [17] identified the MAOA upstream variable number of tandem repeats (uVNTR) functional polymorphism in the MAOA gene's promoter region that seems to affect its transcriptional [17,18] and enzyme activity [18], as measured in blood or brain [18], but not its mRNA abundance [18]. MAOA uVNTR polymorphism also does not seem to affect its gene's methylation [18]. This polymorphism consists of repeating sequences of 30 base pairs—2, 3, 3.5, 4, 5, or 6 repeats (R). The 3R (also known as 1) has low transcriptional efficiency and is classified as a low-activity allele (sometimes also called short-form alleles), whereas the presence of the 3.5R (also known as 2) and 4R (also known as 3) alleles leads to a more efficient transcriptional activity and, hence, they are classified as high-activity alleles (sometimes also called long-form alleles) [17]. There is still no consensus regarding the other alleles' transcriptional influence; although some consider 2R and 5R (also known as 4) low-activity alleles [16,17,19,20], others consider them high [21–26].

Considering the MAOA uVNTR variant's influence on the MAOA enzyme's transcriptional and enzymatic activity and the role of monoamine deficiency in MDD pathogenesis, it is theorized that the 3R low-activity allele may act as a protective factor against MDD [27]. Nevertheless, the evidence on the MAOA uVNTR variant's influence on MDD development is limited and divergent. The present systemic review evaluated the MAOA uVNTR's 3R/3R (female homozygote) and 3R* (male hemizygote) genotypic frequency fluctuations in MDD studies conducted in different populations.

2. Materials and Methods

2.1. Search Strategy and Selection Criteria

The present systematic review was developed following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (Prisma) guidelines, pending PROSPERO number due to COVID-19 reviews prioritization (registered on the 10th of April 2022, CRD42022324909). Our inclusion criteria were based on Population, Exposure, Comparison, Outcome, and Study type (PECOS) strategy, considering: (1) population: human research participants with Major Depressive Disorder (MDD); (2) exposure: MAOA uVNTR

genetic variant; (3) comparison: the *MAOA uVNTR* variant's 3R/3R (female homozygote) and/or 3R* (male hemizygote) genotypic frequencies; (4) outcome: 3R/3R and/or 3R* genotypic frequencies fluctuation in different populations; (5) study type: observational and interventional.

For this, we included observational or interventional studies that presented data on the *MAOA uVNTR*'s variant genotypic and allelic frequencies in human research participants with MDD and described their laboratory methods according to our eligibility criteria. However, studies with incomplete data (including statistical data), reviews, meta-analyses, abstracts, and studies not in English, Spanish, or Portuguese were excluded.

We searched, on the 11th of May 2022, employing the databases Web of Science, PubMed, Virtual Health Library (BVS), and EMBASE with no adopted filters, including the year of publication of the articles. The indexed terms (descriptors) researched were “*MAOA uVNTR*,” “*Depressive Disorder, Major*,” and “*Polymorphism, Genetic*,” the last two as described by the Medical Subject Headings (MeSH) vocabulary thesaurus, combined by the boolean operator “AND.”

2.2. Study Selection and Data Extraction

Two reviewers (CF and AG) collaborated on the article selection in two phases. Each reviewer in the first phase independently analyzed each article's title and abstract, verifying their eligibility according to the PECOS strategy. The Rayyan tool, developed by the Qatar Computing Research Institute (QCRI), was used to assist this initial analysis, while Mendeley Desktop version 1.19.4 software helped remove duplicates. In the second phase, the same two reviewers (CF and AG) independently performed the full-text analysis of the pre-selected articles, always observing the pre-established eligibility criteria. For this, Mendeley Desktop software version 1.19.4 was also used.

In both phases, disagreements or doubts were discussed between the two reviewers, and a third reviewer (CS) was consulted if a disagreement was unresolved. The two reviewers (CF and AG) independently extracted pre-defined data into an electronic spreadsheet in Microsoft Office Excel; these were: author, study title, objective, year of publication, the country in which the study was carried out, variants studied, 3R/3R and 3R* genotypic frequencies, sample size, laboratory methodology, main result, and *p*-value. Relevant or other up-to-date original publications in the field have also been included in the introduction and discussion section.

2.3. Bias Risk in Each Study

Risk models are usually based on either examining genetic variants or analyzing genetic and environmental risk factors. We examined the selected articles' bias risk using the Genetic Risk Prediction Studies (GRIPS) Guideline [28,29], comprised of 25 items, to rate the articles' quality. This review only considered 20 items (verifying the item's presence or absence) when evaluating the studies' quality. We considered that an article was of good quality if it presented at least 75% of the items.

This step was performed independently by two reviewers (CF and AG). Any disagreements were resolved after discussing with the third reviewer (IS).

3. Results

3.1. Articles' Search, Selection, and Quality Assessment

Initially, we identified 43 articles by searching four databases. After removing duplicates, 20 studies were selected for the title and abstract analysis, observing the aspects delimited by PECOS. Among these, 11 were selected for full-text analysis. After considering previously established inclusion and exclusion criteria, seven articles were eligible for inclusion in this systematic review (Figure 1, Table 1).

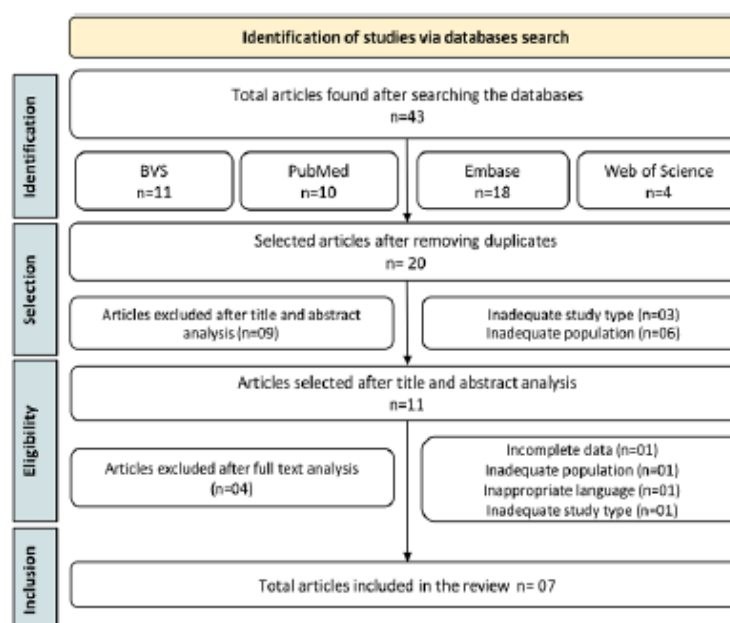


Figure 1. Flowchart outlining the steps adopted in the articles' selection.

Table 1. The comparison of different populational studies that investigated the MAOA uVNTR polymorphism associated with Major Depression Disorder (MDD).

Author	Year	Title	Country	Objective	Sample	Genetic Variant	Genotype Frequency (3R/3R and 3R*)	Laboratorial Test	Results	p-Value ^a (3R/3R and 3R*)
Huang et al. [30]	2009	Association of monoamine oxidase A (MAOA) polymorphisms and clinical subgroups of major depressive disorders in the Han Chinese population	Taiwan	Investigate whether the MAOA gene's uVNTR and EcoRV variants are associated with MDD or other MDD clinical subgroups in a Han Chinese Taiwanese population.	MDD = 277 Control = 308	MAOA EcoRV ⁸ (rs1137070) MAOA uVNTR	MDD: F = 40.6% (n = 69); M (3R*) = 57.9% (n = 62); Total: 47.29% (n = 131). Control: F = 32.4% (n = 36); M (3R*) = 62.9% (n = 124); Total: 51.95% (n = 160).	PCR per Zhu et al. [31]'s and PCR-RFLP per Breakfield et al. [32]'s protocols	Among females, the MAOA uVNTR genotypic frequencies showed a weak association between severe MDD and control (p = 0.041), but not among males (p > 0.1). However, after multiple logistic regression analyses, the association was not maintained.	F (genotype) = 0.158 M (allele) = 0.393

Table 1. Cont.

Author	Year	Title	Country	Objective	Sample	Genetic Variant	Genotype Frequency (3R/3R and 3R*)	Laboratorial Test	Results	p-Value * (3R/3R and 3R*)
Du et al. [23]	2004	MAO-A gene polymorphisms are associated with major depression and sleep disturbance in males	Canada	Investigate whether the MAOA gene's uVNTR and EcoRV variants are associated with MDD, specific depressive symptoms, or both.	MDD = 191 Control = 233	MAOA EcoRV@ (rs1137070) MAOA uVNTR	MDD: F = 35% (n = 79); M (3R*) = 43.6 (n = 34); Total: 37.17% (n = 113). Control: F = 31.4% (n = 81); M (3R*) = 29.8% (n = 31); Total: 30.94% (n = 112).	PCR per Deckert et al. [21]'s protocol	The alleles' distribution showed no statistical difference between patients and the control group, but in male patients, it tended toward significance (p = 0.055), suggesting that there may be a biological-sex-base relationship between the polymorphism and MDD.	F (allele) = 0.4 M (allele) = 0.055
Rivera et al. [26]	2009	High-Activity Variants of the uMAOA Polymorphism Increase the Risk for Depression in a Large Primary Care Sample	Spain	Clarify the MAOA uVNTR polymorphism association with depression, in a large and well-characterized representative population, in primary care.	MDD = 243 Control = 980	MAOA uVNTR	MDD: F = 11% (n = 23); M = 26% (n = 9); Total: 13.17% (n = 32). Control: F = 17% (n = 113); M = 34.5% (n = 107); Total: 22.45% (n = 220).	PCR	MAOA uVNTR's high-activity (3.5R, 4R, 5R, and their combinations) variants in females correlated with MDD (p = 0.048) but not in males (p = 0.229).	F = 0.024 M = 0.229 Total (M + F) = 0.0014
Yu et al. [33]	2005	Association Study of a Monoamine Oxidase A Gene Promoter Polymorphism with Major Depressive Disorder and Antidepressant Response	China	Study the MAOA uVNTR polymorphism's association in a Chinese population and its influence on MDD patients' antidepressant therapeutic response (fluoxetine treatment for four weeks observation).	MDD = 230 Control = 217	MAOA uVNTR	MDD: F = 25.6% (n = 34); M (3R*) = 48.4% (n = 46); Total: 35.09% (n = 80). Control: F = 44.5% (n = 49); M (3R*) = 66.0% (n = 68); Total: 54.93% (n = 117).	PCR	Female 3R/3R genotype carriers responded better to 4-week fluoxetine treatment than those with 4R alleles (p = 0.024). Furthermore, 4R allele carriers are more common in the MDD group, regardless of biological sex.	F (genotype) = 0.008 M (allele) = 0.015

Table 1. Cont.

Author	Year	Title	Country	Objective	Sample	Genetic Variant	Genotype Frequency (3R/3R and 3R*)	Laboratorial Test	Results	p-Value ^a (3R/3R and 3R*)
Lung et al. [27]	2011	Association of the MAOA promoter uVNTR polymorphism with suicide attempts in patients with major depressive disorder	Taiwan	Investigate the MAOA uVNTR variant's role in MDD, suicide attempts, or both.	MDD = 379 Control = 420	MAOA uVNTR	MDD ^{bc} : F = 36.08% (n = 105); M (3R*) = 48.96% (n = 94); Total: 41.20% (n = 199). Control ^{bc} : F = 35.87% (n = 99); M (3R*) = 59.63% (n = 130); Total: 46.36% (n = 229)	PCR	The high activity 4R allele seems related to depression, as it was more common among male participants with MDD than those without (p = 0.041); it also seems to affect suicide attempts associated with depressive symptoms in males indirectly.	F (allele) = 0.639 M (allele) = 0.041
Won et al. [34]	2016	Regional cortical thinning of the orbitofrontal cortex in medication-naïve female patients with major depressive disorder is not associated with MAOA-uVNTR polymorphism	Korea	Investigate the difference in orbitofrontal cortex thickness between medication-naïve female MDD patients and healthy controls and the MAOA uVNTR genotype's influence on orbitofrontal cortex thickness in depression.	MDD = 31 Control = 43	MAOA uVNTR	MDD: F = 41.93% (n = 13). Control: F = 39.53% (n = 17).	Genotyping per Manor et al. [35]'s protocol	MDD patients presented thinning in bilateral medial (p < 0.01) and in the right lateral (p = 0.002) orbitofrontal cortex compared to healthy controls, regardless of their MAOA uVNTR genotype.	F (allele) = 0.542
Sanabrais-Jiménez et al. [36]	2021	Association study of Catechol-O-Methyltransferase (COMT) rs4680 Val158Met gene polymorphism and suicide attempt in Mexican adolescents with major depressive disorder	Mexico	Analyze the association between SLC6A4, DRD2, COMT, and MAOA genes and suicide attempts in Mexican adolescent MDD patients.	MDD = 197	MAOA uVNTR	MDD ^{bc} : F = 18.5% (n = 23); M (3R*) = 41.2% (n = 28); Total: 26.56% (n = 51).	Genotyping per Camarena et al. [37]'s protocol	The MAOA uVNTR variant did not correlate with suicide attempts in MDD patients (p > 0.05).	F (genotype) = 0.64 M (allele) = 0.92

Note: 3R*—male hemizygotes for the 3R allele; F—females and M—males; MDD^{bc}: value calculated by uniting different MDD subgroups (e.g., with/without suicide attempt) into one; Control^{bc}: value calculated by uniting control subgroups (e.g., with/without suicide attempt) into one. ^a Statistical test: Chi-square (χ^2) test. ^b MAOA EcoRV (rs1137070; 1460C > T) genetic variant affects its enzyme activity and its alleles are differentiated by the absence (−; C) or presence (+; T) of the EcoRV restriction length polymorphism site on exon 14 (position 1460).

Articles that did not meet the eligibility criteria (the PECOS strategy) were excluded, and their reason for exclusion is described in Table S1.

Table S2 presents the results of the selected articles' bias risk analysis and quality determination using the Genetic Risk Prediction Studies (GRIPS) Guideline (20 items and two sub-items of 25 items). Of articles analyzed in this study, 57.1% (4) had at least 75% (16.5) or more items and were considered of good quality [26,27,30,33]. The lowest score was 68.2% (15 items) [36]. Table S3 summarizes the selected articles' selection criteria for MDD and control groups, the participants' ethnicity/race, and the articles' employed statistical analysis.

3.2. Selected Studies' General Characteristics

As shown in Table 2, most studies were conducted on the Asian continent, mainly in Taiwan [27,30], followed by the American and European continents. Regarding demographic data, most studies were conducted with adults over 18 years old, and females were more frequent within the MDD patient groups.

Table 2. Comparison between *MAOA uVNTR* variant's 3R/3R (female homozygote) and 3R* (male hemizygote) genotype frequencies[®] in patients with Major Depression Disorder (MDD) and healthy controls in the studies reviewed per continent.

Continents	Works	MDD Group			Control Group		
		Female 3R/3R % (n)	Male 3R* % (n)	Total 3R/3R + 3R* % (n)	Female 3R/3R % (n)	Male 3R* % (n)	Total 3R/3R + 3R* % (n)
Asian	Yu et al. [33] 2005 (China)	25.6 (34)	48.4 (46)	35.1 (80)	44.5 (49)	66 (68)	54.93 (117)
	Huang et al. [30] 2009 (Taiwan)	40.6 (69)	57.9 (62)	47.29 (131)	32.4 (36)	62.9 (124)	51.95 (160)
	Lung et al. [27] 2011 (Taiwan)	36.08 (105)	48.96 (94)	41.2 (199)	35.87 (99)	59.63 (130)	46.36 (229)
	Won et al. [34] 2016 (Korea)	41.93 (13)	-	41.93 (13)	39.53 (17)	-	39.53 (17)
American	Du et al. [23] 2004 (Canada)	35 (79)	43.6 (34)	37.17 (113)	31.4 (81)	29.8 (3)	30.94 (112)
	Sanabrais-Jiménez et al. [36] 2021 (Mexico)	18.5 (23)	41.2 (28)	26.56 (51)	-	-	-
European	Rivera et al. [26] 2009 (Spain)	11 (23)	26 (9)	13.17 (32)	17 (113)	34.5 (34.5)	22.45 (220)

* Male hemizygotes for the 3R allele. [®] Individual and combined 3R/3R and 3R* frequencies were calculated from all frequencies of all genotypes for each data group [(genotype of interest) ÷ (all genotypes) × 100].

3.3. *MAOA uVNTR* Genotypic Frequency

In general, the *MAOA uVNTR* variant's high-activity 4R allele had the highest frequency in the populations studied, followed by the low-activity 3R allele. While the 2R, 3.5R, 5R, and 6R alleles, in most studies, were considered rare, being found in few patients or not found at all [23,26,27,30,33,34]. This finding confirms Sabol et al.'s [17] report that the 3R and 4R alleles are the most common among distinct ethnic populations. Taking into account the 3R/3R (female homozygote) and 3R* (male hemizygote) genotype frequencies reported by the articles included in this systematic review, we noted that in all studies, their individual and combined frequencies were lower than 60% in populations diagnosed with MDD [23,26,27,30,33,34] (Tables 1 and 2).

Du et al. [23] found a combined 3R/3R and 3R* genotypic frequency of 37.2%, similar to Yu et al. [33] who estimated 35.1%, while Lung et al. [27], in turn, found a 41.2% frequency and Sanabrais-Jiménez et al. [36] a 26.6% frequency. The highest frequency estimated was 47.3% by Huang et al. [30], in contrast, the lowest frequency was 13.1%, estimated by

Rivera et al. [26]. Won et al. [34] found a 41.93% 3R/3R frequency in the female MDD patients they analyzed (Tables 1 and 2). The lower percentage of the 3R/3R and 3R* genotypes in the majority of MDD groups might indirectly indicate a protective role against MDD, depending on the population (Tables 1 and 2).

4. Discussion

4.1. MAOA uVNTR and Its Genotypic Frequency in Major Depressive Disorder (MDD)

Different factors can influence genotypic frequency in different populations and study groups. Among them, we highlight population stratification and ethnicity, sample size, different symptom detection and diagnosis methodologies applied to case and control groups and also between different studies, phenotype definition (case group), unscreened control groups, multiallelic gene organization, and variations related to sex, e.g., the MAOA gene is located on the X chromosome (X-inactivation process also called lyonization and males only have one allele), or even hormonal effects [26,30,33,34]. Some might explain the significant variation in MAOA uVNTR polymorphism genotype frequencies between the analyzed populations. In the studies conducted in an Asian population, female patients diagnosed with Major Depressive Disorder (MDD) and a 3R/3R (female homozygote) genotype had frequencies that varied between 25 and 42%, while in male MDD patients with a 3R* (male hemizygote) genotype, the frequency varied from 48 to 58% (Tables 1 and 2). In contrast, in Caucasians/Hispanics/Latino, these frequency values ranged between 11 and 35% and from 26 to 44%, respectively (Tables 1 and 2).

Among the studies conducted with Asian populations, Yu et al. [33] found the lowest 3R/3R genotype (25.6%) frequency distribution of the MDD groups. This lower frequency could be due to their study's small female MDD sample size ($n = 34$), although Won et al. [34] found a 41.9% 3R/3R frequency in the 13 female MDD patients they analyzed. Interestingly, Yu et al.'s [33] control group also had the highest 3R/3R genotype frequency (44.5%), and among MDD patients, the highest 3R/4R genotype frequency (57.1%) within the Asian studies [19]. Similar to Guitierrez et al. [25] in Spain and Kersting et al. [38] in Germany, female 4R high-activity allele carriers were common in the MDD group (Chi-square Test, $X^2 = 9.65$, $df = 2$, $p = 0.008$) [19]. Same with male 4R* carriers ($X^2 = 6.27$, $df = 1$, $p = 0.015$) [19]. In turn, Lung et al. [27] and Huang et al. [30] had higher frequencies for the combined 3R/3R and 3R* genotypes (41.2% and 47.3%, respectively). Likewise, in these studies, the 3R/3R and 3R* genotype frequency was also usually higher in the control group, except for Huang et al.'s [30] 3R/3R genotype, compared to the MDD patients' groups (Tables 1 and 2). The 3R allelic frequencies for the control groups were comparable between studies, ranging from 52% to 67.4% [27,30,33,34]. These frequencies were consistent with those estimated by Kunugi et al. [39] in a Japanese population with unipolar depression (60%).

In Rivera et al.'s [26] study, the combined 3R/3R and 3R* genotype frequency in a Spanish population with MDD was estimated at 13.1%, similar to another Spanish study with MDD patients (16.8%) [25]. Notably, the Rivera et al. [26] study used two instruments for diagnosis, the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders—Fourth Edition (DSM-IV) and the Composite International Diagnostic Interview (CIDI) per the International Classification of Diseases—10th edition (ICD-10), with separate analyses for the different phenotypes (ICD-10 depressive episode; ICD-10 severe depressive episode and DSM-IV major depression, MDD). Furthermore, the authors grouped the MAOA uVNTR variants' high-activity 3.5R and 4R alleles, the 5R allele, and their combinations (homozygous and heterozygous genotypes) as high-activity alleles and genotypes, respectively [26]. Du et al. [23] also grouped these alleles into a single allele group for analysis against the low-activity allele 3R. Although 5R is rare, it is controversial regarding its transcriptional efficiency (see the Introduction), so subdivisions, such as these might contribute to a sample reduction for each analysis, influencing the frequency estimates [23–26,40]. The 3R/3R and 3R* genotypes frequency obtained by Du et al. [23] in a Canadian MDD patient sample (Hamilton Depression Rating Scale, HAM-D: males, 22.9 ± 3.5 ; females, 23.6 ± 3.2) was

37.2%, close to the 40% reported by Schulze et al. [40] for recurrent depression (DSM-IV) in a German population.

Most control groups had the 3R/3R and 3R* genotype frequencies higher than those of the MDD groups (Tables 1 and 2), a fact that may represent an intriguing finding as the 3R allele presence may represent a protective factor for MDD. This protection might be due to the lower MAOA transcriptional efficiency [17,41] and enzymatic activity [18] that the 3R allele confers, contributing to the maintenance of central serotonin levels [33].

The 4R allele is highly active [18], which may help reduce serotonin levels in the central nervous system, possibly modulating the risk of depression [27]. Lung et al. [27] explored the MAOA uVNTR variant association with MDD and suicide attempts. The authors found that the 4R allele frequency was significantly higher in men with the disorder compared to male community controls ($\chi^2 = 4.182$, $p = 0.041$), irrespective of if they had attempted suicide, and that 4R* males had a 1.586 (Odds Ratio Confidence Interval, OR CI: 1.019–2.467) times higher risk of developing depression than 3R* males. Although their logistic regression analysis did not confirm this association, the 3R allele was more present in male community controls (60.98%, Tables 1 and 2). The 4R allele also appeared to indirectly affect suicide attempts associated with depressive symptoms (structural equation modeling, SEM ~ MAOA-depression: $b = -0.12$, $p = 0.031$; depression-suicide: $b = 0.32$, $p < 0.001$), conferring a vulnerability to suicide in MDD men [27]. Similarly, Sanabrais-Jiménez et al. [36] investigated SLC6A4 (5HTTLPR/rs25531), DRD2 (rs6275), COMT (rs4680), and MAOA uVNTR polymorphisms' influences on suicide attempts in Mexican adolescents diagnosed with MDD (DSM-IV major depression). However, unlike Lung et al. [27], the MAOA uVNTR variant did not correlate with suicide attempts in these patients (females—genotype: $\chi^2 = 0.86$, $p = 0.64$; allele: $\chi^2 = 0$, $p = 1$ | males— $\chi^2 = 0.008$, $p = 0.92$)—results compatible with those found by Hung et al. [42] in his metanalysis.

Du et al. [23] investigated MAOA (EcoRV and uVNTR) polymorphisms' connection with MDD and depressive symptoms and found that MAOA uVNTR did not associate with MDD, although it trended towards significance in male patients ($p = 0.055$). Du et al. [23] did find a highly significant linkage disequilibrium (a nonrandom association of alleles of different loci) between MAOA's uVNTR and EcoRV variants ($D'_{\text{controls}} = -0.79$; $p < 0.0001$; $D'_{\text{patients}} = 0.84$; $p < 0.0001$). They also found that the EcoRV allele with the EcoRV site present and MAOA uVNTR's 3R allele significantly correlated with depression in males better than any of the polymorphic alleles alone ($p = 0.008$; OR = 2.5, OR CI = 1.3–4.8) and with higher insomnia scores compared to other haplotype carriers (HAM-D clusters compared by unpaired Student *t*-test, $t = 2.7$, $p = 0.008$), even after correction for multiple testing ($p = 0.048$ in both cases) [23]. Huang et al. [30] also found a strong linkage disequilibrium between these MAOA variants but found no significant differences in the haplotype frequencies in total MDD patients (DSM-IV major depression; HAM-D ≥ 18) or MDD clinical subgroups ($18 \leq \text{HAM-D} \leq 24$: moderate MDD; HAM-D > 24 : severe MDD; MDD with and without a first-degree family member with a history of MDD or bipolar disorder) versus controls ($p > 0.05$, data not shown).

Rivera et al. [26] found an association between high-activity alleles (3.5R; 4R; and the supposedly 5R; see the Introduction) and MDD in female Spanish patients ($p = 0.048$), similarly to Huang et al. [30]; who found a weak association between severe MDD group and its genotypic frequencies among female Taiwanese participants ($p = 0.041$). However, like with Lung et al. [27]; the association was not maintained after multiple logistic regression analyses; suggesting that the MAOA uVNTR variant may not play a central role in the risk of developing MDD [30]. Yu et al. [33] also assessed the association between the MAOA uVNTR polymorphism and MDD (DSM-IV major depression; HAM-D-1967 ≥ 18) and found that the 4R allele was more common in MDD women ($\chi^2 = 6.93$; $df = 1$; $p = 0.009$) and MDD men ($\chi^2 = 6.27$; $df = 1$; $p = 0.015$) compared to the control group (mostly composed of medical staff) [33]. These findings suggest a non-gender-specific effect on MDD given the increased 4R allele presence in the MDD group ($\chi^2 = 12.48$; $df = 1$; $p < 0.001$), even considering X-inactivation at the MAOA locus ($\chi^2 = 10.72$; $df = 1$; $p = 0.001$) [33].

Like with the Brazilian population; there is a lack of studies analyzing the *MAOA uVNTR* variant effect on patients diagnosed with MDD. Other studies trying to relate this variant to other monoamine-metabolism-affected neurological/psychopathological disorders: such as aggression and antisocial behavior; mood disorders; schizophrenia; autism spectrum disorders; substance use disorders; and even Alzheimer's disease; were found in the literature [43–45]. For instance: the high-activity alleles' presence correlated with clinical improvement of opposing symptoms in male children and adolescents with Attention Deficit Hyperactivity Disorder using methylphenidate ($p < 0.001$) [46]; the occurrence of bilateral tonic-clonic seizures in patients with epilepsy ($p = 0.032$) [47]; and increased consumption of lipid-dense foods in preschool children ($p = 0.009$) [48]. At the same time: the low-activity allele correlated with an early-age onset of alcohol dependence ($p = 0.01$) and a more considerable amount of antisocial personality symptoms after age 15 ($p = 0.02$) [49].

Such associations and those with MDD seem to indicate this polymorphism's influence on monoaminergic metabolic pathways. The WHO estimates a 5.8% prevalence of depressive disorders in Brazil [1], a country composed of a population with a heterogeneous genetic makeup—Native Americans, Europeans, and Africans [43]. This heterogeneity highlights the need for further studies evaluating the behavior of the *MAOA uVNTR* variant's genotypic distribution and allelic frequencies in multiracial populations, together with more single ethnicity populations studies, to fill the knowledge gaps and build better risk prediction models.

4.2. *MAOA uVNTR* Genetic Variant and Cortical Thickness

Neuroimaging studies are essential when analyzing mood disorders as they help identify neuroanatomical alterations in brain regions brought on by the disorder, its treatment, and other factors [4,34]. Suh et al.'s [4] systematic review and meta-analysis analyzed neurobiological differences between MDD (medicated and medication-naïve) patients ($n = 1073$) and healthy controls ($n = 936$). They found that MDD patients have a significant cortical thinning in the bilateral medial orbitofrontal cortex (OFC), left pars opercularis, and left calcarine fissure/lingual gyrus, as well as a significant thickening in the left supramarginal gyrus compared to healthy controls. However, it is still unclear what factors may contribute to these alterations in MDD [4,34].

The OFC seems to regulate mood, reward-guided behavior, and impulse control; thus, damage to this structure might create deficits in an individual's emotional and social regulation and mood lability [34]. With the majority of imaging genetics studies conducted on *MAOA uVNTR* polymorphism reporting its genotype relevance to OFC structure in healthy controls, Won et al. [34] compared this variant effect on OFC thickness of Korean female MDD patients (medication-naïve; HAM-D: 20.96 ± 5.09) and healthy controls (HAM-D: 2.41 ± 2.20). Similar to Suh et al. [4]'s results, Korean MDD patients presented cortical thinning in the bilateral medial (left— $F(1,71) = 8.117$, $p = 0.006$; right— $F(1,71) = 21.795$, $p < 0.001$) and in the right lateral ($F(1,71) = 9.932$, $p = 0.002$) OFC compared to healthy controls, regardless of their *MAOA uVNTR* genotype (*MAOA uVNTR* high-activity allele carriers, 3R/4R and 4R/4R, or *MAOA uVNTR* low-activity allele carriers, 2R/3R and 3R/3R).

Although these results suggest that OFC structural alterations are associated more with MDD pathophysiology than *MAOA uVNTR* polymorphism, this lack of correlation might be due to the samples' composition, as *MAOA uVNTR* genotype-dependent OFC structural changes have usually been observed in males but not females [43,50–54].

4.3. *MAOA uVNTR* Genetic Variant and Pharmacotherapy

Drugs with a mechanism of action that increases neurotransmitter levels in the synaptic cleft by inhibiting specific transporters have an antidepressant effect, such as monoamine oxidase inhibitors (MAOI) and other drugs [23,45,55,56]. In their MDD patients study, Yu et al. [33] observed that female (3R/3R genotype) patients responded better to 4-week fluoxetine (an antidepressant belonging to the Selective Serotonin Reuptake

Inhibitors, SSRI, class) treatment than those carrying the 4R allele (3R/3R: $46.9 \pm 19.0\%$, 3R/4R: $37.3 \pm 19.8\%$, 4R/4R: $34.1 \pm 19.4\%$, respectively, $p = 0.024$) according to the change in the Hamilton Depression Rating Scale (HAM-D). Contrarily, the difference in male (3R* genotype) patients' responses was nonsignificant (3R*: $39.1 \pm 21.0\%$, 4R*: $31.0 \pm 23.6\%$, respectively, $p = 0.081$), possibly indicating a biological-sex-specific effect. Although a multiple linear regression analysis initially confirmed these findings ($p = 0.010$; $r^2 = 0.049$), the association was not maintained after correction for multiple testing stratified by biological sex [33]. Differently, Yoshida et al. [55] could not establish an association between plasma drug levels and MAOA uVNTR polymorphism's genotypes after a 6-week Fluvoxamine (SSRI) treatment in a Japanese population with MDD ($p = 0.92$).

Tzeng et al. [56], in turn, investigated the association between MAOA uVNTR polymorphism's genotypes and their response to the Mirtazapine, an atypical antidepressant belonging to the tetracyclic piperazine-azepine class, in a Taiwanese sample and found an association between medication use and treatment variations according to the genotype. In their study, 3R allele carriers had a better therapeutic response and higher remission rates after a 7-week Mirtazapine treatment. Noticeably, 3R allele carriers also had a lower dropout rate; however, the sample size was small ($n = 58$), which might generate a bias [56].

4.4. Quality Assessment and Limitations of Selected Articles

Genomic-wide association studies investigate the association of genotypic variations and characteristics expressed by individuals in different populations [57], including susceptibility/resistance to certain diseases and disorders. These studies have great applicability; among them is the implementation of these possible connections to construct analytical designs/models to predict the genetic risk of several diseases [58]. Studies to better understand genetic and environmental factors are increasingly important in scientific areas, specifically health. In this sense, the Genetic Risk Prediction Studies (GRIPS) guideline ensures a higher methodological quality of a study, enabling the minimization of biases that can compromise the interpretation of results [28,29].

We employed the GRIPS guideline, composed of 25 items, to assess the quality of the articles selected to integrate this systematic review (Table S2). Criteria chosen to analyze the quality of methods section were ten items (two sub-items), results: seven items, and discussion: three items, totaling 20 items (and two sub-items). We considered the study quality adequate if it had 75% (15) of the items, and all articles included met this criterion. We considered the study quality adequate if it had at least 75% (15) of the items, and all articles included in this review met this criterion. All articles [23,26,27,30,33,34,36] described the participants' eligibility criteria and sources and methods of selecting participants. They also made a generalized discussion and, when pertinent, revealed the importance of their study. Nevertheless, for instance, 71.4% [23,27,33,34,36] examined their limitations, one (14.3%) did not report their population's demographic and clinical characteristics [30], and none specified how they handled missing data in the analysis.

High-quality studies must be prepared transparently to facilitate the interpretation of the results' validity and assess their relevance. Observations in different populations are essential to generalize the research and help minimize the existing heterogeneity factor [59]. In this way, these studies allow the information to be extrapolated to different contexts and help construct an integrative data analysis model for eventual practical application [28].

5. Conclusions

Although some evidence suggests that the MAOA uVNTR variant's alleles are related to MDD manifestation, there is still no concrete accord on this association. In general, the MAOA uVNTR variant's 3R and 4R alleles had the highest frequency in the populations studied, whereas the 2R, 3.5R, 5R, and 6R alleles, in most studies, were considered rare or not found at all. Interestingly, the low-activity allele 3R presented a higher frequency in most control groups, and the reverse was true for the 4R allele in the studies when not grouped with other alleles. Nevertheless, the number of retrieved studies that met our

inclusion criteria was small, representing a limiting factor in this systematic review. The different allele groupings used in some of the articles' analyses also increased the difficulty in interpretation as some analyzed 3R/3R and 3R* genotype and allelic frequencies against 4R/4R and 4R*, while others grouped low-activity genotypes and alleles (3R) against high-activity ones (3.5R and 4R, that sometimes included 5R). Another limitation was the few represented populations.

Depression is a heterogeneous and multifactorial disease with both genetic and environmental factors influencing its development. Sex-specific effects and possible interactions with other polymorphisms and genes (e.g., linkage disequilibrium), as well as epigenetic and environmental factors, must be taken into account to understand this polymorphism influence on MDD better, thus contributing to the elucidation of the mechanisms related to this disorder—further studies on a larger scale and in other populations will help fill these gaps.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11203267/s1>, Table S1: Articles excluded according to criteria related to the defined PECOS strategy; Table S2: Quality Evaluation of articles according to the adapted GRIPS guideline; Table S3: The selected articles' selection criteria (MDD and control groups), ethnicity/race, and employed statistical analysis per their original authors, with few modifications.

Author Contributions: Conceptualization, C.F.F. and A.B.C.G.; methodology, C.F.F., A.B.C.G. and C.M.d.S.S.; formal analysis, C.F.F. and A.B.C.G.; data curation, C.F.F., A.B.C.G. and C.M.d.S.S.; writing—original draft preparation, C.F.F. and A.B.C.G.; writing—review and editing, C.F.F., A.B.C.G., J.W.S.S., A.R.B., I.P., L.C.d.A.C.D., M.L.d.S. and C.M.d.S.S.; visualization, C.F.F., A.B.C.G. and C.M.d.S.S.; supervision, C.M.d.S.S. and I.C.R.d.S.; project administration, C.F.F. and I.C.R.d.S.; funding acquisition, M.L.d.S. and I.C.R.d.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: No new data were created in this study, and the data presented in this review are available in its tables (Table 1, Tables S1 and S2) and the reviewed original articles.

Acknowledgments: We thank the University of Brasília's Research and Innovation Department (DPI/UNB) and Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES Foundation) for supporting our research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. World Health Organization. *Depression and Other Common Mental Disorders Global Health Estimates*; WHO/MSD/MER: Geneva, Switzerland, 2017; Volume 2.
2. de Menezes Galvão, A.C.; Almeida, R.N.; de Sousa, G.M.; Leocadio-Miguel, M.A.; Palhano-Fontes, F.; de Araujo, D.B.; Lobão-Soares, B.; Maia-de-Oliveira, J.P.; Nunes, E.A.; Hallak, J.E.C.; et al. Pathophysiology of Major Depression by Clinical Stages. *Front. Psychol.* **2021**, *12*, 641779. [CrossRef] [PubMed]
3. American Psychiatric Association. *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais: DSM-5—5a Edição*, 5th ed.; American Psychiatric Association: Arlington, VA, USA, 2014.
4. Suh, J.S.; Schneider, M.A.; Minuzzi, L.; MacQueen, G.M.; Strother, S.C.; Kennedy, S.H.; Frey, B.N. Cortical thickness in major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2019**, *88*, 287–302. [CrossRef] [PubMed]
5. Pan American Health Organization/World Health Organization. Depression. 2022. Available online: <https://www.paho.org/en/topics/depression> (accessed on 1 July 2022).
6. Pitsillou, E.; Bresnahan, S.M.; Kagarakis, E.A.; Wijoyo, S.J.; Liang, J.; Hung, A.; Karagiannis, T.C. The cellular and molecular basis of major depressive disorder: Towards a unified model for understanding clinical depression. *Mol. Biol. Rep.* **2020**, *47*, 753–770. [CrossRef] [PubMed]
7. Gutiérrez-Rojas, L.; Porras-Segovia, A.; Dunne, H.; Andrade-González, N.; Cervilla, J.A. Prevalence and correlates of major depressive disorder: A systematic review. *Braz. J. Psychiatry* **2020**, *42*, 657–672. [CrossRef]

8. Santomauro, D.E.; Mantilla Herrera, A.M.; Shadid, J.; Zheng, P.; Ashbaugh, C.; Pigott, D.M.; Abbafati, C.; Adolph, C.; Amlag, J.O.; Aravkin, A.Y.; et al. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. *Lancet* **2021**, *398*, 1700–1712. [CrossRef]
9. World Health Organization. Mental Health and COVID-19: Early Evidence of the Pandemic's Impact. Scientific Brief, 2 March 2022. Available online: https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Sci_Brief-Mental_health-2022.1 (accessed on 7 July 2022).
10. World Health Organization. COVID-19 Pandemic Triggers 25% Increase in Prevalence of Anxiety and Depression Worldwide. 2022. Available online: <https://www.who.int/news/item/02-03-2022-covid-19-pandemic-triggers-25-increase-in-prevalence-of-anxiety-and-depression-worldwide> (accessed on 7 July 2022).
11. Athira, K.V.; Bandopadhyay, S.; Samudrala, P.K.; Naidu, V.G.M.; Lahkar, M.; Chakravarty, S. An Overview of the Heterogeneity of Major Depressive Disorder: Current Knowledge and Future Prospective. *Curr. Neuropsychopharmacol.* **2020**, *18*, 168–187. [CrossRef]
12. Malhi, G.S.; Mann, J.J. Depression. *Lancet* **2018**, *392*, 2299–2312. [CrossRef]
13. NCBI. MAOA Monoamine Oxidase A [Homo Sapiens (Human)]. 2022. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4128> (accessed on 1 July 2022).
14. Naoi, M.; Maruyama, W.; Shamoto-Nagai, M. Type A monoamine oxidase and serotonin are coordinately involved in depressive disorders: From neurotransmitter imbalance to impaired neurogenesis. *J. Neural Transm.* **2018**, *125*, 53–66. [CrossRef]
15. Naoi, M.; Riederer, P.; Maruyama, W. Modulation of monoamine oxidase (MAO) expression in neuropsychiatric disorders: Genetic and environmental factors involved in type A MAO expression. *J. Neural Transm.* **2016**, *123*, 91–106. [CrossRef]
16. Plieger, T.; Melchers, M.; Felten, A.; Lieser, T.; Meermann, R.; Reuter, M. Moderator Effects of Life Stress on the Association between MAOA-uVNTR, Depression, and Burnout. *Neuropsychobiology* **2019**, *78*, 86–94. [CrossRef]
17. Sabol, S.Z.; Hu, S.; Hamer, D. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum. Genet.* **1998**, *103*, 273–279. [CrossRef] [PubMed]
18. Tunbridge, E.M.; Narajos, M.; Harrison, C.H.; Beresford, C.; Cipriani, A.; Harrison, P.J. Which Dopamine Polymorphisms Are Functional? Systematic Review and Meta-analysis of COMT, DAT, DBH, DDC, DRD1–5, MAOA, MAOB, TH, VMAT1, and VMAT2. *Biol. Psychiatry* **2019**, *86*, 608–620. [CrossRef]
19. Nilsson, K.W.; Åslund, C.; Comasco, E.; Orelund, L. Gene–environment interaction of monoamine oxidase A in relation to antisocial behaviour: Current and future directions. *J. Neural Transm.* **2018**, *125*, 1601–1626. [CrossRef] [PubMed]
20. Matsusue, A.; Kubo, S.I.; Ikeda, T.; Tani, N.; Maeda, T.; Kashiwagi, M.; Hara, K.; Waters, B.; Takayama, M.; Ikematsu, N.; et al. VNTR polymorphism in the monoamine oxidase A promoter region and cerebrospinal fluid catecholamine concentrations in forensic autopsy cases. *Neurosci. Lett.* **2019**, *701*, 71–76. [CrossRef] [PubMed]
21. Deckert, J.; Catalano, M.; Sygailo, Y.V.; Bosi, M.; Okladnova, O.; di Bella, D.; Nöthen, M.M.; Maffei, P.; Franke, P.; Fritze, J.; et al. Excess of High Activity Monoamine Oxidase A Gene Promoter Alleles in Female Patients with Panic Disorder. *Hum. Mol. Genet.* **1999**, *8*, 621–624. [CrossRef] [PubMed]
22. Pai, C.Y.; Chou, S.L.; Huang, E.-Y. Assessment of the role of a functional VNTR polymorphism in MAOA gene promoter: A preliminary study. *Forensic Sci. J.* **2007**, *6*, 37–43.
23. Du, L.; Bakish, D.; Ravindran, A.; Hrdina, P.D. MAO-A gene polymorphisms are associated with major depression and sleep disturbance in males. *Neuro Rep.* **2004**, *15*, 2097–2101. [CrossRef]
24. Sygailo, Y.V.; Stöber, G.; Grässle, M.; Reimer, E.; Knapp, M.; Jungkurz, G.; Okladnova, O.; Meyer, J.; Lesch, K.P. Association analysis of the functional monoamine oxidase A gene promoter polymorphism in psychiatric disorders. *Am. J. Med. Genet.* **2001**, *105*, 168–171. [CrossRef]
25. Gutiérrez, B.; Arias, B.; Gastó, C.; Catalán, R.; Papiol, S.; Pintor, L.; Fañanás, L. Association analysis between a functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter and severe mood disorders. *Psychiatr. Genet.* **2004**, *14*, 203–208. [CrossRef]
26. Rivera, M.; Gutiérrez, B.; Molina, E.; Torres-González, F.; Bellón, J.A.; Moreno-Küster, B.; King, M.; Nazareth, I.; Martínez-González, L.J.; Martínez-Espín, E.; et al. High-activity variants of the uMAOA polymorphism increase the risk for depression in a large primary care sample. *Am. J. Med. Genet. Part B: Neuropsychiatric Genet.* **2009**, *150B*, 395–402. [CrossRef]
27. Lung, F.W.; Tzeng, D.S.; Huang, M.E.; Lee, M.B. Association of the MAOA promoter uVNTR polymorphism with suicide attempts in patients with major depressive disorder. *BMC Med. Genet.* **2011**, *12*, 74. [CrossRef] [PubMed]
28. Janssens, A.C.J.W.; Ioannidis, J.P.A.; Bedrosian, S.; Boffetta, P.; Dolan, S.M.; Dowling, N. Strengthening the reporting of genetic risk prediction studies (GRIPS): Explanation and elaboration. *Eur. J. Clin. Invest.* **2011**, *41*, 1010–1035. [CrossRef]
29. Janssens, A.C.J.W.; Ioannidis, J.P.A.; van Duijn, C.M.; Little, J.; Khoury, M.J. Strengthening the Reporting of Genetic Risk Prediction Studies: The GRIPS Statement. *PLoS Med.* **2011**, *8*, e1000420. [CrossRef] [PubMed]
30. Huang, S.Y.; Lin, M.T.; Lin, W.W.; Huang, C.C.; Shy, M.J.; Lu, R.B. Association of monoamine oxidase A (MAOA) polymorphisms and clinical subgroups of major depressive disorders in the Han Chinese population. *World J. Biol. Psychiatry* **2009**, *10*, 544–551. [CrossRef] [PubMed]
31. Zhu, Q.; Grimsby, J.; Chen, K.; Shih, J. Promoter organization and activity of human monoamine oxidase (MAO) A and B genes. *J. Neurosci.* **1992**, *12*, 4437–4446. [CrossRef] [PubMed]
32. Breakefield, X.O.; Giller, E.L.; Nurnberger, J.L.; Castiglione, C.M.; Buchsbaum, M.S.; Gershon, E.S. Monoamine oxidase type a in fibroblasts from patients with bipolar depressive illness. *Psychiatry Res.* **1980**, *2*, 307–314. [CrossRef]

33. Yu, Y.W.Y.; Tsai, S.J.; Hong, C.J.; Chen, T.J.; Chen, M.C.; Yang, C.W. Association Study of a Monoamine Oxidase A Gene Promoter Polymorphism with Major Depressive Disorder and Antidepressant Response. *Neuropsychopharmacology* **2005**, *30*, 1719–1723. [\[CrossRef\]](#)
34. Won, E.; Choi, S.; Kang, J.; Lee, M.S.; Ham, B.J. Regional cortical thinning of the orbitofrontal cortex in medication-naïve female patients with major depressive disorder is not associated with MAOA-uVNTR polymorphism. *Ann. Gen. Psychiatry* **2016**, *15*, 26. [\[CrossRef\]](#)
35. Manor, I.; Tyano, S.; Mel, E.; Eisenberg, J.; Bachner-Melman, R.; Kotler, M.; Ebstein, R. Family-based and association studies of monoamine oxidase A and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): Preferential transmission of the long promoter-region repeat and its association with impaired performance on a continuous performance test (TOVA). *Mol. Psychiatry* **2002**, *7*, 626–632.
36. Sanabrais-Jiménez, M.A.; Aguilar-García, A.; Hernández-Muñoz, S.; Sarmiento, E.; Ulloa, R.E.; Jiménez-Anguiano, A.; Camarena, B. Association study of Catechol-O-Methyltransferase (COMT) rs4680 Val158Met gene polymorphism and suicide attempt in Mexican adolescents with major depressive disorder. *Nord. J. Psychiatry* **2021**, *76*, 202–206. [\[CrossRef\]](#)
37. Camarena, B.; Presán, A.; Aguilar, A.; Escamilla, R.; Saracco, R.; Palacios, J.; Tovilla, A.; Nicolini, H. Monoamine Oxidase A and B Gene Polymorphisms and Negative and Positive Symptoms in Schizophrenia. *ISRN Psychiatry* **2012**, *2012*, 852949. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Kersting, A.; Kroker, K.; Horstmann, J.; Baune, B.T.; Hohoff, C.; Mortensen, L.S.; Neumann, L.C.; Arolt, V.; Domschke, K. Association of MAOA-A Variant with Complicated Grief in Major Depression. *Neuropsychobiology* **2007**, *56*, 191–196. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Kunugi, H.; Ishida, S.; Kato, T.; Tatsumi, M.; Sakai, T.; Hattori, M.; Hirose, T.; Nanko, S. A functional polymorphism in the promoter region of monoamine oxidase-A gene and mood disorders. *Mol. Psychiatry* **1999**, *4*, 393–395. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Schulze, T.G.; Müller, D.J.; Krauss, H.; Scherk, H.; Ohlraun, S.; Sygailo, Y.V.; Windemuth, C.; Neidt, H.; Grässle, M.; Papasotiropoulos, A.; et al. Association between a functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter and major depressive disorder. *Am. J. Med. Genet.* **2000**, *96*, 801–803. [\[CrossRef\]](#)
41. Tunbridge, E.; Burnet, P.W.J.; Sodhi, M.S.; Harrison, P.J. Catechol-o-Methyltransferase (COMT) and Proline Dehydrogenase (PRODH) mRNAs in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Schizophrenia, Bipolar Disorder, and Major Depression; Synapse: New York, NY, USA, 2004; Volume 51, pp. 112–118. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14618678/> (accessed on 10 July 2022).
42. Hung, C.F.; Lung, F.W.; Hung, T.H.; Chong, M.Y.; Wu, C.K.; Wen, J.K.; Lin, P.Y. Monoamine oxidase A gene polymorphism and suicide: An association study and meta-analysis. *J. Affect. Disord.* **2012**, *136*, 643–649. [\[CrossRef\]](#)
43. Chang, H.-I.; Chang, Y.-T.; Tsai, S.-J.; Huang, C.-W.; Hsu, S.-W.; Liu, M.-E.; Chang, W.-N.; Lien, C.-Y.; Huang, S.-H.; Lee, C.-C.; et al. MAOA-VNTR Genotype Effects on Ventral Striatum-Hippocampus Network in Alzheimer's Disease: Analysis Using Structural Covariance Network and Correlation with Neurobehavior Performance. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 4518–4529. [\[CrossRef\]](#)
44. Floris, G.; Cadeddu, R.; Bortolato, M. The effects of serotonin degradation on psychopathology: Role of monoamine oxidase. *Handb. Behav. Neurosci.* **2020**, *31*, 267–278.
45. Jones, D.N.; Raghanti, M.A. The role of monoamine oxidase enzymes in the pathophysiology of neurological disorders. *J. Chem. Neuroanat.* **2021**, *114*, 101957. [\[CrossRef\]](#)
46. Guimarães, A.P.; Zeni, C.; Polanczyk, G.; Genro, J.P.; Roman, T.; Rohde, L.A.; Hutz, M.H. MAOA is associated with methylphenidate improvement of oppositional symptoms in boys with attention deficit hyperactivity disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2009**, *12*, 709. [\[CrossRef\]](#)
47. Vincentis, S.; Alcantara, J.; Rzezak, P.; Kerr, D.; dos Santos, B.; Alessi, R.; van der Linden, H.; Arruda, E.; Chaim-Avancini, T.; Serpa, M.; et al. Higher transcription alleles of the MAOA-uVNTR polymorphism are associated with higher seizure frequency in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* **2019**, *149*, 26–29. [\[CrossRef\]](#)
48. Galvão, A.C.S.; Krüger, R.C.; Campagnolo, P.D.B.; Mattevi, V.S.; Vitolo, M.R.; Almeida, S. Association of MAOA and COMT gene polymorphisms with palatable food intake in children. *J. Nutr. Biochem.* **2012**, *23*, 272–277. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Contini, V.; Marques, F.Z.C.; Garcia, C.E.D.; Hutz, M.H.; Bau, C.H.D. MAOA-uVNTR polymorphism in a Brazilian sample: Further support for the association with impulsive behaviors and alcohol dependence. *Am. J. Med. Genet. Part B: Neuropsychiatr. Genet.* **2006**, *141B*, 305–308. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Meyer-Lindenberg, A.; Buckholtz, J.W.; Kolachana, B.; Hariri, A.R.; Pezawas, L.; Blasi, G.; Wabnitz, A.; Honea, R.; Verchinski, B.; Callicott, J.H.; et al. Neural mechanisms of genetic risk for impulsivity and violence in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 6269–6274. [\[CrossRef\]](#)
51. Nymberg, C.; Jia, T.; Lubbe, S.; Ruggeri, B.; Desrivieres, S.; Barker, G.; Büchel, C.; Fauth-Bühler, M.; Cattrell, A.; Conrod, P.; et al. Neural Mechanisms of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms Are Stratified by MAOA Genotype. *Biol. Psychiatry* **2013**, *74*, 607–614. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Klasen, M.; Wolf, D.; Eisner, P.D.; Habel, U.; Repple, J.; Vernaleken, L.; Schlüter, T.; Eggermann, T.; Zerres, K.; Zepf, F.D.; et al. Neural networks underlying trait aggression depend on MAOA gene alleles. *Brain Struct. Funct.* **2018**, *223*, 873–881. [\[CrossRef\]](#)
53. Buckholtz, J.W.; Callicott, J.H.; Kolachana, B.; Hariri, A.R.; Goldberg, T.E.; Genderson, M.; Egan, M.F.; Mattay, V.S.; Weinberger, D.R.; Meyer-Lindenberg, A. Genetic variation in MAOA modulates ventromedial prefrontal circuitry mediating individual differences in human personality. *Mol. Psychiatry* **2008**, *13*, 313–324. [\[CrossRef\]](#)
54. Cerasa, A.; Gioia, M.C.; Labate, A.; Larza, P.; Magariello, A.; Muglia, M. Quattrone MAOA VNTR polymorphism and variation in human morphology: A VBM study. *Neuro Rep.* **2008**, *19*, 1107–1110.
55. Yoshida, K.; Naito, S.; Takahashi, H.; Sato, K.; Ito, K.; Kamata, M.; Higuchi, H.; Shimizu, T.; Itoh, K.; Inoue, K.; et al. Monoamine oxidase: A gene polymorphism, tryptophan hydroxylase gene polymorphism and antidepressant response to fluvoxamine in Japanese patients with major depressive disorder. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2002**, *26*, 1279–1283. [\[CrossRef\]](#)

56. Tzeng, D.S.; Chien, C.C.; Lung, F.W.; Yang, C.Y. MAOA gene polymorphisms and response to mirtazapine in major depression. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* **2009**, *24*, 293–300. [CrossRef]
57. Uffelmann, E.; Huang, Q.Q.; Munung, N.S.; de Vries, J.; Okada, Y.; Martin, A.R.; Martin, H.C.; Lappalainen, T.; Posthuma, D. Genome-wide association studies. *Nat. Rev. Methods Primers* **2021**, *1*, 59. [CrossRef]
58. National Human Genome Research Institute. Talking Glossary of Genomic and Genetic Terms. 2022. Available online: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Genome-Wide-%20Association-Studies> (accessed on 19 May 2022).
59. Wang, M.; Ma, Y.; Yuan, W.; Su, K.; Li, M.D. Meta-Analysis of the COMT Val158Met Polymorphism in Major Depressive Disorder: Effect of Ethnicity. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2016**, *11*, 434–445. [CrossRef] [PubMed]

Polimorfismo da região codante do gene NOS3 em idosos com Síndrome Metabólica

Polymorphism of the codante region of the NOS3 gene in the elderly with Metabolic Syndrome

Polimorfismo de la región codante del gen NOS3 en ancianos con Síndrome Metabólico

Isabella Possatti¹, Camila Magalhães Garcia², Giovanna Rodrigues de Paula³, Marcela dos Santos Teixeira⁴, Bruna Rodrigues Gontijo⁵,
Ligia Canongia de Abreu Cardoso Duarte⁶, Silvana Schwert Fungheito⁷, Isabel Cristina Rodrigues da Silva⁸

Como citar: Gontijo BR, Silva IML, Possatti I, Fratelli CF, Duarte LCAC, Moraes RM, et al. Polimorfismo da região codante do gene NOS3 em idosos com Síndrome Metabólica. REVISA. 2022; 11(4): 640-6. Doi: <https://doi.org/10.36239/revisa.v11.n4.p640a646>

REVISA

1. Universidade de Brasília. Faculdade de Ceilândia. Ceilândia, Distrito Federal, Brasil.
<https://revisa.org/0000-0002-9202-2222>
2. Universidade de Brasília. Faculdade de Ceilândia. Ceilândia, Distrito Federal, Brasil.
<https://revisa.org/0000-0002-9202-2222>
3. Universidade de Brasília. Faculdade de Ceilândia. Ceilândia, Distrito Federal, Brasil.
<https://revisa.org/0000-0002-9202-2222>
4. Universidade de Brasília. Faculdade de Ceilândia. Ceilândia, Distrito Federal, Brasil.
<https://revisa.org/0000-0002-9202-2222>
5. Universidade de Brasília. Faculdade de Ceilândia. Ceilândia, Distrito Federal, Brasil.
<https://revisa.org/0000-0002-9202-2222>
6. Universidade de Brasília. Faculdade de Ceilândia. Ceilândia, Distrito Federal, Brasil.
<https://revisa.org/0000-0002-9202-2222>
7. Universidade de Brasília. Faculdade de Ceilândia. Ceilândia, Distrito Federal, Brasil.
<https://revisa.org/0000-0002-9202-2222>
8. Universidade de Brasília. Faculdade de Ceilândia. Ceilândia, Distrito Federal, Brasil.
<https://revisa.org/0000-0002-9202-2222>

Enviado: 18/07/2022
Aprovado: 17/08/2022

RESUMO

Objetivo: O presente estudo analisou se a presença do polimorfismo VNTR localizado no intron 4 do gene NOS3 na região codante difere nos pacientes com Síndrome Metabólica e portadores de Hipertensão Arterial e/ou Diabetes Mellitus dos controles normotensos. **Método:** Neste estudo caso-controle, foi executada a técnica de PCR para identificar a presença dos genótipos em 94 pacientes idosos residentes do Distrito Federal. As associações com as manifestações clínicas foram feitas no programa SPSS. Foi analisada a probabilidade de equilíbrio de Hardy-Weinberg e Odds Ratio, considerando um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5%. **Resultados:** Verificou-se que das 94 pacientes, 71 evidenciaram a presença de hipertensão e 23 a ausência da doença, o valor de p obtido foi de 0,218. Em relação a Diabetes Mellitus, 49 idosos possuem o problema e 45 não possuem, o valor de p obtido foi de 0,372. **Conclusão:** Não há associação entre os genótipos do polimorfismo do gene NOS3, e a manifestação de Hipertensão Arterial e Diabetes Mellitus em idosos portadoras da SM. **Descritores:** Síndrome Metabólica; Diabetes Mellitus; Hipertensão Arterial Sistêmica; NOS3; Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Objective: The present study analyzed whether the presence of VNTR polymorphism located in intron 4 of the NOS3 gene in the codante region differs in patients with Metabolic Syndrome and patients with Hypertension and/or Diabetes Mellitus from normotensive controls. **Method:** In this case-control study, the PCR technique was performed to identify the presence of genotypes in 94 elderly patients living in the Federal District. Associations with clinical manifestations were made in the SPSS program. The probability of Hardy-Weinberg equilibrium and Odds Ratio was analyzed, considering a confidence interval of 95% and significance level of 5%. **Results:** we found that of the 94 patients, 71 showed the presence of hypertension and 23 the absence of the disease, the p-value obtained was 0.218. Regarding Diabetes Mellitus, 49 old women have the problem and 45 do not have the p value obtained was 0.372. **Conclusion:** There is no association between nos3 gene polymorphism genotypes, and the manifestation of Arterial Hypertension and Diabetes Mellitus in elderly patients with MS. **Descriptors:** Metabolic Syndrome; Diabetes Mellitus; Systemic Arterial Hypertension; NOS3; Genetic polymorphism.

RESUMEN

Objetivo: El presente estudio analizó si la presencia de polimorfismo VNTR localizado en el intrón 4 del gen NOS3 en la región codante difiere en pacientes con Síndrome Metabólico y pacientes con Hipertensión y/o Diabetes Mellitus de controles normotensos. **Método:** En este estudio de casos y controles, se realizó la técnica de PCR para identificar la presencia de genotipos en 94 pacientes ancianos residentes en el Distrito Federal. Las asociaciones con manifestaciones clínicas se realizaron en el programa SPSS. Se analizó la probabilidad de equilibrio de Hardy-Weinberg y Odds Ratio, considerando un intervalo de confianza del 95% y un nivel de significancia del 5%. **Resultados:** Se encontró que de los 94 pacientes, 71 mostraron la presencia de hipertensión arterial y 23 la ausencia de la enfermedad, el valor de p obtenido fue de 0,218. En cuanto a la Diabetes Mellitus, 49 ancianas tienen el problema y 45 no tienen el valor de p obtenido fue de 0,372. **Conclusión:** No existe asociación entre los genotipos de polimorfismo del gen nos3 y la manifestación de Hipertensión Arterial y Diabetes Mellitus en pacientes ancianos con SM. **Descriptores:** Síndrome metabólico; Diabetes mellitus; Hipertensión Arterial Sistémica; NOS3; Polimorfismo genético.

ORIGINAL

Possatti I, Garcia CM, Paula GR, Teixeira MS, Gontijo BR, Duarte LCAC, et al.

Introdução

A Síndrome Metabólica (SM) tem como uma de suas características a presença de obesidade visceral, dislipidemia e hipertensão arterial. Desse modo, há associação da patologia no aumento do risco de doenças cardiovasculares e de desenvolvimento de Diabetes Mellitus 2. A prevalência da SM não é exata, pois há muita variação de acordo com a população estudada (sexo, idade, raça e etnia). A etiopatogenia da SM é controversa. Porém, evidências sugerem que as principais causas que levam a manifestação desses fatores são a resistência à insulina e a obesidade visceral, motivo pelo qual o tratamento da obesidade é considerado primordial para os indivíduos que portam essa doença.¹

Uma revisão sistemática feita por Fogal, Ribeiro, Priori e Franceschini (2014), revelou que na maioria dos estudos que mostravam dados separados por sexo, as mulheres apresentavam maior prevalência da síndrome metabólica em relação aos homens. Isso acontece por conta das possíveis alterações metabólicas e hormonais sofridas, principalmente no período da menopausa. Quando se baseava na idade, a prevalência aumentava em conjunto com o tempo de vida.²

O uso de indicadores clínicos e antropométricos pode ajudar na identificação da SM. Exemplos de indicadores clínicos são: O produto da acumulação lipídica (PAL) e o índice de adiposidade visceral (IAV). E um exemplo bem conhecido de indicador antropométrico é o índice de massa corporal (IMC). O uso de indicadores para detectar a SM pode facilitar o processo na prática clínica, por ser simples, rápido e funcional.³

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é o principal fator de risco para a mortalidade, portanto o controle adequado se faz extremamente necessário, embora a tecnologia e a ciência estejam em constante evolução⁴. Esse controle apropriado da HAS é definido pelos níveis de pressão sistólica e diastólica ≤ 120 mmHg e ≤ 80 mmHg.⁵

Por ser considerada, ao mesmo tempo, uma doença e um fator de risco, por estar diretamente relacionada à doença arterial coronariana e acidente vascular encefálico, essa doença representa um grande desafio para a saúde pública, pois as doenças cardiovasculares são a primeira causa de morte no Brasil. A detecção e o tratamento da HAS são essenciais para a redução das causas cardiovasculares.⁶ Sua prevalência no Brasil varia entre 22% e 44% para adultos, aumentando para 50% para as pessoas entre 60 a 69 anos e 75% para quem possui mais de 70 anos.⁷

O Diabetes Mellitus (DM) afeta mais de 382 milhões de pessoas no mundo, sendo 11,9 milhões de nacionalidade brasileira. Em pessoas com mais de 65 anos de idade, esse número aumenta, configurando-se como uma das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) mais comuns em idosos. O DM acontece devido a distúrbios no metabolismo da glicose resultando em hiperglicemia. Podem provocar complicações que levam a disfunções e/ou insuficiências cardíacas e vasculares. Com o objetivo evitar os agravos dessa enfermidade, se faz necessário a revisão dos hábitos alimentares, a prática de atividades físicas, consultar periodicamente profissionais de saúde e utilizar medicamentos adequados.⁸

O gene da sintase do óxido nítrico endotelial (NOS3) está localizado no cromossomo 7q 35-36 e compreende 26 éxons, englobando 26kb e codificando um mRNA de 4052 nucleotídeos. Pesquisas apresentam uma associação positiva

Possatti I, Garcia CM, Paula GR, Teixeira MS, Gontijo BR, Duarte LCAC, et al.

da manifestação da NOS3 em pacientes com insuficiência cardíaca e evidenciam que um nível aumentado da produção de óxido nítrico pode ser um componente significativo na doença.⁹

A NOS3 é uma enzima que se expressa principalmente no endotélio celular, e é responsável pela biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) a níveis endoteliais. O NO é uma substância que possui uma importante contribuição na regulação vascular.¹⁰ É responsável pelo relaxamento dos músculos, supressão da adesão plaquetária e leucocitária no endotélio, na eliminação de radicais superóxido além de limitar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, levando a um efeito vasoprotetor.¹¹

O VNTR localizado no íntron 4 do NOS3 está intimamente associado com a concentração de óxido nítrico no plasma. Tal polimorfismo possui uma sequência de 27 pares de base, onde há um alelo maior e outro menor. O alelo maior "a" possui 5 repetições *in tandem* de 27 pares de base, enquanto o alelo menor "b" possui 4 repetições.

O presente trabalho tem como objetivo investigar o perfil genético e se o polimorfismo do gene NOS3 na região codante difere nos pacientes com síndrome metabólica e/ou portadores de hipertensão arterial e diabetes dos controles normotensos.

Método

As amostras utilizadas provieram de 94 idosos com idade igual ou superior a 60 anos que residem no Distrito Federal (Brasil) e que fazem parte de uma equipe de Estratégia em Saúde da Família (ESF) das Unidades Básicas de Saúde (UBS) número 06 e 08 de Ceilândia.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi entregue para todas as participantes da pesquisa. A coleta de dados ocorreu após a aprovação do comitê de ética FEPECS/SESDF sob o parecer nº 1.355/211.

O DNA foi extraído de sangue periférico com uso do kit *Invisorb Spin Blood Mini Kit (250)* da empresa Invitex. A concentração do DNA obtido foi estimada pelo espectrofotômetro NANODROP Technologies Inc., Wilmington, DE, USA. A concentração média alcançada foi de 20 ng/μL. Além disso, foi realizada a técnica de PCR (Reação em cadeia da Polimerase) no termociclador TC-512. Essa técnica permite que uma região selecionada do genoma (gene NOS3, localização 7q36), seja amplificada milhões de vezes.

As sequências de oligonucleotídeos utilizadas para avaliar o polimorfismo se seguem na tabela abaixo:

Tabela 1- Sequência de Oligonucleotídeos.

Gene	Oligonucleotídeos
NOS3 íntron 4	Forward 5' AGG CCC TAT GGT AGT GCC TT 3'
	Reverse 5' TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC 3'

Para a amplificação do gene NOS3 na região do íntron 4 foi realizada a desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos 60°C por 30 segundos e extensão 72°C por 1 minuto. Extensão final 72°C por 10 minutos, gerando fragmentos de DNA de 420 pb (alelo b) e/ou 323pb (alelo a).

Possatti I, Garcia CM, Paula GR, Teixeira MS, Gontijo BR, Duarte LCAC, et al.

Os produtos da PCR foram submetidos a uma corrida eletroforética em um gel de agarose a 3%, com brometo de etídio em uma potência de 100W por 20 minutos.

Em seguida, foi inserido o perfil genético dos indivíduos e suas manifestações clínicas no programa SPSS na versão 25.0, para analisar se existe uma associação entre o polimorfismo estudado e a síndrome metabólica em idosos. Foi adotado um nível de significância de 5% e foi utilizado o teste de Fisher e Qui-Quadrado.

Resultados

A partir do programa SPSS, obteve-se o seguinte resultado: Das 71 idosas, que possuem hipertensão (Tabela 2), 9 (12,7%) possuem o genótipo A/A, 29 (40,8%) possuem o genótipo A/B e 33 (46,5 %) possuem o genótipo B/B. Quanto a ausência de hipertensão (23 idosas), nenhuma possui o genótipo A/A, 10 (43,5%) possuem o genótipo A/B e 13 (56,5%) possuem o genótipo B/B. O valor de p obtido foi de 0,192.

Tabela 2 - Distribuição da frequência genotípica do polimorfismo NOS3 íntron 4 e manifestação de Hipertensão Arterial.

		Hipertensão Arterial				p
		Sim		Não		
		n	%	n	%	
NOS3 27- pb- VNTR	A/A	9	12,7%	0	0,0%	0,192
	A/B	29	40,8%	10	43,5%	
	B/B	33	46,5%	13	56,5%	
	Total	71	100%	23	100%	

Quando se analisa a diabetes mellitus (Tabela 3), Das 49 idosas que possuem a doença, 5 (10,2%) possuem o genótipo A/A, 17 (34,7%) possuem o genótipo A/B e 27 (55,1%) possuem o genótipo B/B. Quanto a ausência de diabetes (45 idosas), 4 (8,9%) possuem o genótipo A/A, 22 (48,9%) possuem o genótipo A/B e 19 (42,2%) possuem o genótipo B/B. Obteve-se um valor de p de 0,372.

Tabela 3 - Distribuição da frequência genotípica do polimorfismo NOS3 íntron 4 e manifestação de Diabetes Mellitus.

		Diabetes Mellitus				p
		Sim		Não		
		n	%	n	%	
NOS3 27-pb-VNTR	A/A	5	10,2%	4	8,9%	0,372
	A/B	17	34,7%	22	48,9%	
	B/B	27	55,1%	19	42,2%	
	Total	49	100%	45	100%	

Além desses resultados, também foi realizado a dicotomização (Tabela 4) da tabela de diabetes a fim de se saber qual seria o resultado do Odds Ratio, para fins de proteção ou risco. Portanto, o resultado desta dicotomização foi: Quanto a presença de diabetes mellitus, 5 (10,2%) possuem o genótipo A/A, e 44 (89,8%) possuem os genótipos A/B ou B/B. Em relação à ausência da enfermidade, 4 (8,9%) Possuem o genótipo A/A e 41 (91,1%) possuem os genótipos A/B ou B/B. O resultado do Odds Ratio obtido foi de 0,8 e o Intervalo de Confiança foi de 0,215 a 3,419.

Possatti I, Garcia CM, Paula GR, Teixeira MS, Gontijo BR, Duarte LCAC, et al.

Tabela 4 - Dicotomização da frequência genotípica do polimorfismo NOS3 íntron 4 e manifestação de Diabetes Mellitus.

		Diabetes Mellitus				p	OR	IC
		Sim		Não				
		n	%	n	%			
NOS3 27-pb- VNTR	A/A	5	10,2%	4	8,9%	0,999	0,8	(0,215 - 3,419)
	A/B + B/B	44	89,8%	41	91,1%			
	Total	49	100,0%	45	100,0%			

Discussão

Em um estudo de meta análise de Chen, Wang, Liang, Yu e Yang (2016) sobre hipertensão pulmonar (HP), seis estudos foram pesquisados, incluindo 198 pessoas que possuem a doença e 250 controles. Uma grande sensibilidade ao risco de desenvolver HP foi encontrada em indivíduos que possuíam o genótipo 4a/a comparados aos portadores dos outros genótipos. Os homozigotos possuem um risco 2,5 vezes maior relacionado aos seus homólogos.¹³

Outra meta análise realizada, de Zeng, Zhu, Wong, Yang, Tang, Li, et al. (2016) sobre a pré-eclâmpsia, para o polimorfismo VNTR, O Odds Ratio obtido em três associações (bb vs aa, ab vs aa e bb vs ab), sugere que não há associação entre o risco de desenvolver a pré-eclâmpsia e a presença do polimorfismo VNTR 4b/a.¹⁴

Na pesquisa de Shankarishan, Borah, Ahmed e Mahanta (2014) que diz sobre os polimorfismos da oxido nítrico sintase endotelial e o risco de hipertensão em uma população indiana, utilizando a regressão logística univariada, o genótipo 4a/a foi associado ao aumento do risco de hipertensão. No modelo multivariado de regressão logística (quando se tem o ajuste para idade, sexo, ingestão extra de sal, tabagismo, mascar tabaco e hábito de consumo de álcool), o risco persistiu e o genótipo 4a/b também mostrou associação.¹⁵ Ao contrário do presente estudo, que não houve associação entre o polimorfismo e a manifestação de hipertensão em idosos com síndrome metabólica.

Em relação a diabetes, o estudo de Bregar, Cilenšek, Mankoc, Reschner e Petrovi (2017) com eslovenos que possuem diabetes mellitus tipo 2 e retinopatia diabética, o genótipo homozigoto 4a/a mostrou uma associação com a ocorrência de retinopatia diabética (DR) em indivíduos que possuem diabetes mellitus tipo 2. As pessoas que possuíam genótipo 4a/a (modelo co-dominante) e 4a/b (modelo co-dominante), obtiveram um risco maior de DR quando comparados aos portadores do genótipo 4b/b (tipo selvagem)¹⁶. O presente estudo não mostrou associação entre o polimorfismo e a manifestação de diabetes mellitus em idosos com síndrome metabólica.

Conclusão

Conclui-se, portanto, que não há diferença estatística entre os grupos diabetes e hipertensão arterial sistêmica nas pacientes diagnosticadas com síndrome metabólica. Durante a realização deste trabalho, encontrar artigos na literatura sobre o assunto discutido, se mostrou uma tarefa difícil.

Possatti I, Garcia CM, Paula GR, Teixeira MS, Gontijo BR, Duarte LCAC, et al.

Logo, a necessidade da pesquisa e dos estudos se torna muito importante, pois as enfermidades analisadas são muito frequentes na população, sobretudo em idosos. É fundamental a elaboração de mais projetos de pesquisa referentes a essas doenças, visto que, a sociedade tende a ficar mais envelhecida com o passar dos anos.

Agradecimento

Este trabalho foi elaborado e realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

1. Nora C, Morais T, Nora M, Coutinho J, do Carmo I, Monteiro MP. Gastrectomia vertical e bypass gástrico no tratamento da síndrome metabólica. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*. 2016 Janeiro; 11(1): 23-9.
2. Fogal AS, Ribeiro AQ, Priori SE, Franceschini SCC. Prevalência de síndrome metabólica em idosos: uma revisão sistemática. *Rasbran - Revista da Associação Brasileira de Nutrição*. 2014; 1(6):29-35.
3. de Oliveira CC, da Costa ED, Roriz AKC, Ramos LB, Gomes Neto M. Preditores de Síndrome Metabólica em Idosos: Uma Revisão. *International Journal of Cardiovascular Sciences*. 2017; 343-53.
4. Firmo JOA, de Melo Mambrini JV, Peixoto SV, de Loyola Filho AI, de Souza Junior PRB, de Andrade FB, et al. Controle da hipertensão arterial entre adultos mais velhos. *Revista de Saúde Pública*. 2018 Abril; 1 - 11.
5. Malachias MVB. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial: Capítulo 2 - Diagnóstico e Classificação. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 107(3): 7-13.
6. Freitas JGA, de Oliveira Nielson SE, Porto CC. Adesão ao tratamento farmacológico em idosos hipertensos: uma revisão integrativa da literatura. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*. 2015 Janeiro; p. 75 - 84.
7. Oliveira MSN, Almeida GBS, de Nazaré Pereira Chagas D, Salazar PR, Ferreira LV. Autocuidado de idosos diagnosticados com hipertensão arterial e/ou diabetes mellitus. *Revista de Enfermagem da Universidade Federal de Santa Maria*. 2017 Julho; p. 490 - 503.
8. Costa SS, Rosales RA, de Ávila JA, Pelzer MT, Lange C. Adesão de idosos com diabetes mellitus à terapêutica: revisão integrativa. *Cogitare Enfermagem*. 2017 Junho; 22(3): 1 - 10.
9. Matsa LS, Rangaraju A, Vengaldas V, Latifi M, Jahromi HM, Ananthapur V, et al. Haplotypes of NOS3 Gene Polymorphisms in Dilated Cardiomyopathy. *Plos One*. 2013 Julho; 8(7) p. 1 - 5.

Possatti I, Garcia CM, Paula GR, Teixeira MS, Gontijo BR, Duarte LCAC, et al.

10. Vecoli C. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms in Cardiovascular Disease. *Vitamins & Hormones*. 2014; p. 387 – 406.
11. Rai H, Parveen F, Kumar S, Kapoor A, Sinha N. Association of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms with Coronary Artery Disease: An Updated Meta-Analysis and Systematic Review. *Plos One*. 2014 Novembro; 9(11):1 – 19.
12. Özçelik AT, Demirdöğen BC, Şeref Demirkaya, Adalı O. Importance of NOS3 Genetic Polymorphisms in the Risk of Development of Ischemic Stroke in the Turkish Population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2014 Dezembro; p. 797 – 803.
13. Chen Q, Wang H, Xiao D, Liang T, Yu J, Yang J. Association between eNOS 4b/a polymorphism and susceptibility of pulmonary hypertension: a meta-analysis of 6 studies. *International Journal Of Clinical And Experimental Medicine*. 2016 Agosto; p. 1 – 8.
14. Zeng F, Zhu S, Wong MC, Yang Z, Tang J, Li K, et al. Associations between nitric oxide synthase 3 gene polymorphisms and preeclampsia risk: a meta-analysis. *Scientific Reports*. 2016 Março; 6(1):1 – 10.
15. Shankarishan P, Borah PK, Ahmed G, Mahanta J. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and the Risk of Hypertension in an Indian Population. *BioMed Research International*. 2014 Agosto; p. 1 – 12.
16. Bregar D, Cilensek I, Mankoc S, Reschner A, Petrović D, Petrović MG. The joint effect of the endothelin receptor B gene (EDNRB) polymorphism rs10507875 and nitric oxide synthase 3 gene (NOS3) polymorphism rs869109213 in Slovenian patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic retinopathy. *Bosnian Journal Of Basic Medical Sciences*. 2017 Agosto; 80 – 86.

Autor de correspondência

Izabel Cristina Rodrigues da Silva,
Campus Universitário, s/n, Centro Metropolitano.
CEP: 72220-275, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
ibelbiomedica@gmail.com