



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTAÇÃO: PATOLOGIA ORAL E ESTOMATOLOGIA

NATÁLIA RODRIGUES SILVA

ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE IL-17 E IL-23 EM DOENÇAS TIREOIDIANAS

NATAL/RN

2020

NATÁLIA RODRIGUES SILVA

ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE IL-17 E IL-23 EM DOENÇAS
TIREOIDIANAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Odontológicas, na área de concentração em Patologia Oral e Estomatologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Márcia Cristina da Costa Miguel

NATAL/RN

2020

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Alberto Moreira Campos - Departamento de Odontologia

Silva, Natália Rodrigues.

Análise da imunexpressão de IL-17 e IL-23 em doenças tireoidianas / Natália Rodrigues Silva. - 2020.

72f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Odontológicas, Natal, 2020.

Orientador: Profa. Dra. Márcia Cristina da Costa Miguel.

1. Doenças Tireoidianas - Dissertação. 2. IL-17 - Dissertação. 3. IL-23 - Dissertação. 4. Imunoistoquímica - Dissertação. 5. Patogênese - Dissertação. I. Miguel, Márcia Cristina da Costa. II. Título.

RN/UF/BSO

BLACK D6

A defesa deste trabalho foi realizada no dia 28 de fevereiro de 2020, em Natal/RN, obteve o conceito “aprovado”.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Manuel Antônio Gordón Nunez

Universidade Estadual da Paraíba

1º Examinador

Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

2º Examinador

Profa. Dra. Márcia Cristina da Costa Miguel

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Presidente - Orientadora

*Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, pois sem **Ele**, sem sua permissão não teria chegado até aqui, e a **Mãe - Graça Rodrigues**, por todo apoio, atenção, proteção, preocupação, por ter aberto mão de tantas coisas em prol de sonhos meus. Muito obrigada por ser minha fortaleza, minha fonte de inspiração.*

AGRADECIMENTOS

*Pode parecer clichê, mas não poderia começar os agradecimentos sem começar por Ele, o nosso pai – **Deus**. Finalizo mais uma etapa do meu crescimento pessoal/profissional com o coração cheio de gratidão. Sou grata pelo **SIM de Deus** e pelo **NÃO** também, mesmo sem entender em muitas situações nessa jornada. Hoje eu entendo que **TODAS** as coisas são **para Ele e por Ele**.*

*Sou grata a Deus pelas pessoas que colocou em minha vida e que fizeram total diferença, muitas delas sem nem ao menos saber o quanto elas foram importantes. Sou grata pela minha família que sempre me apoiaram nos meus estudos. Sou grata pelos meus pais – **Rilmar e Graça**, principalmente minha **MÃE**. Mulher forte e guerreira, minha fonte de inspiração, que não mede esforços para fazer tudo em prol de suas filhas. A ela devo tudo que sou hoje, a ela dedico esse diploma de mestre, a ela dedico tantas outras coisas que já foram conquistadas e que ainda estão para serem conquistadas. Sou grata pela mãe maravilhosa que Deus me deu!! Que essa seja apenas mais uma conquista, de muitas que vamos estar comemorando juntas.*

*Pela vida das minhas irmãs – **Gracielle e Gilmara**, que sempre estiveram me acompanhando nessa jornada e me apoiando, mesmo à distância. Sou grata pelo meu pequeno príncipe – **sobrinho Gustavo**, por ser esse serzinho que traz tanta alegria para casa e me mata de saudade. Meu avô maravilhoso - **Raimundo Rodrigues**, com o jeitinho que só ele saber ser, bruto e ao mesmo tempo amoroso, que sempre esteve preocupado comigo, buscando fazer de tudo que fosse possível para me ajudar. **Meu avô Sales, tios (as) e primos (as)**, especialmente **Samuel (primo)**, que esteve sempre de prontidão para me ajudar, pegar meu PC no departamento então nem se fala, além de sair de sua casa, largar as coisas que tinha para fazer e ir ajudar nas coisas do meu apartamento nos momentos em que estava mais aperreada.*

*Sou grata pelo meu local de estudo desde 2012 - **Departamento de odontologia**. Como eu amo esse lugar!! Gratidão pelas pessoas que fazem parte desse lugar, começando com **Katia** na recepção dando seu bom dia, para todo mundo que entra no departamento, até chegar na Patologia Oral, com **Gracinha** esbanjando simpatia e humor inabalável, sempre atendendo todo mundo que chega lá da melhor forma, buscando ajudar a todos sempre. **Lourdinha, Bethe, Sandrinha, Idel, Talita, Claudia, Ricardo, Joana e Hevil**, obrigada por estarem sempre de prontidão para ajudarem a todos alunos na patologia.*

Gratidão pela equipe de professores da Patologia Oral e do Programa da Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, que tanto contribuíram para meu crescimento, pela dedicação que

tem pelo programa, em especial, minha orientadora – **Professora Márcia Miguel**. Sou grata por todos seus ensinamentos, por todas as vezes que chamou atenção para algo, que me cobrou, por todos ensaios de apresentações, pela orientação sem igual... tudo isso e mais algumas coisas, fizeram total diferença para meu crescimento. Excelência é o seu sobrenome!! Sou grata também pelo professor maravilhoso que tive o prazer em conhecer e trabalhar junto, **Joabe Pereira**. Obrigada por todos ensinamentos, pela sua disponibilidade em estar me ajudando, pela paciência em me ensinar a utilizar o scanner e pelos meus aperreios que não foram poucos.

Sou grata pela bênção de ter ficado em uma turma do mestrado maravilhosa. Agradeço a todos por fazerem desse mestrado mais leve, pela união e companheirismo da turma, como também pelos resumos de **Carla, Katiane, Gustavo, Maurilia e Carol campos** que me salvaram tantas vezes. **Helder** por terem me socorrido em vários sufocos. **Fernanda** que sempre estava à disposição para tirar minhas dúvidas. **Joaquim**, minha dupla de clínica, obrigada pelo companheirismo. Desejo a todos muito sucesso.

Meus irmãos da patologia **Dennis, Lucas, Ondina, Luiz e Emily**, muito obrigada por todo companheiros. Agradeço, especialmente a **Luiz Artur e Ondina**, por toda atenção, ajuda, pelos ensinamentos e livramentos dos sufocos. Perto ou longe, ainda irei perturbar muito.

Aos doutorandos **Ana Cláudia, Caio, Cristianne, Dáurea, Everton, Glória, Hellen, Janaina, Juliana, Larissa, Leorik, Mara, Neumara, Hugo, Maria Luiza e Rodrigo Mafra**; mestrandos **Hanna, Joyce, Nara, Wesley, André e Leonardo**; e os ex-mestrandos **Rodrigo Rodrigues e Afonso**, obrigada pelo agradável convívio e pelas diversas dúvidas tiradas. Em especial, agradeço a **Caio, Rodrigo Mafra e Rani**, por terem doado um pouco do tempo de vocês para me ajudarem e tirarem minhas dúvidas na dissertação, e em tantos outros momentos.

Myllena, Mellyna, Bruna, Angélica, Andresa, Bianca, Thaís, Brenda, Rani, entre outros amigos e amigas, como eu sou grata de ter vocês em minha vida, por compartilharem comigo momentos de alegrias, tristezas, conquistas e perdas. Obrigada por cada palavra de encorajamento que foram essenciais para essa jornada. **Solange** por todo cuidado com a minha pessoa, tantas vezes que precisei, meu muito obrigado.

Gratidão por mesmo em meio a tantas dificuldades para conciliar estudos e trabalho, Deus me presenteou com chefes tops, que estavam e estão na torcida por mim, que me entenderam nos momentos que precisei me ausentar, muito obrigada por toda compreensão - **Eliza, Bianca, Carla e especialmente Cledna Borges** - Minha companheira de profissão, amiga e além de tudo chefe, sou muito grata por todo apoio, por todas as noites que ficou no consultório comigo até tarde, pelos dias descontraídos de trabalho, mesmo em meio ao cansaço, ao desânimo. Muito obrigada

por cada palavra de encorajamento, cada palavra que me fez sorrir. Gratidão pelas melhores auxiliares da vida **Nubia, Gelza, Joelma e Larissa**, muito obrigada por cuidarem tão bem dos atendimentos, das agendas e cuidarem ainda mais da minha pessoa. Grata por todos os **pacientes** que confiaram em mim o cuidado da sua saúde bucal.

Minha igreja - **Comunidade Cristã Videira**, que tanto amo, gratidão por sua existência. Gratidão pelos líderes que cuidam dessa casa, especialmente **Pr. Thiago e Pra. Anna – líderes de campo; Pr. Fabinho e Pra. Priscila** – meus líderes de departamento, como eu amo esses corações e como sou grata por me inspirarem tanto. **Lissa e Mafra – líderes de tribo**, foi um privilégio ter começado essa caminhada cristã sob a liderança deles. **Artur e Geane** – meus atuais líderes maravilhosos de tribo, como eu amo estar nessa jornada com eles, aprendendo cada vez mais sobre Deus, sobre liderança, sobre pessoas, sobre priorizaras coisas que estão de acordo com os planos de Deus. Muito obrigada por insistirem em mim, por terem visto um potencial que nem eu mesma enxergava, por me confiarem uma liderança de um grupo de crescimento – **GC SWAN**, por me darem palavras de conforto e encorajamento quando precisei.

Meu GC Swan (atual) e anteriormente o **Diamonds**, muito obrigada por tornarem minhas semanas mais leves, por todas palavras de apoio e orações para o meu crescimento. **Monique, Aline e Maiara**, minhas auxiliares maravilhosas do GC, muito obrigada por poder contar com vocês sempre, em tudo que for preciso. Agradeço também ao **GC ReboNation**, por todo aprendizado, pelo companheirismo, pela unidade.

Enfim, gratidão por todas pessoas que participaram de alguma forma dessa etapa da minha vida, muitas delas não foram colocadas aqui, mas sei o quanto foram importantes. Gratidão por todas circunstancias favoráveis ou não, mas que me fizeram refletir sobre e aprender com aquilo, me fizeram amadurecer. Gratidão pelo agir de Deus em minha vida, pelas minhas orações respondidas e pelas não respondidas. Gratidão por tudo!!

Deem graças em todas as circunstâncias, pois esta é a vontade de Deus para vocês em Cristo

Jesus.

1 Tessalonicenses 5:18

RESUMO

A tireoide é uma glândula endócrina que pode ser afetada por diversas lesões, que incluem doenças reativas, autoimunes e neoplásicas. Evidências mostram que a resposta imunológica, a partir da liberação de citocinas inflamatórias por células imunes e não imunes, desempenha um importante papel no desenvolvimento de diversas doenças. Dentre essas citocinas, destacam-se a IL-17 e a IL-23, as quais têm sido associadas à resposta Th17 e patogênese de diversas doenças tireoidianas. Dessa forma, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a imunoexpressão das proteínas IL-17 e IL-23 em carcinomas papilíferos de tireoide (CPTs), adenomas foliculares (AFs), bóciolos coloides (BCs) e tireoidites de Hashimoto (THs) (isoladas e associadas a CPTs ou BCs), com o intuito de compreender melhor a atuação destas citocinas nestas entidades. A amostra foi composta por 30 casos de CPTs, 10 AFs, 15 BCs e 15 THs. A análise da imunoexpressão das proteínas nas células foliculares/tumorais foi realizada semiquantitativamente em toda extensão das lesões, as quais foram classificadas em três escores: 1 ($\leq 33\%$), 2 ($> 33\% - 66\%$) e 3 ($> 66\%$). Para a avaliação dos linfócitos imunopositivos, foram selecionados cinco campos com maior quantidade de linfócitos positivos, onde foi realizada a contagem. Os dados foram submetidos à análise estatística por meio dos testes de Kruskal-Wallis (*KW*), Mann-Whitney (*U*) e Spearman (*r*), com o nível de significância estabelecido em 5% ($p < 0,05$). Na análise da IL-17 entre as lesões, foi verificada maior imunoexpressão pelos linfócitos nas THs comparado aos AFs e BCs ($p=0,041$ e $p=0,013$). Na avaliação da IL-23 foi constatada uma maior imunomarcagem das células foliculares/tumorais nas THs em relação aos CPTs ($p=0,002$), assim como, observou-se uma maior expressão desta citocina nos linfócitos das THs em comparação aos CPTs, AFs e BCs ($p=0,001$; $p=0,023$ e $p=0,003$). Além disso, foram observadas nas THs correlações estatisticamente significativas entre a imunoexpressão da IL-17 e IL-23 tanto nas células foliculares/tumorais, como nos linfócitos ($r=0,539$; $p=0,038$ e $r=0,522$; $p=0,046$). Sugere-se que a IL-17 e IL-23 influenciam a patogênese destas lesões tireoidianas e que em algumas delas, represente atuação da resposta Th17.

Palavras-Chave: Doenças tireoidianas. IL-17, IL-23. Imunoistoquímica. Patogênese.

ABSTRACT

The thyroid is an endocrine gland that can be affected by several lesions, including reactive, autoimmune and neoplastic diseases. Evidence shows that the immune response, from the release of inflammatory cytokines by immune and non-immune cells, plays an important role in the development of several diseases. Among these cytokines, IL-17 and IL-23 stand out, which have been associated with the Th17 response and pathogenesis of several thyroid diseases. Hence, this research aimed to evaluate the immunoexpression of IL-17 and IL-23 proteins in papillary thyroid carcinomas (PTCs), follicular adenomas (FAs), colloid goiters (CGs) and Hashimoto's thyroiditis (HTs) (isolated and associated with PTCs or GCs), in order to better understand the role of these cytokines in these entities. The sample consisted of 30 cases of PTCs, 10 FAs, 15 CGs and 15 HTs. The analysis of protein immunoexpression in follicular/tumor cells was semiquantitatively performed in all lesions, which were classified into three scores: 1 ($\leq 33\%$), 2 ($> 33\% - 66\%$) and 3 ($> 66\%$). For the evaluation of immunopositive lymphocytes, five fields with the greater number of positive lymphocytes were selected, where the count was performed. The data were submitted to statistical analysis using the Kruskal-Wallis (KW), Mann-Whitney (U) and Spearman (r) tests, with the significance level set at 5% ($p < 0,05$). In the analysis of IL-17 between lesions, a higher immunoexpression was verified in the HT lymphocytes compared to FAs and CGs ($p=0.041$ and $p=0.013$). In the evaluation of IL-23, a higher immunostaining of follicular/tumor cells in HTs was detected in relation to PTCs ($p=0.002$), as well as, a greater expression of this cytokine was observed in the lymphocytes of HTs compared to PTCs, FAs and CGs ($p=0.001$; $p=0.023$ and $p=0.003$). In addition, statistically significant correlations between the immunoexpression of IL-17 and IL-23 were observed in both follicular/tumor cells and lymphocytes ($r=0.539$; $p=0.038$ and $r=0.522$; $p=0.046$). It is therefore suggested that IL-17 and IL-23 influence the pathogenesis of these thyroid lesions and that in some of them, they represent the Th17 response.

Key words: Thyroid diseases. IL-17, IL-23. Immunohistochemistry. Pathogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imunoexpressão da IL-17 das células foliculares e tumorais nas lesões estudadas.....	38
Figura 2 - Imunoexpressão da IL-23 das células foliculares e tumorais nas lesões estudadas.....	39
Figura 3 - Imunoexpressão da IL-17 e IL-23 nos linfócitos das lesões estudadas.....	40
Quadro 1 - Especificação dos anticorpos.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Aspectos clínicos dos carcinomas papilíferos de tireoide, adenomas foliculares, bóciolos coloides e tireoidites de Hashimoto (isolada e associadas a CPTs ou BCs). Natal-RN, 2020.....	37
Tabela 2 -	Distribuição dos escores de imunexpressão para IL-17 nas células foliculares e tumorais. Natal - RN, 2020.....	41
Tabela 3 -	Análise da imunexpressão nas células foliculares e tumorais da IL-17 e suas diferenças em relação às lesões estudadas. Natal-RN, 2020	41
Tabela 4 -	Análise da imunexpressão nas células foliculares e tumorais da IL-17 nas lesões estudadas. Natal-RN, 2020.....	42
Tabela 5 -	Análise da imunexpressão da IL-17 em linfócitos e suas diferenças em relação às lesões estudadas. Natal-RN, 2020.....	42
Tabela 6 -	Análise da imunexpressão da IL-17 em linfócitos, nas lesões estudadas. Natal-RN, 2020.....	43
Tabela 7 -	Distribuição dos escores de imunexpressão para IL-23 nas células foliculares e tumorais. Natal - RN, 2020.....	43
Tabela 8 -	Análise da imunexpressão nas células foliculares e tumorais da IL-23 e suas diferenças em relação às lesões estudadas. Natal-RN, 2020	44
Tabela 9 -	Análise da imunexpressão nas células foliculares e tumorais da IL-23 nas lesões estudadas. Natal-RN, 2020.....	44
Tabela 10 -	Análise da imunexpressão da IL-23 em linfócitos e suas diferenças em relação às lesões estudadas. Natal-RN, 2020.....	45
Tabela 11 -	Análise da imunexpressão da IL-23 em linfócitos, nas lesões estudadas. Natal-RN, 2020.....	45
Tabela 12 -	Análise da correlação entre a imunexpressão de IL-17 e IL-23, em células foliculares, tumorais e linfócitos, em todos os casos estudados ($n=69$). Natal-RN, 2020.....	46
Tabela 13 -	Análise da correlação entre a imunexpressão de IL-17 e IL-23, em células tumorais e linfócitos, nos casos de CPT ($n=29$). Natal-RN, 2020.....	46

Tabela 14 - Análise da correlação entre a imunexpressão de IL-17 e IL-23, em células tumorais e linfócitos, nos casos de AF ($n=10$). Natal-RN, 2020.....	47
Tabela 15 - Análise da correlação entre a imunexpressão de IL-17 e IL-23, em células foliculares e linfócitos, nos casos de BC ($n=15$). Natal-RN, 2020.....	47
Tabela 16 - Análise da correlação entre a imunexpressão de IL-17 e IL-23, em células foliculares/tumorais e linfócitos, nos casos de TH ($n=15$). Natal-RN, 2020.....	48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AT-** Adenoma tóxico
- AF-** Adenoma folicular
- BC-** Bócio coloide (BC)
- BD-** Bócio difuso (BD)
- BDT-** Bócio difuso tóxico
- BMN-** Bócios multinodulares (BMN)
- BNT-** Bócio nodular tóxico
- CBDT-** Carcinoma bem diferenciado da tireoide
- CEP-** Comitê de Ética em Pesquisa
- CFT-** Carcinoma folicular de tireoide
- CMT-** Carcinoma medular da tireoide
- CPT-** Carcinoma papilífero da tireoide
- CONEP-** Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
- DG-** Doença de Graves
- EROs-** (Do inglês *Oxygen-reactive species*) Espécies reativas de oxigênio
- FT-UMP-** (Do inglês *Follicular tumor of uncertain malignant potential*) Tumor folicular de potencial maligno incerto
- GT-** Glândula tireoide
- GM-CSF-** (Do inglês *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) Fator de crescimento de colônias de granulócitos-macrófagos
- HT-** Hormônios tireoidianos
- HPT-** Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide
- HUOL-** Hospital Universitário Onofre Lopes
- ILC3-** (Do inglês *Group 3 innate lymphoid cells*) Células linfoides inatas do grupo 3
- IL-17R-** (Do inglês *Interleukin-17 receptor*) Receptor Interleucina-17
- IL-23R-** (Do inglês *Interleukin-23 receptor*) Receptor Interleucina-23
- MAPK-** (Do inglês *Mitogen-activated protein kinase*) Via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno
- NCI-** (Do inglês *National Cancer Institute*) Instituto Nacional do Câncer
- OMS-** (Do inglês *World Health Organization*) Organização Mundial da Saúde

NIFTP- (Do inglês *Noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary nuclear features*) Neoplasias tireoidianas foliculares não invasivas com aspectos nucleares papilíferos

NK- (Do inglês *Natural Killer Cell*) Célula natural Killer

NF-κB- (Do inglês *Factor nuclear kappa B*) Fator nuclear kappa B

PAAF- Punção aspirativa por agulha fina

PGE1- (Do inglês *Natural prostaglandin E1*) Prostaglandina natural E1

PGE2- (Do inglês *Natural prostaglandin E2*) Prostaglandina natural E2

TPO- (Do inglês *Thyroid peroxidase*) Enzima peroxidase da tireoide

PQM- Proteína quimiotática de monócitos

STAT3- (Do inglês *Signal transducer and activator of transcription 3*) Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

SPSS- (Do inglês *Statistical Package for the Social Science*)

T3- 3,3', 5-triiodotironina

T4- 3', 5', 3,5-tetraiodo-L-tironina

TG- Tireoglobulina

TGF-β- (Do inglês *Transforming Growth Factor beta*) Fator de crescimento transformante beta

TH- Tireoidite de Hashimoto

TSHRAb- (Do inglês *Thyrotropin receptor autoantibodies*) Autoanticorpo do receptor tireotropina

TNF-α- (Do inglês *Alpha Tumor Necrosis Factor*) Fator de necrose tumoral alfa

TSI- (Do inglês *Thyroid stimulating immunoglobulin*) Imunoglobulina estimulante da tireoide

TR- (Do inglês *Thyroid hormone receptors*) Receptor do hormônio tireoidiano

TRH- (Do inglês *Thyrotropinreleasing hormone*) Hormônio liberador de tireotropina

TSH- (Do inglês *Thyroid stimulating hormone*) Hormônio estimulante da tireoide

TSHR- (Do inglês *Thyroid Stimulating Hormone Receptor*) Receptor TSH

UFRN- Universidade Federal do Rio Grande do Norte

VEGF- (Do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*) Fator estimulador de crescimento endotelial vascular

WDT-UMP- (Do inglês *Well-differentiated tumor of uncertain malignant potential*) Tumor bem diferenciado de potencial maligno incerto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Doenças tireoidianas.....	15
2.2	Interleucina-17 e Interleucina-23.....	25
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivos gerais.....	31
3.2	Objetivos específicos.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	Implicações éticas.....	32
4.2	Caracterização do estudo.....	32
4.3	População.....	32
4.4	Amostra.....	32
4.5	Crítérios de seleção da amostra.....	33
4.5.1	Crítérios de Inclusão.....	33
4.5.2	Crítério de Exclusão.....	33
4.6	Caracterização Clínica das lesões.....	33
4.7	Estudo imunoistoquímico.....	33
4.7.1	Técnica imunoistoquímica.....	33
4.8	Análise imunoistoquímica.....	36
4.9	Análise estatística	36
5	RESULTADOS.....	37
5.1	Caracterização da amostra.....	37
5.2	Análise imunoistoquímica.....	38
5.2.1	Imunoexpressão da IL-17.....	40
5.2.1.1	Imunoexpressão da IL-17 nas células foliculares e tumorais.....	40
5.2.1.2	Imunoexpressão da IL-17 em linfócitos.....	42
5.2.2	Imunoexpressão da IL-23.....	43
5.2.2.1	Imunoexpressão da IL-23 nas células foliculares e tumorais.....	43
5.2.2.2	Imunoexpressão da IL-23 em linfócitos.....	44
5.2.3	Correlações entre a imunoexpressão da IL-17 e IL-23.....	45
6	DISCUSSÃO.....	49
7	CONCLUSÕES.....	55

REFERÊNCIAS	56
APÊNDICE.....	63
ANEXO.....	64

1 INTRODUÇÃO

A glândula tireoide (GT) é uma glândula endócrina, localizada imediatamente abaixo da laringe e anterior à traqueia (KESICI; KESICI, 2018; LÖF *et al.*, 2018). Ela é responsável por secretar principalmente os hormônios tireoidianos (HT) - T4 e T3, que desempenham papéis importantes em diferentes vias de crescimento e desenvolvimento dos tecidos (LI *et al.*, 2019; STEPIEN; HUTTNER, 2019). A produção e liberação dos HTs é controlada principalmente pelo hormônio estimulante da tireoide (TSH) produzido pela hipófise (CITTERIO; TARGOVNIK; ARVAN, 2019).

Quando há alterações no desenvolvimento da GT e/ou na síntese dos HTs, as funções da glândula podem ser prejudicadas, podendo causar, por sua vez, várias doenças, (LEIDIG-BRUCKNER, 2019; LI *et al.*, 2019), tais como: hipertireoidismo, hipotireoidismo, os quais podem ser causados por vários fatores, como as doenças autoimunes - doença de Graves e tireoidite de Hashimoto respectivamente, além das neoplasias que podem se desenvolver na tireoide (LIVOLSI; BALOCH, 2018).

A tireoidite de Hashimoto, o bócio coloide, o adenoma folicular e o carcinoma papilífero de tireoide por serem as lesões mais comuns que afetam a GT, foram focos nesta pesquisa. A tireoidite de Hashimoto é uma lesão autoimune, caracterizada pela perda da tolerância imunológica contra autoantígenos da tireoide, mediada principalmente pelos linfócitos Th1 e Th17 (VITALES-NOYOLA *et al.*, 2017; (RYDZEWSKA *et al.*, 2018). O bócio, por sua vez, é um distúrbio endócrino que afeta cerca de 4% a 10% da população mundial (YANG; LU, 2018), caracterizado pelo aumento de volume anormal da glândula tireoide após uma estimulação excessiva pelo TSH (FAREBROTHER; ZIMMERMANN; ANDERSSON, 2019; MUKTAR *et al.*, 2019). O adenoma folicular (AF), que é uma neoplasia benigna derivada do epitélio folicular, caracterizados pela formação de nódulos (LI *et al.*, 2019). Por fim, o carcinoma papilífero da tireoide (CPT), que é uma lesão maligna, pertencente à família dos carcinomas bem diferenciados da tireoide (CBDT) (DUAN *et al.*, 2019), sendo o câncer mais comum, com média de 80% a 85% dos casos (HUANG *et al.*, 2019; VALVO; NUCERA, 2019).

Mediante os estímulos provocados por infecções ou danos as células do organismo por vários fatores, células da imunidade inata e adquirida, bem como citocinas, são estimuladas com a finalidade de combater o estímulo agressor e restabelecer o equilíbrio local (MOULD *et al.*, 2017). As citocinas são um grupo de proteínas secretadas pelas células imunes e por várias

outras células do organismo, sendo responsáveis por diversas funções, tais como a ativação das funções efectoras dos linfócitos e fagócitos (SPANGLER *et al.*, 2015; COOK *et al.*, 2018).

Nesse sentido, com o intuito de compreender melhor o processo da resposta imune em determinadas doenças, estudos têm avaliado e observado níveis aumentados de IL-17 e IL-23 em diversas patologias inflamatórias, autoimunes e neoplásicas (NEURATH, 2019). No que se refere a GT, níveis aumentados de IL-17 e IL-23 têm sido encontrados em algumas lesões, como tireoidite de Hashimoto e CPT. Devido a esse aumento da IL-17 e IL-23, os autores sugerem que essas citocinas apresentam um papel na patogênese de algumas doenças autoimunes e neoplásicas (MEI *et al.*, 2015; CAUGHRON; YANG; YOUNG, 2018; LIU *et al.*, 2019;). No entanto, no que se refere às lesões tireoidianas os dados existentes ainda são escassos e conflitantes, pois há poucos estudos que correlacionem a atuação dessas citocinas com estas doenças (JIANG *et al.*, 2015).

Dessa forma, o presente trabalho se propôs avaliar a imunoexpressão da IL-17 e IL-23 em carcinomas papilíferos de tireoide (CPTs), adenomas foliculares (AFs), bóciolos coloides (BCs) e tireoidites de Hashimoto (TH) (isoladas e associadas a CPTs ou BCs), com o objetivo de compreender melhor o papel destas citocinas na patogênese destas lesões.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças tireoidianas

A glândula tireoide (GT) é uma glândula endócrina, localizada imediatamente abaixo da laringe e anterior à traqueia. Anatomicamente, é caracterizada por ser bilobulada, cujos lobos que medem aproximadamente 5 cm de comprimento, conectados por faixa estreita de tecido tireoidiano, chamado de istmo. O istmo conecta a parte inferior dos dois lobos (KESICI; KESICI, 2018; LÖF *et al.*, 2018).

Histologicamente, a glândula é revestida por uma fina cápsula de tecido conjuntivo, a qual, também penetra na glândula, formando os septos, que dividem o parênquima em lóbulos de tamanhos irregulares. O parênquima glandular apresenta dois tipos de células – Células foliculares e parafoliculares. As células foliculares (tireócitos), que compõem o epitélio cúbico simples, formando os folículos esféricos. O interior de cada folículo contém uma massa gelatinosa, chamada de coloide, onde encontra-se o precursor hormonal inativo, a tireoglobulina, a partir da qual, posteriormente, sob estímulo, são produzidos e secretados os hormônios tireoidianos. Interpondo esse epitélio e dispostas sobre a membrana basal das células foliculares, tem-se em menor número as células parafoliculares (células C), responsáveis pela produção da calcitonina (ROSS; PAWLINA; BARNASH, 2012; SOKOLOWSKA *et al.*, 2018).

A maioria das células foliculares são cúbicas, de núcleos arredondados e coloração mais intensa que as células parafoliculares, no entanto, dependendo do processo de reabsorção do material coloide contido nos folículos, essas células podem adquirir a forma cilíndrica (quando o coloide está sendo reabsorvido, deixando o folículo com um tamanho menor, permitindo assim, que as células mudem de forma) ou pavimentosa (há pouca reabsorção e produção contínua do coloide, aumentando conseqüentemente o tamanho do folículo, que acaba comprimindo as células). As superfícies apicais dessas células são indistintas, devido a presença de pequenas e irregulares microvilosidades que se projetam para dentro do coloide. Durante o processo de reabsorção ativa, grandes pseudópodos apicais são projetados para dentro do folículo, logo, quando o material não está sendo reabsorvido ativamente esses pseudópodos estão ausentes. Já as células parafoliculares são maiores, com núcleos grandes de coloração mais clara e com um citoplasma mais abundante do que as células foliculares (ROSS; PAWLINA; BARNASH, 2012).

Quanto à sua função, a GT é responsável por secretar principalmente os hormônios tireoidianos (HT) - T4 (3', 5', 3,5-tetraiodo-L-tironina) e T3 (3,3', 5-triiodotironina), que desempenham papéis importantes em diferentes vias de crescimento e metabolismo do organismo (LI *et al.*, 2019), cuja liberação é controlada principalmente pelo hormônio estimulante da tireoide (TSH) através do sistema - eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HPT) (LEIDIG-BRUCKNER, 2019). Assim, o hipotálamo é estimulado a secretar o hormônio liberador de tireotropina (TRH), que irá induzir a glândula pituitária anterior a secretar o hormônio estimulante de tireoide (TSH) (MALLYA; OGILVY-STUART, 2018).

Diversas são as funções dos HTs no organismo, sendo, portanto, essenciais para o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas; crescimento e desenvolvimentos dos diferentes tecidos (STEPIEN; HUTTNER, 2019), como fígado, coração, cérebro, hipófise e hipotálamo, aumentando o efeito das catecolaminas e do consumo de oxigênio (LI *et al.*, 2019). No entanto, essas funções podem ser prejudicadas quando há alterações no desenvolvimento da glândula e/ou na sua síntese de hormônios, causando, distúrbios endócrinos (LEIDIG-BRUCKNER, 2019). As doenças causadas por essas alterações incluem condições em que há liberação excessiva de hormônios tireoidianos (hipertireoidismo), as associadas à deficiência de hormônio tireoidiano (hipotireoidismo) e as lesões neoplásicas da tireoide (LIVOLSI; BALOCH, 2018).

O hipertireoidismo é caracterizado como uma hiperfunção da glândula tireoide que leva a um estado de tireotoxicose e pode ser responsável por várias complicações hemodinâmicas e metabólicas do organismo (DAROUASSI *et al.*, 2018; KADDIS; TELLEZ, 2019). A tireotoxicose é uma manifestação clínica devido ao excesso de T4 e T3 a nível tecidual, proveniente da liberação excessiva de hormônio tireoidiano pré-formado na glândula tireoide ou a partir de outros tecidos, resultando em concentrações elevadas na circulação sanguínea (GEBREYOHANNES *et al.*, 2019). O hipertireoidismo em si, refere-se especificamente ao excesso de síntese e secreção de hormônios tireoidianos pela glândula tireoide (SHARMA; STAN, 2019), sendo relacionado a várias causas, mas principalmente pela doença autoimune - doença de Graves (KRYSIK; KOWALCZE; OKOPIEN, 2019).

Cerca de 1 a 3% da população em geral é afetada pela tireotoxicose, sendo 10 vezes mais comum em mulheres que em homens (GEBREYOHANNES *et al.*, 2019). Os pacientes apresentam manifestações clínicas, como intolerância ao calor, palpitações, diarreia e perda de peso, entre outras. Além disso, a tireotoxicose quando associada ao hipertireoidismo pode

causar bócio multinodular hiperfuncionante (tóxico), adenoma hiperfuncionante (tóxico), entre outras doenças (KADDIS; TELLEZ, 2019).

O hipotireoidismo resulta de uma alteração estrutural ou funcional da glândula, interferindo na produção de níveis adequados de HTs, que pode ser a partir de causas primárias (anomalias raras do desenvolvimento como a disgenesia tireoidiana e defeito biossintético congênito; autoimunidade; deficiência de iodo, entre outras) e secundários (insuficiência hipofisária e insuficiência hipotalâmica) (KUMAR *et al.*, 2013)

Assim como no hipertireoidismo, o hipotireoidismo pode ser iniciado pela autoimunidade contra a tireoide (tireoidite de Hashimoto), no entanto, nesse caso, a imunidade provoca destruição da glândula, em vez de estimulá-la (como ocorre na doença de Graves). A tireoidite significa inflamação que causa deterioração progressiva e, por fim, fibrose da glândula, resultando em diminuição ou ausência da secreção do hormônio tireoidiano (RYDZEWSKA *et al.*, 2018). O hipotireoidismo frequentemente pode ser associado ao bócio em várias situações, onde a causa mais comum ocorre por deficiência de iodo (ingestão inferior a 10 microgramas por dia) (MUKTAR *et al.*, 2019).

Tanto a doença de Graves (DG) quanto a tireoidite de Hashimoto são doenças autoimunes da tireoide (PAKETÇI *et al.*, 2018; SHAO; YU; SHEN, 2018; CYRANSKA-CHYREK *et al.*, 2019), caracterizadas pela perda da tolerância imunológica contra autoantígenos, como TSHR; TG e enzima peroxidase da tireoide (TPO), respectivamente (GONZÁLEZ-AMARO; MARAZUELA, 2016; RYDZEWSKA *et al.*, 2018).

A Doença de Graves é uma desordem multissistêmica caracterizada por uma reação imune humoral mediada pelos anticorpos TSHR circulantes (TSHRabs), também chamados de imunoglobulinas estimulantes da tireoide (TSIs), contra os receptores TSHs. O TSHRab atua como um agonista do TSH, ligando-se ao TSHR, que por sua vez, estimula expressões gênicas específicas para a síntese dos hormônios tireoidianos, induzindo assim, sintomas clínicos de tireotoxicose (HALL; GUYTON, 2017; CHENG *et al.*, 2019). Na avaliação microscópica da glândula tireoide observa-se uma hiperplasia papilar e folicular difusa, onde as células encontram-se mais arredondadas e um infiltrado inflamatório linfocitário em graus variáveis no estroma da tireoide é verificado (LIVOLSI; BALOCH, 2018; PAKETÇI *et al.*, 2018).

Diferentemente da patogênese mediada por anticorpos na DG, a tireoidite de Hashimoto é desencadeada geralmente pela autoimunidade mediada por células T, principalmente pelos linfócitos Th1 e Th17 (VITALES-NOYOLA *et al.*, 2017). Essas células, são encontradas em grande concentração no infiltrado inflamatório nesses casos, resultando, na apoptose difusa das

células foliculares da tireoide, por conseguinte, na fibrose, atrofia e declínio da função da GT (CHENG *et al.*, 2019).

A tireoidite de Hashimoto (TH) é uma doença que afeta cerca de 2% da população mundial, sendo o sexo feminino o mais acometido (FARHANGI; TAJMIRI, 2018). A TH pode ser classificada em duas formas: primária e secundária. A forma primária é a mais comum e compreende os casos que até então não possuem causas identificáveis. Já a secundária inclui os casos em que o agente etiológico pode ser claramente identificado, sendo as formas mais comuns, a indução por iatrogênias e pela administração de drogas imunomoduladoras, a exemplo da administração de interferon-alfa (IFN- α) para o tratamento da infecção viral da hepatite C (CATUREGLI; DE REMIGIS; ROSE, 2014).

A forma primária é subdividida em seis variantes clínico-patológicas principais: 1) forma clássica; 2) variante fibrosa; 3) variante relacionada a IgG4; 4) forma juvenil; 5) Hashitoxicosis e 6) tireoidite indolor ou silenciosa (ocorre esporadicamente ou no pós-parto) (CATUREGLI; DE REMIGIS; ROSE, 2014). Clinicamente, a manifestação mais comum é bócio, podendo ou não estar associado ao hipotireoidismo. Microscopicamente, cada variante possui características distintas, no entanto, no geral, observa-se um infiltrado inflamatório mononuclear, composto principalmente por linfócitos que se disseminam por toda a glândula, levando assim, à atrofia dos folículos tireoidianos. Além disso, também é observado em muitas áreas da lesão, folículos revestidos por células oncocíticas, que se formam a partir da metaplasia das células foliculares (CATUREGLI; DE REMIGIS; ROSE, 2014; PYZIK *et al.*, 2015).

Em relação ao bócio, cujo termo designa aumento da glândula tireoide, é caracterizado por um distúrbio endócrino comumente visto, afetando cerca de 4% a 10% da população mundial (YANG; LU, 2018). O seu desenvolvimento ocorre por um crescimento anormal da glândula tireoide (hiperplasia dos tireócitos), após estimulação excessiva pelo TSH, que resulta na hipertrofia e hiperplasia das células constituintes da glândula, levando ao aumento lento e perceptível no tamanho da mesma. A hipertrofia e aumento na massa da glândula é clinicamente detectado por inspeção física e palpação (FAREBROTHER; ZIMMERMANN; ANDERSSON, 2019; MUKTAR *et al.*, 2019). São considerados como atóxicos ou simples, quando não há hiperfunção da glândula e dependendo da área geográfica, podem ser endêmicos ou esporádicos, e são classificados como tóxicos quando há uma hiperfunção da glândula, levando a produção excessiva dos HTs. Os bócios também podem ser classificados de acordo com sua forma - difuso, uninodular e multinodular (ARAP *et al.*, 2006).

O bócio endêmico possui uma prevalência de 10% da população, frequentemente encontrado em regiões em que o solo, a água e os suprimentos alimentares contêm pouco iodo, podendo afetar indivíduos na puberdade, gestação ou em situações de estresse. Já o bócio esporádico ocorre em uma menor frequência, sendo mais comum em mulheres, com um pico de incidência na puberdade ou em adultos jovens, quando ocorre um aumento da demanda fisiológica por T4, podendo ser causado por diversas condições, como a ingestão de substâncias que interferem na síntese dos HTs (DELSHAD; AZIZI, 2017; RUESTRA FERNÁNDEZ *et al.*, 2017).

Na maioria dos casos, a hipertrofia e a hiperplasia dos tireócitos induzidos pelo TSH leva inicialmente ao aumento difuso e simétrico da glândula, resultando no bócio difuso (BD). Com o aumento dietético do iodo ou nos casos em que as demandas pelos HTs forem reduzidas, o epitélio folicular involui, permitindo que a partir disso ocorra o aumento da glândula, com folículos ricos em coloide, formando assim o bócio coloide (BC). Nesses casos o epitélio folicular pode estar hiperplásico nos estágios iniciais da doença ou pavimentoso e cuboidal durante períodos de involução. Com o tempo, episódios recorrentes de hiperplasia e involução se combinam e produzem um aumento mais irregular da tireoide, denominado bócio multinodular (KUMAR *et al.*, 2013).

Com a deficiência da ingestão do iodo, o bócio coloide endêmico se desenvolve devido à diminuição da produção de T3 e T4, que por sua vez impede a inibição do TSH. Com isso, o TSH passa a ser secretado em uma quantidade excessiva, onde na glândula tireoide, estimulará as células foliculares tireoidianas a secretarem uma grande quantidade de coloide nos folículos, aumentando assim, cada vez mais o tamanho da glândula (TSATSOULIS, 2018). Em algumas pessoas com bócio coloide, a tireoide apresenta anormalidade no sistema enzimático necessário para a formação dos hormônios tireoidianos (GUYTON; HALL, 2017)

O bócio multinodular (BMN), também denominado de bócio adenomatoso, bócio nodular atóxico e bócio coloide nodular, acomete em torno de 4% da população em países com quantidade de iodo suficiente (nesse caso o seu desenvolvimento ocorre a partir de alterações moleculares e/ou genéticas), tendo sua frequência aumentada em áreas com deficiência de iodo (MEYER; MAIA, 2009; SARFATI-LEBRETON *et al.*, 2019) e com o aumento da idade, sem predileção por sexo (LIN *et al.*, 2016). Essas lesões surgem como glândulas de aparência multilobuladas, cujo crescimento ocorre de forma assimétrica e que podem atingir um tamanho bem volumoso. Os nódulos apresentam superfícies irregulares e no seu interior encontra-se quantidades variáveis de coloide marrom e gelatinoso. As lesões mais antigas exibem áreas de

fibrose, hemorragia, calcificação e alteração cística (AL KHADER *et al.*, 2019). Microscopicamente observa-se folículos ricos em material colóide revestidos por epitélio pavimentoso inativo e, áreas de hipertrofia e hiperplasia epitelial folicular (KUMAR *et al.*, 2013).

Nos casos em que há excesso de iodo, o bócio pode ocorrer devido à falha em escapar do efeito Wolff-Chaikoff (auto regulação realizada pelas células tireoidianas foliculares, que inibem a captação de iodeto quando uma grande quantidade de iodo é ingerida, resultando em uma diminuição da síntese de HTs) ou devido à estimulação persistente por anticorpos em doenças autoimunes, resultando, por conseguinte, no aumento do tamanho da tireoide (LEIDIG-BRUCKNER, 2019). Além disso, indivíduos vulneráveis ao ingerirem uma quantidade excessiva de iodo podem ter hipotireoidismo temporário ou subclínico, por não se adaptar bem ao efeito agudo de Wolff-Chaikoff (FAREBROTHER; ZIMMERMANN; ANDERSSON, 2019). Nesse caso, o TSH se encontra elevado, enquanto os hormônios tireoidianos T3 e T4 permanecem dentro de suas respectivas faixas de referência (MIDGLEY *et al.*, 2019).

O desenvolvimento do bócio difuso tóxico (BDT) ocorre através do hipertireoidismo clássico causado por autoanticorpos (Doença de Graves) contra os receptores do TSH, o qual estimula os tireócitos e, por conseguinte o aumento da tireoide, levando assim, ao crescimento não nodular e uma hipervascularização (LIVOLSI; BALOCH, 2018; FAREBROTHER; ZIMMERMANN; ANDERSSON, 2019). Na avaliação microscópica da glândula tireoide observa-se uma hiperplasia papilar e folicular difusa, onde as células encontram-se com formato mais cúbicas e um infiltrado inflamatório linfocitário em graus variáveis no estroma da tireoide é verificado (LIVOLSI; BOLOCH, 2018; PAKETÇI *et al.*, 2018; LEIDIG-BRUCKNER, 2019).

Já o bócio nodular tóxico (BNT) é uma lesão caracterizada pelo aumento da glândula tireoide, que pode se apresentar como nódulo solitário ou como múltiplos nódulos de tamanhos variados de funcionamento autônomo (CRAMON *et al.*, 2016), com uma maior prevalência em idosos. Na análise histopatológica, os nódulos apresentam hiperplasia papilar e folicular, com infiltrado inflamatório linfocítico em meio ao estroma (LIVOLSI; BOLOCH, 2018).

No que se refere às doenças neoplásicas, muito tem se discutido sobre nomenclatura das lesões que acometem a tireoide, que vem passando por diversas alterações desde 1960, mesmo assim ainda não há um consenso entre os especialistas quais características devem ser melhor identificadas para confirmação de câncer, logo, qual o prognóstico a ser esperado, causando divergência de diagnóstico entre os especialistas. Toda essa confusão entre os profissionais

ocorre devido a semelhança das características citológicas e/ou histopatológicas apresentadas entre elas (NIKIFOROV *et al.*, 2016).

De acordo com última classificação realizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2017, as neoplasias primárias da tireoide derivadas das células foliculares foram classificadas em: 1) benignos (adenoma folicular, tumor trabecular hializante); 2) tumores foliculares “borderlines” (tumor folicular de potencial incerto [FT-UMP], tumor bem diferenciado de potencial maligno incerto [WDT-UMP] e neoplasias tireoidianas foliculares não invasivas com aspectos nucleares papilíferos [NIFTP]); 3) carcinoma papilar; 4) carcinoma folicular; 5) tumor de células de Hürthle (adenoma de células de Hürthle e carcinoma de células de Hürthle); 6) carcinoma pouco diferenciado; 7) carcinoma anaplásico e 8) carcinoma de células escamosas (LAM, 2017).

O adenoma folicular clássico foi subdividido em oito variantes: adenoma hiperfuncionante; adenoma folicular com hiperplasia; lipoadenoma; adenoma folicular com núcleos bizarros; adenoma folicular de células com anel de sinete; adenoma folicular de células claras; adenoma folicular variante de células fusiformes e adenoma folicular “black” (recém incluída na classificação). A variante oncócica do adenoma folicular presente na classificação da OMS de 2004, foi incluída nessa nova edição como uma entidade separada (LAM, 2017; ASA, 2019).

Além do adenoma folicular, o carcinoma papilífero e o carcinoma folicular, também são divididos de acordo com as variantes apresentadas por eles, sendo, portanto, o carcinoma papilífero subclassificado em: convencional, variante folicular, variante encapsulada, microcarcinoma papilar, variante de célula colunar e variante oncócica; e o carcinoma folicular em: angioinvasivo encapsulado e amplamente invasivo (GUO *et al.*, 2018; ASA, 2019).

Diferentemente do bócio, os adenomas são neoplasias benignas derivadas do epitélio folicular, que se assemelham ao tecido tireoidiano, o qual em grande parte dos casos, formam as estruturas foliculares da tireoide. Essas lesões além do volume elevado, apresentam uma hiperfunção da glândula tireoide com quantidades elevadas de hormônio T3 e T4 (tireotoxicose). Nos casos de adenoma tóxico, esse aumento da produção hormonal é independente do estímulo pelo TSH (LI *et al.*, 2017). Essas lesões são mais comumente encontradas em mulheres, de faixa etária entre 40 a 60 anos (FAREBROTHER; ZIMMERMANN; ANDERSSON, 2019).

Os adenomas tireoidianos em geral são solitários, bem circunscritos, delimitados por uma cápsula íntegra de tecido colagenizado, com formação de folículos que contêm coloide, com células revelando poucas alterações. A principal característica do adenoma é a preservação da cápsula evidenciando um crescimento expansivo (ZABLOTSKA *et al.*, 2015).

O adenoma folicular (AF) pode ser confundido com o carcinoma folicular de tireoide (CFT) por apresentarem características histológicas semelhantes. O que diferencia essas duas lesões é a presença da invasão capsular e/ou vascular por células neoplásicas nos CFT. De acordo com os estudos, acredita-se que o ATF eventualmente progride para o CFT, devido ao rearranjo cromossômico que ocorre na contraparte benigna, como também pela alta celularidade e características atípicas apresentadas por alguns ATFs (ACQUAVIVA *et al.*, 2018).

A maioria das lesões nodulares da tireoide são lesões benignas, porém nos últimos tempos a prevalência do câncer de tireoide tem aumentado muito, representando aproximadamente 5% a 10% de todos os nódulos tireoidianos (SANTANA *et al.*, 2019). Dentre as neoplasias malignas endócrinas, o câncer de tireoide é a mais comum, cuja origem é predominantemente a partir das células foliculares da tireoide, em que cerca de 95% são carcinomas bem diferenciados da tireoide (CBDT) (DUAN *et al.*, 2019; VALVO; NUCERA, 2019).

Dentre os tipos de neoplasias malignas da tireoide, o carcinoma papilífero da tireoide (CPT) é o mais comum, com uma frequência de aproximadamente 80% a 85% dos casos (HUANG *et al.*, 2019; VALVO; NUCERA, 2019). Essas lesões podem se manifestar solitárias ou multifocais no interior da tireoide, bem circunscritas ou até mesmo encapsuladas. O diagnóstico se baseia nas características nucleares das células, mesmo que se tenha uma ausência de arquitetura papilífera. Os núcleos das células são redondos a ovoides, com frequentes indentações e irregularidades da membrana nuclear, as quais são responsáveis pela aparência típica de fenda, além disso, os núcleos medem aproximadamente o dobro de uma célula do epitélio tireoidiano normal. O núcleo contém a cromatina finamente dispersa, o que confere o aspecto opticamente claro, dando origem à designação de núcleos em vidro fosco ou em “olho da órfã Annie” (GNEPP, 2009; LLOID *et al.*, 2017; KURE; WADA; NAITO, 2019). Estruturas calcificadas concentricamente denominados corpos de psammoma, também, podem frequentemente serem encontradas no interior das papilas destas neoplasias (ASA, 2019).

Na tentativa de compreender melhor o comportamento do CPT, vários estudos têm mostrado variações nas mutações genéticas, em que a partir disso, podem explicar a

heterogeneidade prognóstica que ocorre nessas lesões. Nesse sentido, várias modificações genéticas têm mostrado efeitos na gênese tumoral, em que vários marcadores já foram identificados (NAGAYAMA; MISHIMA, 2019). No CPT a patogênese molecular envolve várias mutações que levam a ativação das vias de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fosfatidilinositol 3-quinase/AKTAs. As alterações mais frequentes que levam à ativação da via MAPK são mutações pontuais nos genes BRAF e RAS, como também rearranjos cromossômicos que ocorrem nos genes RET, RAF, NTRK3, NTRK1, ALK e outros (BORRELLI *et al.*, 2019).

Dentre essas alterações genéticas, a mutação da BRAF^{V600E} é a mais comum, ocorrendo em aproximadamente 36%-69% dos CPT (PENNA *et al.*, 2016), seguido do rearranjo cromossômico RET-PTC e o RAS. Essas mutações resultam na ativação contínua da via MAPK, que por sua vez promove o crescimento, a proliferação e diferenciação das células tumorais. Muitos estudos sugeriram que a mutação do BRAF está relacionada à agressividade dos CPTs, como também com o tamanho do tumor, a extensão extratireoidiana, invasão vascular, metástase linfonodal e recorrências. No entanto, outros estudos demonstraram resultados diferentes, indicando que essas características clínico-patológicas podem variar dependendo da região geográfica, do histórico do paciente e da metodologia da pesquisa (HUANG *et al.*, 2019; KURE; WADA; NAITO, 2019).

Além disso, a literatura também tem correlacionado os fatores ambientais que desempenham importantes papéis nas mutações desses genes, como a radiação ionizante e disponibilidade de iodo na dieta, embora provavelmente existam outros fatores cujos papéis ainda não estão bem elucidados. A radiação ionizante por induzir a recombinação cromossômica, induz o desenvolvimento do CPT através dos rearranjos gênicos como RET-PTC, ETV-NTRK3 e AKAP9-BRAF, enquanto que a exposição a agente químicos (como nos casos de ingestão dietética de nitratos e nitritos) induz o desenvolvimento tanto do CPT como do CFT, através das alterações em um único nucleotídeo. No que diz respeito à ingestão de iodo pela dieta, o excesso do iodo tem sido associado à mutação do p. V600E do BRAF no CPT (ACQUAVIVA *et al.*, 2018).

Para o diagnóstico dos nódulos tireoidianos, além da avaliação clínica, a punção aspirativa por agulha fina (PAAF), algumas vezes guiada pela USG, é outro método de diagnóstico utilizado de forma complementar. Embora também seja um método examinador-dependente, sua sensibilidade pode estar acima de 80% e a especificidade em torno de 70 a 90%, com acurácia aproximando-se de 90%. Alguns exames PAAF podem não ser conclusivos,

devido a amostras colhidas com material inadequado, colocação incorreta da agulha, citopatologistas inexperientes e diferentes critérios entre laboratórios. Nos casos de carcinoma folicular, embora possa indicar malignidade, esse exame não pode afirmar com exatidão a existência do câncer na tireoide, pois não é observado a presença de invasão vascular e/ou capsular da lesão tumoral, o que só pode ser detectado em exame histopatológico (BONGIOVANNI *et al.*, 2012; DELLAL *et al.*, 2017).

Em 2007, visando categorizar os achados citopatológicos da PAAF do nódulo tireoideano, o National Cancer Institute (NCI), realizou na cidade de Bethesda, uma conferência cujas conclusões levaram ao projeto: *The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: Definitions, Criteria and Explanatory Notes*, publicado em 2009, que classifica o material colhido por PAAF nas seguintes categorias: (I) insatisfatório ou inconclusivo; (II) benigno; (III) atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado; (IV) neoplasia folicular ou suspeito para neoplasia folicular; (V) suspeito para malignidade; (VI) maligno. Esse sistema é utilizado como forma de padronizar e limitar o número de categorias de diagnóstico para as amostras de aspiração com agulha fina da tireoide – PAAF, facilitando, assim, a comunicação e interpretações entre os médicos, além de evitar que neoplasias benignas ou malignas com pouca chance de metástase sejam desnecessariamente tratadas de forma radical (CIBAS; ALI, 2017).

Nesse contexto, mediante os estímulos provocados por infecções ou danos às células por diversos fatores, células da imunidade inata e adquirida, bem como citocinas são estimuladas a combaterem o estímulo agressor e restabelecer o equilíbrio local. Nesse sentido, os estudos têm direcionado as suas pesquisas para os diferentes tipos celulares e mediadores químicos da resposta imune, bem como a sua função em diversas doenças (MOULD *et al.*, 2017).

2.2 Interleucina-17 e Interleucina-23

A resposta imune é uma reação do organismo que ocorre frente aos componentes dos microrganismos, como também a proteínas, polissacarídeos e agentes químicos que são reconhecidos como estranhos, independentemente de a origem ser fisiológica ou patológica. Em alguns casos, as próprias moléculas do organismo podem estimular a resposta imune, provocando assim doenças autoimunes. Nesse sentido, a resposta imunológica ocorre através

de uma grande interação entre as células imunes e componente moleculares, como citocinas e quimiocinas, que desenvolvem respostas específicas quando reconhecem algo como estranho (FURMAN; DAVIS, 2015).

As citocinas são caracterizadas por grupo de proteínas que são secretadas pelas células imunes e por várias outras células do organismo, que são responsáveis por diversas funções, como por exemplo processo de crescimento e diferenciação de células imunes, bem como a ativação das funções efetoras dos linfócitos e fagócitos (SPANGLER *et al.*, 2015; COOK *et al.*, 2018).

Com isso, a primeira linha de defesa envolve a ativação da imunidade inata, cuja resposta é especializada para os diferentes tipos de patógenos. A resposta inata serve como um alerta para o sistema imune e permite que uma resposta rápida e de curta duração ocorra contra o patógeno, até que a ativação da resposta imune adaptativa esteja pronta para atuar (RIERA ROMO; PÉREZ-MARTÍNEZ; CASTILLO FERRER, 2016; MARSHALL *et al.*, 2018).

Diferentemente da resposta imune inata, a resposta adaptativa atua especificamente contra os diferentes agentes invasores, através de duas vias – a imunidade celular (linfócitos T) e a imunidade humoral (linfócitos B), onde, após o primeiro contato, a sua resposta se adapta as diferentes substâncias expostas, podendo assim gerar células de memória, fornecendo, por conseguinte, uma ação mais rápida e intensa (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015; MARSHALL *et al.*, 2018).

Nas doenças causadas por infecções, dependendo da localização (intra ou extracelular) e do tipo do agente agressor, células específicas da imunidade inata e adquirida atuam com o intuito de combater a infecção. Em geral, o passo inicial para a eliminação do patógeno envolve componentes do sistema imune inato, tais como células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos), células NK (natural killer) entre outras, que serão recrutadas para o local da infecção por meio da produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α (MARSHALL *et al.*, 2018), e, posteriormente, a resposta adaptativa vem a atuar (FURMAN; DAVIS, 2015; MARSHALL *et al.*, 2018).

No que se refere às doenças neoplásicas, estudos têm mostrado que no microambiente tumoral há uma diversidade de antígenos, logo uma variedade de células da imunidade inata e adaptativa podem ser encontradas, como células NK, neutrófilos, macrófagos e linfócitos T (BUONCERVELLO; GABRIELE; TORCHI, 2019).

Os linfócitos T são células da imunidade adaptativa, que podem conferir proteção contra patógenos intra e extracelulares, bem como auxiliar na eliminação de células tumorais

(MARSHALL *et al.*, 2018). Mediante a presença de estímulos específicos, os linfócitos T virgens gerados no timo são diferenciados nos órgãos linfoides periféricos em diferentes tipos de células T (CUNHA *et al.*, 2012; VITALES-NOYOLA *et al.*, 2017). Nesse sentido, as células TCD8⁺ aparecem como principais células efetoras na imunidade antitumoral, devido à alta concentração encontrada em muitos tumores (QIU; WANG, 2018), sugerindo que a função desses linfócitos é a imunovigilância, atuando assim, no reconhecimento e destruição de células potencialmente malignas (PENG *et al.*, 2019). Além delas, as células TCD4⁺ também contribuem para as respostas contra os tumores por meio das suas subpopulações, bem como pelas citocinas produzidas por elas (CAUGHNON; YANG; YOUNG, 2018), logo, dependendo da citocina presente no meio, os linfócitos TCD4⁺ são diferenciados em células Ths efetoras, representadas principalmente pela Th1, Th2 e Th17, como também, em células não efetoras - as células T reguladoras (Treg) (DUAN *et al.*, 2019).

Apesar das subpopulações Th1 e Th2 serem consideradas como linhagens definitivas, alguns estudos tem mostrado que os subconjuntos Th17 e Treg podem se converter em qualquer outra subpopulação, a partir do perfil de citocinas presentes no meio, devido à plasticidade ou instabilidade apresentada por essas células durante o processo de diferenciação (GUÉRY; HUGUES, 2015).

O desenvolvimento dos linfócitos Th17 ocorre através dos estímulos mediados pelas citocinas pró-inflamatórias, a IL-6 e IL-1, como também pela anti-inflamatória, o fator de crescimento transformador beta (TGF- β). Essas citocinas ativam vários fatores de transcrição, como ROR γ T e STAT3, que vão estimular a diferenciação das células TCD4⁺ naive no subgrupo Th17 (MARKS *et al.*, 2009; DUAN *et al.*, 2019).

O ROR γ T é um fator de transcrição membro da família do receptor do ácido retinoico, que é codificado pelo gene RORC (por isso as vezes é chamado de RORc) e é considerada como a principal proteína reguladora da diferenciação das células Th17, cuja ativação ocorre a partir do estímulo pelo STAT3 (GUÉRY; HUGUES, 2015; MARTINEZ *et al.*, 2018; MARKS *et al.*, 2019).

Os linfócitos Th17 foram inicialmente caracterizados em 2005 como uma linhagem distinta das células T CD4⁺ (GUÉRY; HUGUES, 2015), cuja função é promover o recrutamento de neutrófilos e monócitos (em menor extensão), para os locais infectados por bactérias extracelulares e fungos, além de induzir a inflamação (MARTINEZ *et al.*, 2018). Essa subpopulação é responsável por secretar importantes ILs, incluindo IL-17A (IL-17), IL-17F, IL-21 e IL-22, como também estimular células epiteliais, fibroblastos e macrófagos a liberarem

mediadores inflamatórios, como: quimiocinas, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e proteína quimiotática de monócitos (PQM) (JIANG *et al.*, 2014; GONZÁLEZ-AMARO; MARAZUELA, 2016; VITALES-NOYOLA *et al.*, 2017; SHAO; YU; SHEN, 2018; ZHANG *et al.*, 2018).

A IL-17 é uma citocina incomum, pois tanto ela, como o seu receptor não apresentam nenhuma semelhança com qualquer outro par de citocina-receptor conhecido. A família da IL-17 é composta por 6 proteínas que se correlacionam estruturalmente. As funções imunológicas são iniciadas pela IL-17A, a qual é produzida pelas células Th17, T $\gamma\delta$ e CD8+ (SONG *et al.*, 2019). Várias são as funções dessa citocina na defesa do organismo, podendo atuar sobre vários tipos de células, incluindo células epiteliais, fibroblastos e macrófagos, induzindo nelas a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-8, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF). Além disso, as pesquisas demonstraram que a IL-17 estimula a produção de outras citocinas, como IL-6, IL-8 e G-CSF, em células não imunes, como fibroblastos do tecido conjuntivo e células epiteliais, através da ativação do fator de transcrição - nuclear κ B (NF- κ B), além de estar sendo associada ao processo da progressão tumoral (ZAKE *et al.*, 2018; DUAN *et al.*, 2019; SONG *et al.*, 2019).

Devido à ampla atuação da IL-17 sobre a regulação da resposta imunológica inata e adaptativa, vários estudos têm avaliado sua atuação em diferentes doenças, sendo, portanto, encontrada uma superprodução em diversas doenças inflamatórias, como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), artrite de células gigantes, doença de Crohn, porém o papel da IL-17 nessas doenças ainda não está bem esclarecido. Além dessas doenças, a IL-17 também já foi identificada em várias doenças autoimunes, como artrite reumatóide, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal, esclerose sistêmica, síndrome de Sjogren primária, em que o seu papel tem sido observado na patogênese dessas doenças (BERNARDINI *et al.*, 2019).

No que se refere às neoplasias, pesquisas têm observado que no microambiente de muitos tumores há uma produção em níveis aumentados de IL-17, logo, os autores sugerem um papel pró-tumorigênico, através da angiogênese (CAUGHN; YANG; YOUNG, 2018), pois a IL-17 estimula a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), prostaglandinas E1, E2 (PGE1 e PGE2) entre outros fatores, pelas células tumorais e pelos fibroblastos, resultando assim, no desenvolvimento e progressão do tumor. Além disso, estudos mostram que a IL-17 também induz a produção de IL-6 pelas células tumorais, que por sua vez,

promovem o crescimento tumoral através da ativação da STAT3 e a expressão de genes angiogênicos (GUÉRY; HUGUES, 2015; FENG *et al.*, 2016).

Nas neoplasias, estudos relatam que a IL-17 também tem um papel antitumoral, cuja atuação ocorre a partir do recrutamento e a ativação de células citotóxicas (células TCD8+ e células NK) e neutrófilos para o microambiente tumoral. O recrutamento dessas células pela IL-17 ocorre através de um mecanismo indireto, onde essa citocina atua estimulando a liberação de diferentes mediadores inflamatórios, como IL-10, IL-1 β , IL-6, TNF- α , CXCL1, CXCL5 e CXCL8, por macrófagos, células epiteliais, endoteliais e outras células estromais, resultando, por conseguinte, no recrutamento e na ativação das células citotóxicas e dos neutrófilos, que vão atuar na destruição das células neoplásicas (ASADZADEH *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2018).

Além das IL-1 e 6, a IL-23 também apresenta grande influência no processo de diferenciação das células Th17, porém, ela atua no processo de estabilização da proliferação celular e na manutenção de diferenciação dessas células (MARKS *et al.*, 2019). A IL-23 é uma citocina pró-inflamatória, caracterizada por pertencer a família das citocinas IL-12, cuja produção se dá a partir de diversas células imunes, entre elas, as células dendríticas e macrófagos (LIU *et al.*, 2019; MARKS *et al.*, 2019). As células T de memória que expressam o receptor de IL-23 ao se ligarem à IL-23 induzem a ativação do STAT3, e por sua vez, do ROR γ T, estimulando, assim, a proliferação e a produção das citocinas da Th17 (NEURATH, 2019), além de também induzirem a conversão dessa subpopulação dos linfócitos em células patogênicas pró-inflamatórias Th1, capazes de sintetizar IFN- γ e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (RAMOS-LEVÍ; MARAZUELA, 2016). Dessa forma, estudos observando as funções da IL-23, mostram que esta citocina regula os sinais da imunidade inata e adquirida durante a homeostase tecidual e de vários distúrbios (NEURATH, 2019).

Assim como a IL-17, a IL-23 tem sido associada à patogênese de diversas doenças inflamatórias crônicas, como a psoríase, e doenças inflamatórias intestinais (NEURATH, 2019), assim, como também tem sido relacionada à carcinogênese, devido aos altos níveis que já foram encontrados em alguns cânceres, como o carcinoma hepatocelular humano, carcinoma colorretal, carcinoma escamoso e carcinoma esofágico. Dessa forma, muitos estudos demonstraram que a IL-23 pode promover a produção de IL-17 e/ou IL-22 por células T CD8, células T $\gamma\delta$ e células linfoides inatas do grupo 3 (ILC3), no entanto, seu papel no desenvolvimento do tumor é controverso (MEI *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2019), embora,

evidências em alguns trabalhos sugeriram que a superexpressão da IL-23 pode induzir metástase no câncer colorretal, pulmonar e bucal (MEI *et al.*, 2015).

Nesse sentido, pesquisas avaliando a presença da IL-17 e IL-23 em lesões tireoidianas têm observado um aumento dos seus níveis em várias doenças que acometem a glândula (RAMOS-LEVÍ; MARAZUELA, 2016; CARVALHO *et al.*, 2017; ZAKE *et al.*, 2018). No estudo de Degertekin *et al.* (2016), ao avaliarem os níveis de IL-17 e IL-23, os autores observaram que em pacientes com tireoidite de Hashimoto que exibiam função tireoidiana normal, verificou-se níveis circulantes mais altos de IL-17 e IL-23 do que em pacientes com hipotireoidismo, sugerindo assim, que o hipotireoidismo pode ter um efeito inibitório na produção de citocinas. Em uma outra pesquisa, Zake *et al.* (2018), também avaliando os níveis de IL-17 em doenças autoimunes, como também no bócio coloide, observaram que a imunoposição dessa interleucina foi maior nos casos de tireoidite de Hashimoto, do que naqueles que possuíam doença de Graves ou bócio.

Esse aumento da IL-17 também foi observado em outros trabalhos avaliando sua presença em neoplasias tireoidianas, como no de Lu e Yuan (2015), que verificaram um aumento significativo de IL-17 a nível sérico nos carcinomas em comparação aos adenomas. No estudo de Jiang *et al.* (2015) ao fazerem uma análise das células Th17, células Tc17 (células TCD8+ produtoras de IL-17) e da IL-17 a nível sanguíneo em pacientes com algum tipo de neoplasia tireoidiana (adenoma ou carcinoma), observaram que nesses pacientes havia uma concentração significativamente maior de células Th17 e da IL-17 quando comparado aos indivíduos saudáveis. Além disso, nesse estudo, também foi observado na imunistoquímica para a Th17, uma maior imunoposição nos tumores tireoidianos em relação ao grupo controle. A partir disso, os autores concluíram que o aumento da produção da IL-17 se dava a partir das células Th17, sugerindo dessa forma, que esses linfócitos contribuíam para a patogênese e progressão do tumor.

Além da IL-17, a IL-23 também já foi identificada em lesões tumorais da tireoide, como no estudo de Carvalho *et al.* (2017), onde a imunoposição da IL-17 e IL-23 estava presentes em todas as células (tumorais e linfocíticas) das lesões estudadas (CBDT – CPT e CFT, carcinoma medular [CMT], adenomas foliculares e bócio), no entanto a imunoposição da IL-17 e IL-23 foi menor nas lesões benignas (bócio e adenoma) quando comparado aos carcinomas (CBD e CMT).

Assim sendo, embora estudos prévios mostrem que houve o aumento dos níveis séricos e da imunomarcção da IL-17 e da IL-23 tanto nas lesões reativas (bócio), como nas doenças

autoimunes e neoplásicas (adenomas e carcinomas), os dados ainda se mostram conflitantes no que diz respeito à influência dessas citonas na patogênese, progressão e prognóstico dessas doenças tireoidianas (JIANG *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2017).

Dessa forma, considerando o efeito significativo da IL-17 e IL-23 descrito na literatura sobre a patogênese de algumas lesões tireoidianas, avaliar o perfil da imunexpressão dessas proteínas nos linfócitos e sua distribuição nas células de algumas doenças da tireoide é essencial para a compreensão dos complexos fenômenos que ocorrem entre o microambiente celular e essas citocinas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Esta pesquisa pretendeu avaliar comparativamente a imunexpressão das proteínas IL-17 e IL-23 em bócios coloides (BC), adenomas foliculares (AFs), carcinomas papilíferos de tireoide (CPTs) e tireoidites de Hashimoto (THs) (isoladas e associadas a CPTs ou BCs), com o intuito de compreender melhor a atuação destas citocinas nestas doenças tireoidianas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as características clínicas (gênero, idade e localização) dos CPTs, AFs, BCs e BC, TH (isoladas e associadas a CPTs ou BCs).
- Avaliar a imunomarcção (distribuição e quantificação) da proteína IL-17 nos linfócitos e nas células foliculares/tumorais CPTs, AFs, BCs e BC, TH (isoladas e associadas a CPTs ou BCs).
- Avaliar a imunomarcção (distribuição e quantificação) da proteína IL-23 nos linfócitos e nas células foliculares/tumorais CPTs, AFs, BCs e BC, TH (isoladas e associadas a CPTs ou BCs).
- Verificar se há correlação na imunomarcção entre as proteínas IL-17 e IL-23 nos diferentes tipos de lesões estudadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Implicações éticas

Para a realização do estudo, este projeto foi cadastrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), via Plataforma Brasil, e submetido à apreciação do seu conteúdo pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL), de acordo com a Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), sendo aprovado, obtendo o número do parecer nº 1908883.

4.2 Caracterização do estudo

O presente trabalho consistiu em um estudo transversal, observacional, descritivo, semiquantitativo e quantitativo, constituído pela análise e registro dos aspectos clínicos (gênero, idade e localização) de BC, AF, CPT e TH (isoladas e associadas a CPT ou BC), bem como pela análise da expressão imunistoquímica da IL-17 e IL-23 nos linfócitos presentes em todos os casos, nas células foliculares (BC, TH isolada e TH associada à BC) e tumorais (AF, CPT e TH associada a CPT).

4.3 População

A população do estudo foi constituída pelos casos de BC, AF, CPT e TH (casos isoladas e associadas a CPT ou BC) diagnosticados e arquivados no Serviço de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia da UFRN.

4.4 Amostra

Para o desenvolvimento da pesquisa 4 grupos foram selecionados, sendo compostos por 15 casos de bócio colóides (BC), 10 adenomas foliculares (AF), 30 carcinomas papilíferos da tireoide (CPT) e 15 tireoidites de Hashimoto (sendo 3 casos isoladas, 10 casos associadas a CPT e 2 casos associadas à BC), que estavam incluídos em blocos de parafina e armazenados no Departamento de Patologia da UFRN.

4.5 Critérios de seleção da amostra

4.5.1 Critérios de Inclusão

- Informações clínicas das lesões diagnosticados como BC, AF, CPT, TH (casos isoladas e associadas a CPT ou BC), suficientes para a realização do estudo clínico – gênero, idade e localização;
- Quantidade e qualidade do material contido nos blocos de parafina suficientes para confecções de lâminas para o estudo imunoistoquímico.

4.5.2 Critérios de Exclusão

- Foram excluídos os casos que a reação imunoistoquímica não funcionou, mesmo após o teste com vários protocolos ou que o tecido foi perdido durante a confecção das lâminas na técnica da imunoistoquímica;
- Foram excluídos os casos que não foram encontrados os blocos em parafina.

4.6 Caracterização clínica das lesões

Os dados clínicos do BC, AF, CPT, TH (casos isoladas e associadas a CPT ou BC), foram obtidos das fichas clínicas dos pacientes arquivadas no serviço de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia da UFRN e descritos em fichas previamente elaboradas de acordo com o gênero, idade e localização das lesões.

4.7 Estudo imunoistoquímico

4.7.1 Técnica imunoistoquímica

Dos materiais incluídos em blocos de parafina, foram obtidos cortes histológicos de 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro previamente limpas e preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropyltriethoxi-silano, Sigma Chemical CO, USA). Os cortes posteriormente foram submetidos aos anticorpos primários para a IL-17 e IL-23 de acordo com as especificações presentes no quadro 1. Posteriormente, as amostras foram

incubadas com o sistema *HiDef* (Cell Marque, CA, USA). A técnica utilizada foi realizada conforme os passos que se seguem:

Quadro 1 - Especificação dos anticorpos

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Tempo de Incubação
IL-17	Policlonal Sc-7927	Santa Cruz Biotechnology,	1:500	Trilogy Pascal	<i>Overnight</i>
IL-23	Policlonal Sc- 50303	Santa Cruz Biotechnology	1:400	Trilogy Pascal	<i>Overnight</i>

- Emprego da solução Trilogy (Cell-Marque TM Corporation, CA, USA), na concentração de 1:100, em panela Pascal (DakoCytomation) por 3 minutos, para realizar a desparafinização;
- Lavagem do material em água corrente (10 minutos);
- Passagem dupla em água destilada (5 minutos cada);
- Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 10 volumes (duas trocas de 15 minutos cada);
- Lavagem em água corrente (5 minutos);
- Passagem dupla em água destilada (5 minutos cada);
- Duas passagens em solução TRIS-HCl Tween (Tris-hidroximetil-aminometano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) com pH de 7,4, por um tempo de 5 minutos cada passagem;
- Aplicação da UltraVision Protein Block (Thermo Scientific) durante 10 minutos;
- Duas passagens em solução TRIS-HCl Tween com pH de 7,4, por um tempo de 5 minutos cada uma;
- Incubação dos cortes com os anticorpos primários (Quadro 1);
- Duas passagens em solução TRIS-HCl Tween com pH de 7,4, por um tempo de 5 minutos cada uma;
- Incubação com os reagentes do sistema de visualização HiDef (HiDef Detection™ HRP Polymer System, Cell-Marque, CA, USA) através da aplicação do HiDef

Detection Amplifier por 15 minutos à temperatura ambiente; seguido de duas passagens de cinco minutos em solução em TRIS-HCl Tween com pH de 7,4 e da incubação com o HiDef Detection HRP Polymer Detector, por 15 minutos à temperatura ambiente;

- Posteriormente, para todas as lâminas preparadas, será realizada a revelação da reação com a solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (Dako Liquid DAB + Substrate Chromogen System, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) em câmara escura, por 5 minutos à temperatura ambiente;
- Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- Duas passagens em água destilada, por 5 minutos cada passagem;
- Contra coloração com Hematoxilina de Mayer por 5 minutos à temperatura ambiente;
- Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- Duas passagens em água destilada, por um tempo de 5 minutos cada uma;
- Desidratação em cadeia ascendente de etanóis à temperatura ambiente:
 - Álcool etílico 80° GL (2 minutos);
 - Álcool etílico 95° GL (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- Diafanização em três banhos de xilol:
 - Xilitol I (2 minutos);
 - Xilitol II (2 minutos);
 - Xilitol III (2 minutos);
- Montagem com Erv-Mount (Easy Path).

O controle positivo, para os anticorpos foi realizado com cortes de tecido tonsilar. O controle negativo foi realizado a partir da substituição dos anticorpos primários por albumina de soro bovino à 1% (BSA- Bovine Serum Albumin) em solução tampão.

4.8 Análise imunoistoquímica

Para o estudo imunoistoquímico, as lâminas preparadas foram escaneadas com auxílio do equipamento Scanner Aperio CS2 System (Leica Biosystems Imaging, IL, USA, 5780), em que foram avaliados os casos com coloração acastanhada nas células foliculares (BC/TH isoladas e associadas à BC), tumorais (AF/CPT e TH associada a CPT) com marcação

citoplasmática e/ou linfócitos imunomarcados no núcleo/citoplasma, independentemente da intensidade de marcação. A avaliação foi realizada por um observador previamente treinado, sendo os achados anotados em fichas de avaliação para posterior análise dos resultados obtidos.

De acordo com a adaptação do estudo de Kinoshita et al (2017), considerando a morfologia dos linfócitos, uma análise quantitativa das células imunomarcadas foi realizada em cinco campos escolhidos nas áreas com maior quantidade de linfócitos marcados positivamente, sob aumento de 400x, com o auxílio do imageJ (Image Processing and Analysis in Java, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Posteriormente, foi contado o número de linfócitos marcados positivamente. Para a avaliação das células foliculares e tumorais, de acordo com a metodologia adaptada do estudo Zake *et al* (2019), foi realizado uma análise semiquantitativa em toda extensão da lesão, sendo as lesões classificadas em três escores: escore 1 ($\leq 33\%$ das células positivas), escore 2 ($> 33\% - 66\%$ das células positivas) e escore 3 ($> 66\%$ das células positivas).

4.9 Análise estatística

Os resultados obtidos através da análise imunoistoquímica foram digitados em planilha eletrônica no software Microsoft Excel® (*Microsoft Corporation, USA*) e, posteriormente, transferidos para um banco de dados criado no *software Statistical Package for the Social Sciences* (versão 22.0, SPSS INC.; Chicago; IL; USA), no qual foram realizadas as análises estatísticas.

A estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. A partir da avaliação dos linfócitos, células foliculares e tumorais, os dados obtidos foram submetidos à análise de distribuição por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, que revelou ausência de distribuição normal. Desse modo, os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis (*KW*) e Mann-Whitney (*U*) foram aplicados para a comparação dos escores da imunoexpressão da IL-17 e IL-23 entre os grupos de lesões estudadas. Correlações entre a expressão das proteínas foram analisadas por meio do teste de correlação de Spearman (*r*). Em todos os testes estatísticos, o nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra

A amostra do presente estudo foi constituída de 15 casos de BC, 10 AFs, 30 CPTs, 15 tireoidites de Hashimoto (sendo 3 casos isoladas, 10 casos associada a CPT e 2 casos associada à BC). Com relação à variável gênero, o feminino foi predominante em todos os casos. A média de idade dos pacientes com CPT foi de 49,9, variando de 26 a 79 anos. Para os AFs, a média foi de 48,13 variando de 34 a 69 anos. Nos BCs, a média de idade foi de 42,84, a qual variou de 20 a 67 anos e nos THs a média foi de 43,77, variando de 17 a 70 anos. Quanto à localização anatômica, o lado direito se sobressaiu nos casos de CPTs e AFs, enquanto que nos BCs ocorreram mais bilateralmente associado ao istmo. As THs foram mais frequentes nos lados direito e esquerdo. O perfil clínico e epidemiológico referente a cada uma destas lesões encontra-se detalhado na Tabela 1.

Tabela 1 - Aspectos clínicos dos carcinomas papilíferos de tireoide, adenomas foliculares, bóciolos coloides e tireoidites de Hashimoto (isoladas e associadas a CPTs ou BCs). Natal-RN, 2020.

Características	Grupo			
	CPT	AF	BC	TH
Gênero				
Feminino	23 (76,7%)	8 (80,0%)	13 (76,7%)	14 (93,3%)
Masculino	7 (23,3%)	2 (20,0%)	2 (13,3%)	1 (6,7%)
Idade (anos)				
Média ± desvio padrão	49,9 ± 13,9	48,13 ± 11,89	42,87 ± 14,95	43,77 ± 14,75
Localização anatômica				
Direito	12 (41,4%)	4 (44,4%)	3 (20,0%)	6 (46,2%)
Esquerdo	8 (27,6%)	1 (11,1%)	2 (13,3%)	6 (46,2%)
Istmo	2 (6,9%)	2 (22,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Bilateral s/ istmo	5 (17,2%)	1 (11,1%)	2 (13,3%)	0 (0,0%)
Bilateral c/ istmo	1 (3,4%)	0 (0,0%)	8 (53,3%)	1 (7,7%)
Lado direito + istmo	1 (3,4%)	0(0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Lado esquerdo + istmo	0 (0,0%)	1 (11,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

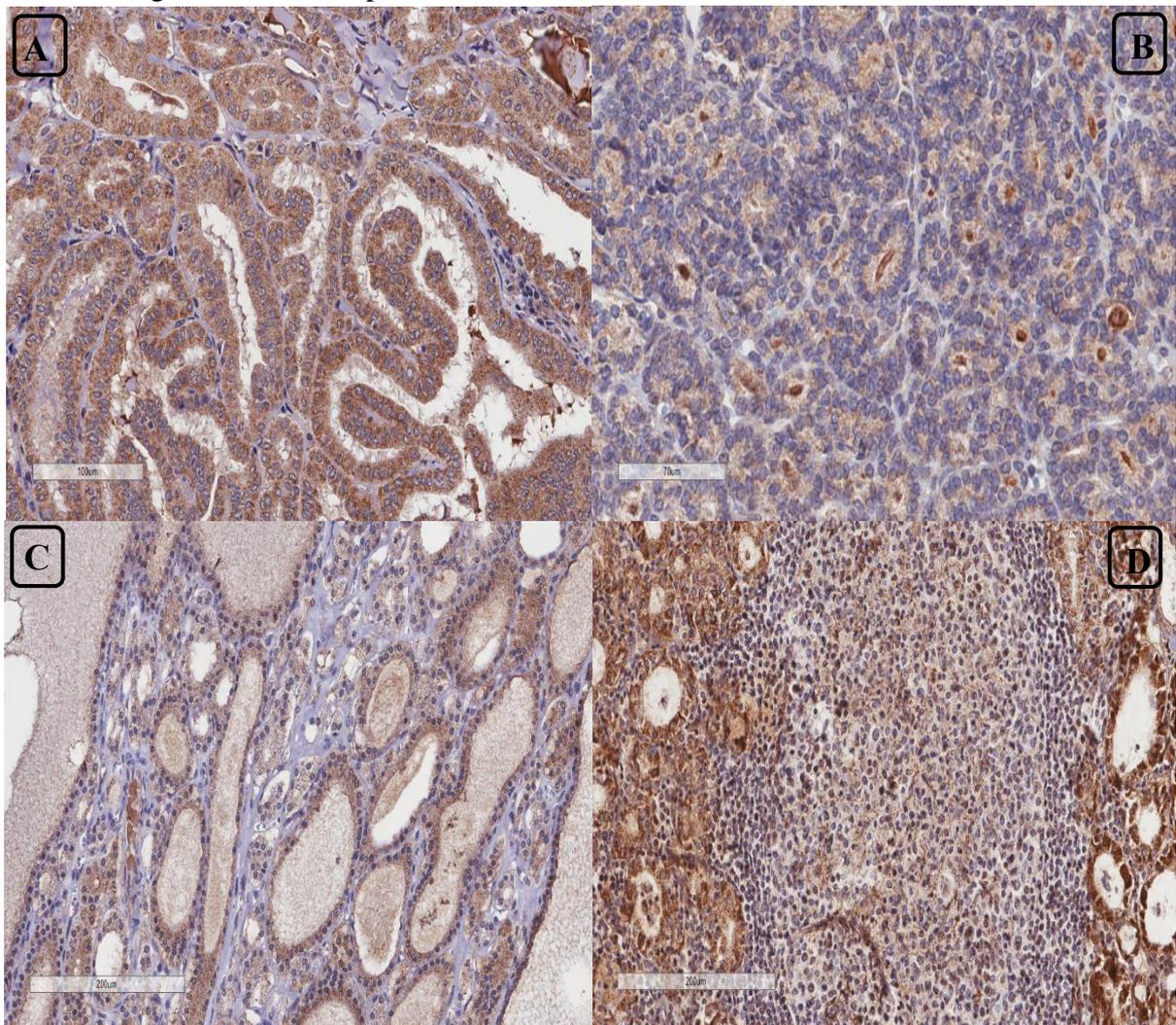
Fonte: Dados da pesquisa.

5.2 Análise imunoistoquímica

Na análise imunoistoquímica para IL-17, observou-se marcação positiva nas células foliculares (do BC/ TH isoladas e associadas à BC) e tumorais (AF, CPT e TH associada a CPT) em todos os casos do estudo (Figura 1). Quanto aos linfócitos não foi observada a imunomarcação em todos os casos (Figura 3).

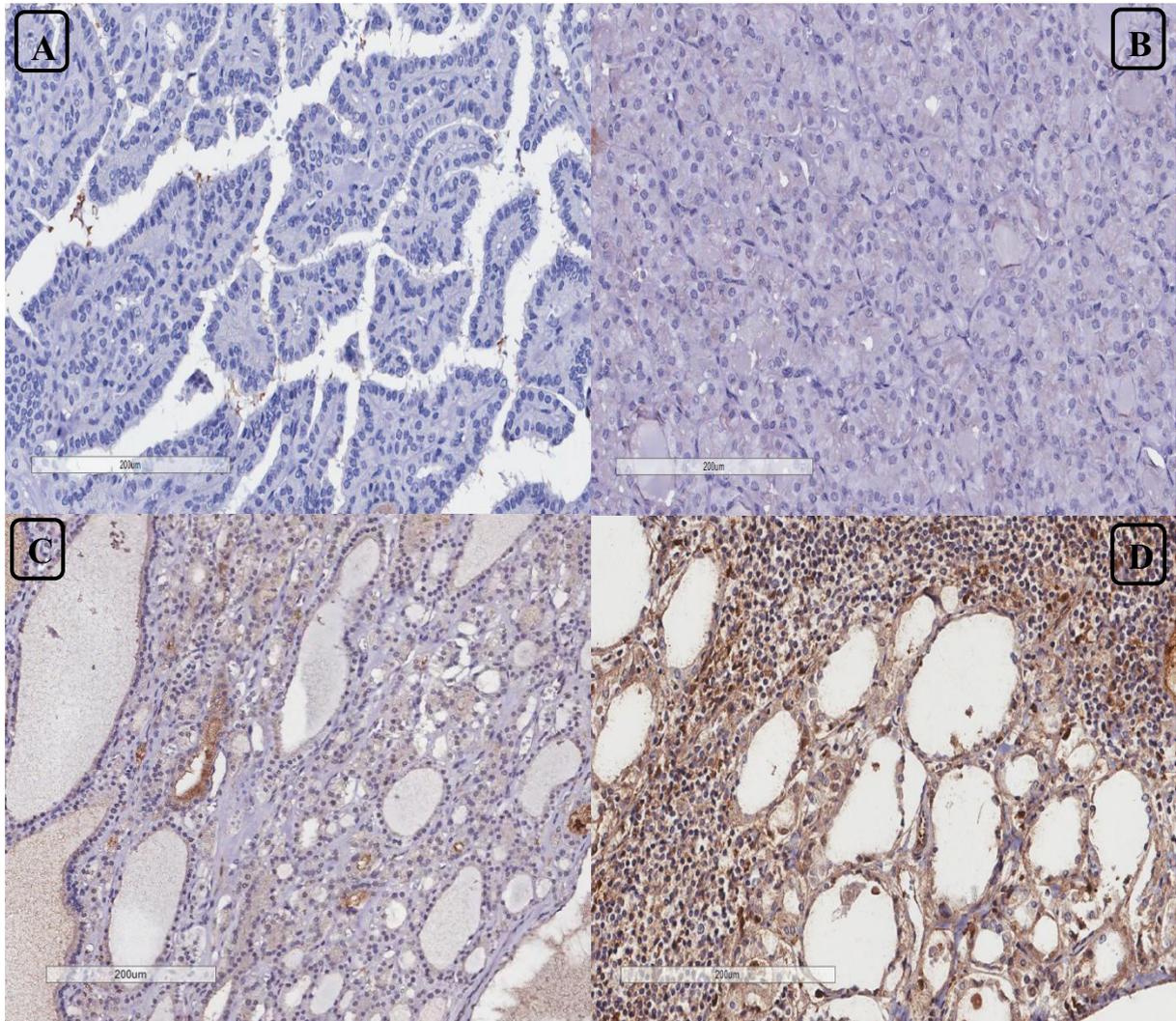
No que se refere a IL-23, nem todos casos apresentaram marcação positiva nas células foliculares, tumorais (Figura 2) e/ou de linfócitos (Figura 3). Em 1 caso de CPT não foi possível realizar a avaliação, pois o tecido foi perdido durante a técnica da imunoistoquímica, ficando assim, no total 29 casos de CPT avaliados.

Figura 1 - Imunoexpressão da IL-17 das células foliculares e tumorais nas lesões.



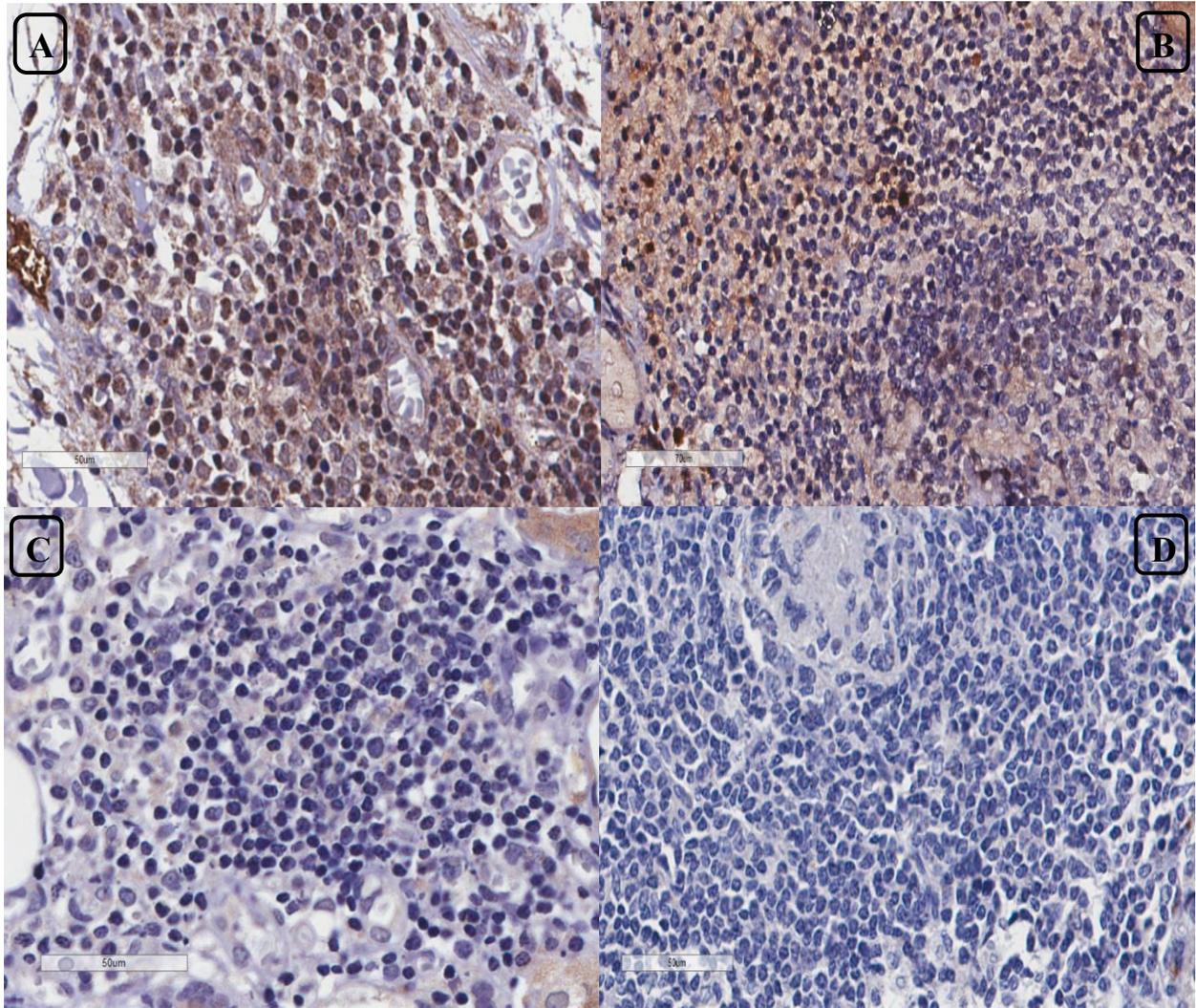
Legenda: A e B - Imunoexpressão citoplásmica nas células tumorais no carcinoma papilífero de tireoide (CPT) e no adenoma folicular (AF), respectivamente. C e D - Imunopositividade citoplasmática das células foliculares no bócio colóide (BC) e na tireoidite de Hashimoto (TH), respectivamente. (A - 100 µm, B - 70 µm, C - 200 µm, D - 300 µm).

Figura 2 - Imunoexpressão da IL-23 das células foliculares e tumorais nas lesões estudadas.



Legenda: A e B – Ausência de marcação nas células tumorais no carcinoma papilífero de tireoide (CPT) e no adenoma folicular (AF), respectivamente. C- Algumas células foliculares com marcação citoplasmática positiva no bócio coloide (BC). D- Imunopositividade citoplasmática nas células foliculares na Tireoidite de Hashimoto (TH). (A – 200 µm, B – 200 µm, C – 200 µm, D – 200 µm).

Figura 3 - Imunoexpressão da IL-17 e IL-23 nos linfócitos das lesões estudadas.



Legenda: A e B - Imunoexpressão núcleo/citoplasma nos linfócitos da IL-17 e IL-23, respectivamente. C e D - Ausência de marcação para IL-17 e IL-23, respectivamente. (A – 50 µm, B – 50µm, C – 50 µm, D – 50 µm).

5.2.1 Imunoexpressão da IL-17

5.2.1.1 Imunoexpressão da IL-17 nas células foliculares e tumorais

No que concerne à análise da imunoexpressão da IL-17 nas células foliculares e tumorais, o escore 3 foi mais frequente nas lesões de CPT ($n=17$; 56,6%), BC ($n=8$; 53,3%) e TH ($n=8$; 53,3%). No AF a maioria dos casos foram classificados com escore 1 ($n=5$; 50%) (Tabela 2). Para identificar as diferenças entre as lesões, o teste de Mann-Whitney não revelou resultados estatisticamente significativos (Tabela 3). Na análise em conjunto de todos os

grupos, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis revelou ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de lesões estudadas ($p=0,205$) (Tabela 4).

Em relação aos casos de CPT associados a TH, verificou-se os escores 2 e 3 em 80% dos casos ($n=8$). Nos casos de CPTs isolados, o percentual destes escores foi 89,9% ($n=27$).

Tabela 2 - Distribuição dos escores de imunexpressão para IL-17 nas células foliculares e tumorais. Natal - RN, 2020.

Lesão	Escore 1 n (%)	Escore 2 n (%)	Escore 3 n (%)
CPT	3 (10,1)	10 (33,3)	17 (56,6)
AF	5 (50,0)	2 (20,0)	3 (30,0)
BC	2 (3,40)	5 (33,3)	8 (53,3)
TH	4 (26,7)	3 (20,0)	8 (53,3)

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: CPT, carcinoma papilífero de tireoide; AF, adenoma folicular; BC, bócio colóide; TH, tireoidite de Hashimoto (isoladas e associadas a CPT ou a BC).

Tabela 3 - Análise da imunexpressão nas células foliculares e tumorais da IL-17 e suas diferenças em relação às lesões estudadas. Natal-RN, 2020.

Grupo	n	Mediana	$Q_{25}-Q_{75}$	Média dos postos	Soma dos postos	U	p^*
CPT	30	3,00	2,00 – 3,00	22,57	677,00	88,00	0,054
AF	10	1,50	1,00 – 3,00	14,30	143,00		
CPT	30	3,00	2,00 – 3,00	23,33	700,00	215,00	0,787
BC	15	3,00	2,00 – 3,00	22,33	335,00		
CPT	30	3,00	2,00 – 3,00	23,77	713,00	202,00	0,536
TH	15	3,00	1,00 – 3,00	21,47	322,00		
AF	10	1,50	1,00 – 3,00	10,20	102,00	47,00	0,129
BC	15	3,00	2,00 – 3,00	14,87	223,00		
AF	10	1,50	1,00 – 3,00	10,90	109,00	54,00	0,261
TH	15	3,00	1,00 – 3,00	14,40	216,00		
BC	15	3,00	2,00 – 3,00	15,97	239,50	105,00	0,775
TH	15	3,00	1,00 – 3,00	15,03	225,50		

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *Teste de Mann-Whitney. CPT, carcinoma papilífero de tireoide; AF, adenoma folicular; BC, bócio colóide; TH, tireoidite de Hashimoto (isoladas e associadas a CPT ou a BC).

Tabela 4 - Análise da imunexpressão nas células foliculares e tumorais da IL-17 nas lesões estudadas. Natal-RN, 2020.

Tipo de lesão	<i>n</i>	Mediana	$Q_{25}-Q_{75}$	Média dos postos	<i>KW</i>	<i>p</i> *
CPT	30	3,00	2,00–3,00	38,67	4,58	0,205
AF	10	1,50	1,00–3,00	24,40		
BC	15	3,00	2,00–3,00	37,17		
TH	15	3,00	1,00–3,00	34,90		

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *Teste de Kruskal-Wallis. CPT, carcinoma papilífero de tireoide; AF, adenoma folicular; BC, bócio colóide; TH, tireoidite de Hashimoto (isoladas e associadas a CPT ou a BC).

5.2.1.2 Imunexpressão da IL-17 em linfócitos

No que se refere a imunexpressão da IL-17 nos linfócitos, o teste de Mann-Whitney revelou que a imunexpressão nessas células foi significamente maior na TH em relação ao AF ($p=0,041$) e BC ($p=0,013$) (Tabela 5). Ao relacionar todos os grupos, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis revelou ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de lesões estudadas quanto nos linfócitos ($p=0,056$) (Tabela 6).

Em relação aos casos CPTs associados a THs, verificou-se uma média de 31,1 linfócitos marcados positivamente. Enquanto que nos CPTs isolados a média da imunopositividade dos linfócitos foi de 24,1.

Tabela 5 - Análise da imunexpressão da IL-17 em linfócitos e suas diferenças em relação às lesões estudadas. Natal-RN, 2020.

Grupo	<i>n</i>	Mediana	$Q_{25}-Q_{75}$	Média dos postos	Soma dos postos	<i>U</i>	<i>p</i> *
CPT	30	9,00	7,00 – 33,00	21,55	646,50	118,50	0,331
AF	10	11,50	2,50 – 19,50	17,35	173,50		
CPT	30	9,00	7,00 – 33,00	25,18	755,50	159,50	0,787
BC	15	6,00	3,00 – 12,00	18,63	279,50		
CPT	30	9,00	7,00 – 33,00	21,13	634,00	169,00	0,177
TH	15	24,00	8,00 – 39,00	26,73	401,00		
AF	10	11,50	2,50 – 19,50	13,15	131,50	73,50	0,935
BC	15	6,00	3,00 – 12,00	12,90	193,50		
AF	10	11,50	2,50 – 19,50	9,30	93,00	38,00	0,041
TH	15	24,00	8,00 – 39,00	15,47	232,00		
BC	15	6,00	3,00 – 12,00	11,53	173,00	53,00	0,013
TH	15	24,00	8,00 – 39,00	19,47	292,00		

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *Teste de Mann-Whitney. CPT, carcinoma papilífero de tireoide; AF, adenoma folicular; BC, bócio colóide; TH, tireoidite de Hashimoto (isoladas e associadas a CPT ou a BC)

Tabela 6 - Análise da imunexpressão da IL-17 em linfócitos, nas lesões estudadas. Natal-RN, 2020.

Tipo de lesão	N	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	KW	p*
CPT	30	9,00	7,00-33,00	36,87	7,55	0,056
AF	10	11,50	2,50-19,50	28,80		
BC	15	6,00	3,00-12,00	27,07		
TH	15	24,00	8,00-39,00	45,67		

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *Teste de Kruskal-Wallis. CPT, carcinoma papilífero de tireoide; AF, adenoma folicular; BC, bócio colóide; TH, tireoidite de Hashimoto (isoladas e associadas a CPT ou a BC).

5.2.2 Imunexpressão da IL-23

5.2.2.1 Imunexpressão da IL-23 nas células foliculares e tumorais

No que concerne à análise da imunexpressão da IL-23 para as células foliculares e tumorais, o escore 1 foi mais frequente nas lesões de CPT (n=27; 89,7%), AF (n=9; 90%), BC (n=7; 46,6%) e TH (n=7; 46,6%) (Figura 7). Com o intuito de identificar as diferenças entre as lesões, foi realizado o teste de Mann-Whitney, que demonstrou expressão significativamente maior no BC em comparação ao CPT ($p=0,002$), assim como na TH em relação ao CPT ($p=0,002$) (Tabela 8). Na análise em conjunto de todos os grupos, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de lesões estudadas ($p<0,002$) (Tabela 9).

Tabela 7 - Distribuição dos escores de imunexpressão para IL-23 nas células foliculares e tumorais. Natal - RN, 2020.

Lesão	Escore 1 n (%)	Escore 2 n (%)	Escore 3 n (%)
CPT	27 (89,7)	2 (6,90)	1 (3,40)
AF	9 (90,0)	1 (10,0)	0 (00,0)
BC	7 (46,6)	5 (33,3)	2 (13,3)
TH	7(46,6)	4 (26,7)	4 (26,7)

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: CPT, carcinoma papilífero de tireoide; AF, adenoma folicular; BC, bócio colóide; TH, tireoidite de Hashimoto (isoladas e associadas a CPT ou a BC).

Tabela 8 - Análise da imunexpressão nas células foliculares e tumorais da IL-23 e suas diferenças em relação às lesões estudadas. Natal-RN, 2020.

Grupo	<i>n</i>	Mediana	$Q_{25}-Q_{75}$	Média dos postos	Soma dos postos	<i>U</i>	<i>p</i> *
CPT	29	1,00	1,00 – 1,00	20,03	581,00	144,00	0,987
AF	10	1,00	1,00 – 1,00	19,90	199,00		
CPT	29	1,00	1,00 – 1,00	19,26	558,50	123,50	0,002
BC	15	2,00	1,00 – 2,00	28,77	431,50		
CPT	29	1,00	1,00 – 1,00	19,21	553,00	122,00	0,002
TH	15	2,00	1,00 – 3,00	28,87	433,00		
AF	10	1,00	1,00 – 1,00	9,60	96,00	41,00	0,062
BC	15	2,00	1,00 – 2,00	15,27	229,00		
AF	10	1,00	1,00 – 1,00	9,55	95,50	40,50	0,055
TH	15	2,00	1,00 – 3,00	15,30	229,50		
BC	15	2,00	1,00 – 2,00	15,23	228,50	108,50	0,870
TH	15	2,00	1,00 – 3,00	15,77	236,50		

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *Teste de Mann-Whitney. CPT, carcinoma papilífero de tireoide; AF, adenoma folicular; BC, bócio colóide; TH, tireoidite de Hashimoto (isoladas e associadas a CPT ou a BC).

Tabela 9 - Análise da imunexpressão nas células foliculares e tumorais da IL-23 nas lesões estudadas. Natal-RN, 2020.

Tipo de lesão	<i>N</i>	Mediana	$Q_{25}-Q_{75}$	Média dos postos	<i>KW</i>	<i>p</i> *
CPT	30	1,00	1,00–1,00	28,50	15,37	0,002
AF	10	1,00	1,00–1,00	28,05		
BC	15	2,00	1,00–2,00	43,27		
TH	15	2,00	1,00–3,00	43,93		

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *Teste de Kruskal-Wallis. CPT, carcinoma papilífero de tireoide; AF, adenoma folicular; BC, bócio colóide; TH, tireoidite de Hashimoto (isoladas e associadas a CPT ou a BC).

5.2.2.2 Imunexpressão da IL-23 em linfócitos

No que concerne aos linfócitos, com o intuito de identificar possíveis diferenças entre as lesões quanto à imunexpressão da IL-23, o teste de Mann-Whitney demonstrou expressão significativamente maior no TH em relação ao CPT ($p=0,001$), AF ($p=0,023$) e BC ($p=0,003$) (Tabela 10). Na análise em conjunto de todos os grupos, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de lesões estudadas ($p<0,005$) (Tabela 11).

Tabela 10 - Análise da imunexpressão da IL-23 em linfócitos e suas diferenças em relação às lesões estudadas. Natal-RN, 2020.

Grupo	<i>n</i>	Mediana	$Q_{25}-Q_{75}$	Média dos postos	Soma dos postos	<i>U</i>	<i>p</i> *
CPT	29	3,00	0,00 – 11,50	20,34	590,00	135,00	0,764
AF	10	2,50	0,00 – 12,50	19,00	190,00		
CPT	29	3,00	0,00 – 11,50	21,47	622,50	187,50	0,453
BC	15	5,00	3,00 – 12,00	24,50	367,50		
CPT	29	3,00	0,00 – 11,50	18,07	524,00	89,00	0,001
TH	15	16,00	8,00 – 28,00	31,07	433,00		
AF	10	2,50	0,00 – 12,50	12,15	121,50	66,50	0,643
BC	15	5,00	3,00 – 12,00	13,57	203,50		
AF	10	2,50	0,00 – 12,50	8,90	89,00	34,00	0,023
TH	15	16,00	8,00 – 28,00	15,73	236,00		
BC	15	5,00	3,00 – 12,00	10,83	162,50	42,50	0,003
TH	15	16,00	8,00 – 28,00	20,17	302,50		

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *Teste de Mann-Whitney. CPT, carcinoma papilífero de tireoide; AF, adenoma folicular; BC, bócio coloide; TH, tireoidite de Hashimoto (isoladas e associadas a CPT ou a BC).

Tabela 11 - Análise da imunexpressão da IL-23 em linfócitos, nas lesões estudadas. Natal-RN, 2020.

Tipo de lesão	<i>n</i>	Mediana	$Q_{25}-Q_{75}$	Média dos postos	<i>KW</i>	<i>p</i> *
CPT	30	3,00	0,00–11,50	29,88	12,64	0,005
AF	10	2,50	0,00–12,50	29,05		
BC	15	5,00	3,00–12,00	32,90		
TH	15	16,00	8,00–28,00	50,97		

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *Teste de Kruskal-Wallis. CPT, carcinoma papilífero de tireoide; AF, adenoma folicular; BC, bócio coloide; TH, tireoidite de Hashimoto (isoladas e associadas a CPT ou a BC).

5.2.3 Correlações entre a imunexpressão de IL-17 e IL-23

Na análise dos casos em conjunto de todos os grupos (CPT, AF, TH isoladas ou associadas a CPT ou BC), foi evidenciada uma fraca correlação positiva e estatisticamente significativa entre as células foliculares e tumorais com imunexpressão para IL-17 e IL-23 ($r=0,282$; $p=0,019$) e uma moderada correlação positiva e significativa entre as quantidades de linfócitos com imunexpressão de IL-17 e IL-23 ($r=0,557$; $p<0,001$) (Tabela 12).

Tabela 12 - Análise da correlação entre a imunexpressão de IL-17 e IL-23, em células foliculares, tumorais e linfócitos, em todos os casos estudados ($n=69$). Natal-RN, 2020.

Grupo		IL-23 (Cél. Fol. e tumorais)	IL-23 (Linfócitos)
IL-17 (Cél. Fol. e tumorais)	<i>r</i>	0,282	-
	<i>p</i> *	0,019	-
IL-17 (Linfócitos)	<i>r</i>	-	0,557
	<i>p</i> *	-	<0,001

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *Teste de Correlação de Spearman (*r*).

Na análise dos casos de CPTs, foi evidenciada uma fraca correlação positiva e estatisticamente significativa entre as quantidades de linfócitos com imunexpressão de IL-17 e IL-23 ($r=0,372$; $p=0,047$). No que se refere as células tumorais, o teste de Correlação de Spearman (*r*) demonstrou ausência de relações significativas entre as imunexpressões destas citocinas ($p>0,05$) (Tabela 13).

Tabela 13 - Análise da correlação entre a imunexpressão de IL-17 e IL-23, em células tumorais e linfócitos, nos casos de CPT ($n=29$). Natal-RN, 2020.

Grupo		IL-23 (Cél. tumorais)	IL-23 (Linfócitos)
IL-17 (Cél. tumorais)	<i>r</i>	-0,181	-
	<i>p</i> *	0,349	-
IL-17 (Linfócitos)	<i>r</i>	-	0,372
	<i>p</i> *	-	0,047

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *Teste de Correlação de Spearman (*r*).

Na análise dos AFs, as imunexpressões de IL-17 e IL-23, observou-se uma forte correlação positiva e estatisticamente significativa entre as quantidades de linfócitos imunopositivos para IL-17 e IL-23 ($r=0,787$; $p=0,007$). No que se refere as células tumorais epitelial, o teste de Correlação de Spearman (*r*) demonstrou ausência de relações significativas entre as imunexpressões destas citocinas ($p>0,05$) (Tabela 14).

Tabela 14 - Análise da correlação entre a imunexpressão de IL-17 e IL-23, em células tumorais e linfócitos, nos casos de AF ($n=10$). Natal-RN, 2020.

Grupo		IL-23 (Cél. tumorais)	IL-23 (Linfócitos)
IL-17 (Cél. tumorais)	r	0,441	-
	p^*	0,202	-
IL-17 (Linfócitos)	r	-	0,787
	p^*	-	0,007

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *Teste de Correlação de Spearman (r).

Na análise dos casos de BC, o teste de Correlação de Spearman (r) demonstrou ausência de relações significativas entre as imunexpressões das citocinas IL-17 e IL-23, tanto para as células foliculares como nos linfócitos ($p>0,05$) (Tabela 15).

Tabela 15 - Análise da correlação entre a imunexpressão de IL-17 e IL-23, em células foliculares e linfócitos, nos casos de BC ($n=15$). Natal-RN, 2020.

Grupo		IL-23 (Cél. foliculares)	IL-23 (Linfócitos)
IL-17 (Cél. foliculares)	r	0,454	-
	p^*	0,089	-
IL-17 (Linfócitos)	r	-	0,266
	p^*	-	0,337

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *Teste de Correlação de Spearman (r).

No grupo de TH, foi observada moderada correlação positiva estaticamente significativa tanto entre as imunexpressões de IL-17 e IL-23 nas células foliculares/tumorais ($r=0,539$; $p=0,038$), como entre a imunexpressão da IL-17 e IL-23 nos linfócitos ($r=0,522$; $p>0,046$) (Tabela 16).

Tabela 16 - Análise da correlação entre a imunexpressão de IL-17 e IL-23, em células foliculares/tumorais e linfócitos, nos casos de TH ($n=15$). Natal-RN, 2020.

Grupo		IL-23 (Cél. Foliculares/tumorais)	IL-23 (Linfócitos)
IL-17 (Cél. Foliculare/tumorais)	<i>r</i>	0,539	-
	<i>p</i> *	0,038	-
IL-17 (Linfócitos)	<i>r</i>	-	0,522
	<i>p</i> *	-	0,046

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *Teste de Correlação de Spearman (*r*).

6 DISCUSSÃO

A tireoide é uma glândula endócrina que pode ser afetada por diversas lesões, que incluem doenças reativas, autoimunes e neoplásicas (LIVOLSI; BALOCH, 2018), que podem levar a alterações do desenvolvimento glandular e/ou da síntese dos hormônios tireoidianos, resultando em prejuízos das funções da glândula (LEIDIG-BRUCKNER, 2019; LI *et al.*, 2019). Neste sentido, o presente estudo abordou o BC, TH, AF e CPT.

Pesquisas anteriores mostram que a resposta imunológica desempenha um importante papel no desenvolvimento de diversas doenças e está intimamente relacionada com a patogênese e progressão de doenças inflamatórias, autoimunes e neoplásicas (CUNHA *et al.*, 2012; LU; YUAN, 2015; MOULD *et al.*, 2017). As citocinas são moléculas efetoras desta resposta imunológica e representam um grupo de proteínas secretadas por várias células imunes e não imunes, sendo responsáveis por diversas funções, como o controle do crescimento, desenvolvimento e sobrevivência celular, além da ativação das funções efetoras das células imunes, como linfócitos e fagócitos (COOK *et al.*, 2018; O'SHEA; GADINA; SIEGEL, 2019).

A opção pelas citocinas IL-17 e a IL-23, deve-se ao fato destas serem amplamente associadas à resposta Th17. As células Th17, subgrupo da T CD4⁺, são as principais secretoras da IL-17, cuja ativação pode ser controlada pela IL-23, devido à influência desta citocina no processo de diferenciação, estabilização da proliferação celular, manutenção e resposta das células Th17 (ASADZADEH *et al.*, 2015; MARKS *et al.*, 2019). A IL-17 e a IL-23 vêm sendo avaliadas e algumas pesquisas têm demonstrado seus importantes papéis em várias doenças inflamatórias, autoimunes e neoplásicas da tireoide (LU; YUAN, 2015; NEURATH, 2019), onde verifica-se o aumento da expressão destas citocinas associadas à resposta Th17 (QIN *et al.*, 2012; RUGGERI *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2017; ZIVANCEVIC-SIMONOVIC *et al.*, 2019).

A imunoexpressão da IL-17 em BCs, AFs, CPTs e THs (isoladas e associadas a CPT ou BC), observado nos linfócitos, nas células foliculares e tumorais estão em consonância com o estudo de Carvalho *et al.* (2017), que demonstraram a imunomarcagem da IL-17 em CPTs, carcinomas medulares da tireoide (CMTs), carcinomas foliculares da tireoide (CFTs), AFs e BCs. De forma similar, a imunoexpressão desta citocina também foi evidenciada em BCs (ZAKE *et al.*, 2018; ZAKE *et al.*, 2019), THs e doença de Graves (DG) (QIN *et al.*, 2012; ZAKE *et al.*, 2018; ZAKE *et al.*, 2019). De acordo com a literatura, a IL-17 pode ser

produzida por células epiteliais, neutrófilos, células NK e linfócitos (T CD8⁺, T $\gamma\delta$ e Th17 principalmente), e reconhecida por vários tipos celulares que expressam o seu receptor, IL-17R, como osteoblastos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais (LI *et al.*, 2019; ZAKE *et al.*, 2019). Dessa forma, diante da diversidade de células que podem produzir e/ou reconhecer a IL-17, o presente estudo sugere que a secreção desta citocina pode estar sendo realizada pelos linfócitos T, assim como também pode estar sendo sintetizada e/ou reconhecida (através de receptores para esta proteína) pelas células foliculares e tumorais.

Neste estudo, observou-se que a maioria dos AFs apresentou menor porcentagem de células marcadas para IL-17, ao passo que a grande parte dos CPTs, BCs e THs (isoladas e associadas a CPTs ou BCs) revelou maior porcentagem de células marcadas. De forma semelhante, Carvalho *et al.* (2017) evidenciaram baixa expressão da IL-17 nas células foliculares e tumorais em lesões benignas de tireoide (BC e AF) quando comparadas às lesões malignas (CPT, CMT e CFT). A maior expressão da IL-17 também foi observada no estudo de Lu e Yuan (2015), os quais evidenciaram níveis séricos aumentados nas lesões malignas quando comparados aos adenomas. Além disto, evidências mostram que células produtoras de IL-17 estão frequentemente presentes em neoplasias malignas de diferentes sítios anatômicos, como próstata, fígado, mama, ovário, bem como na tireoide (JIANG *et al.*, 2015). Sendo assim, sugere-se que o aumento da expressão da IL-17 nos tumores pode indicar que esta citocina desencadeia a liberação de outras proteínas pró-inflamatórias como a IL-6, induzindo conseqüentemente a ativação dos fatores de transcrição STAT3 e NF- κ B que, por sua vez, estão associados à produção de mediadores inflamatórios em diversas neoplasias. Dessa forma, estes autores sugerem que a forte presença da IL-17 no microambiente tumoral é um indicativo que essa citocina atue na tumorigênese da tireoide (CARVALHO *et al.*, 2017).

Ao avaliarem as células Th17, Tc17 (células T CD8⁺ produtoras de IL-17) e a IL-17, Jiang *et al.* (2015) verificaram maiores concentrações sanguíneas de IL-17 e Th17 nos pacientes com tumores tireoidianos (adenomas e carcinomas da tireoide) quando comparados aos pacientes saudáveis. Adicionalmente, os autores sugeriram que ambas as células Th17 e Tc17 podem desempenhar um papel antitumoral, uma vez que foram correlacionadas negativamente com o tamanho dos tumores. No entanto, essa possível função destas células, pode não ser influenciada pela presença de IL-17, tendo em vista que não foi observada correlação desta citocina com o tamanho do tumor.

No presente trabalho, ao comparar a imunexpressão da IL-17 entre os grupos de lesões, observou-se que a imunomarcção nos linfócitos foi significativamente maior na THs em relação aos AFs e BCs. De forma semelhante, Li *et al.* (2013) detectaram que pacientes com TH exibiram níveis aumentados de IL-17 sérica quando comparados aos carcinomas de tireoide e ao BC. Assim como Qin *et al.* (2012), que observaram que maior frequência sérica da IL-17 nas TH em comparação à DG e tecido normal. A partir desses achados, os autores sugerem uma forte participação da referida citocina na patogênese das THs, por diferentes mecanismos (LI *et al.*, 2013; ZAKE *et al.*, 2018; ZAKE *et al.*, 2019). Segundo alguns autores, a influência da IL-17 nestas lesões pode ser explicada pelo estímulo desta citocina à liberação de mediadores pró-inflamatórios como quimiocinas, TNF- α , IL-1, IL-6 (RAMOS-LEVÍ; MARAZUELA, 2016), que levam a progressão da inflamação crônica, resultando por sua vez, na destruição da glândula tireoide e no desenvolvimento de tecido fibroso, através do estímulo dos fibrócitos, fibroblastos e miofibroblastos a produzirem colágeno (LI *et al.*, 2013; DEGERTEKIN *et al.*, 2016).

Analisando a imunexpressão da IL-17 nos CPTs isolados e CPTs associados a THs, verificou-se uma maior porcentagem de células tumorais positivas nos casos de CPTs isolados quando comparados aos associados a TH. Já em relação aos linfócitos, foi observado uma maior média de células positivas nos casos de CPTs associados a THs em comparação aos CPTs isolados. Em estudos prévios, os autores sugeriram que a associação de alguns carcinomas de tireoide com TH, pode predizer um melhor prognóstico para pacientes com carcinomas bem diferenciados da tireoide (CUNHA *et al.*, 2012; HAN *et al.*, 2019). Han *et al.* (2019) observaram maior imunomarcção da IL-17 nas células tumorais nos casos de THs associadas a CPTs comparado aos CPTs isolados e sugeriram que esse aumento da IL-17 ocorria devido a presença da TH. Além disso, estes autores, também observaram que os pacientes com alta expressão de IL-17 (casos de TH associada a CPT) tinham menos metástases linfonodais, indicando assim, sua possível função protetora no CPT. Semelhantemente, Cunha *et al.* (2012), constataram que os casos de carcinomas bem diferenciados (CPTs e carcinomas foliculares da tireoide) associado a THs apresentavam maior imunopositividade para várias células imunes em comparação a AF, BC e tecidos tireoidianos normais. Dentre estas células, estavam os linfócitos CD4⁺/IL-17 (Th17). Esses pesquisadores, observaram, ainda, que as células Th17 foram mais frequentes nos casos que não apresentavam invasão extratireoidiana, sugerindo, a partir disso, uma associação entre

as células Th17 e um melhor prognóstico dos pacientes com carcinoma bem diferenciado, possivelmente pela atividade antitumoral.

No que se refere à IL-23, sabe-se que essa citocina é produzida por diversas células imunes, entre elas linfócitos T, macrófagos e células dendríticas (LIU *et al.*, 2019; NEURATH, 2019) e reconhecida por diferentes tipos celulares que possuem receptor para IL-23 (IL-23R) (LI *et al.*, 2013), tais como neutrófilos, células NK e principalmente as células T de memória. Nas células T CD4+, a IL-23 ao se ligar ao seu receptor, induz a ativação do STAT3, e, por conseguinte, do ROR γ T, estimulando, assim, a conversão dos linfócitos T de memória no subgrupo Th17 e a sua produção de citocinas (PENG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2018; NEURATH, 2019). Pesquisas demonstram que a IL-23 promove a secreção de vários agentes inflamatórios, como IL-17 e IL-22, por diferentes células, como linfócitos T (CD4, CD8, $\gamma\delta$ T) (MEI *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2019). Estudos anteriores têm mostrado uma associação da IL-23 com o desenvolvimento de diversas doenças, em diferentes sítios anatômicos, como na tireoide, em que tem sido associada a algumas lesões, incluindo os carcinomas da tireoide e doenças autoimunes, como a tireoidite de Hashimoto (LI *et al.*, 2013; MEI *et al.*, 2015).

Na presente pesquisa, observou-se que a IL-23 também foi expressa tanto nas células foliculares e tumorais, como nos linfócitos, em consonância com os achados de estudos prévios (CARVALHO *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2018; ZAKE *et al.*, 2019). Porém, verificou-se baixa porcentagem de células positivas para esta citocina em todos os grupos de lesões estudadas (CPT, AF, BC e TH). Sendo assim, é possível sugerir que as células foliculares e tumorais parecem não secretar a IL-23 em altos níveis, contudo, a imunopositividade da IL-23 proveniente destes tipos celulares pode contribuir para a diferenciação de células T, bem como na liberação de diferentes citocinas inflamatórias que levam a destruição da glândula tireoide (PENG *et al.*, 2015).

Ao comparar os grupos de lesões, este estudo evidenciou maior expressão de IL-23 pelas células foliculares e tumorais nas THs em relação aos CPTs, e pelos linfócitos nas THs em comparação às demais lesões estudadas (CPTs, AFs e BCs). De forma similar com esses resultados, Zake *et al.* (2019) reportaram maior expressão da IL-23 em THs quando comparadas a BCs, nas células foliculares. Semelhantemente, Qin *et al.* (2012) e Ruggieri *et al.* (2014), verificaram níveis séricos elevados de IL-23 nos pacientes com THs quando comparado aos pacientes saudáveis, demonstrando, portanto, dados fortemente sugestivos da contribuição da IL-23 na patogênese das THs. Confirmando essa forte participação da IL-23, no estudo de Peng *et al.* (2015) e Zheng *et al.* (2018), avaliando a presença de IL-23R, observaram maior

expressão gênica deste receptor nas THs em relação aos BCs. Dessa forma, os autores sugerem que a IL-23 influencia na patogênese das THs por diferentes formas, como através da indução de fatores angiogênicos. Estudos anteriores têm mostrado que nestes casos, através do TSH, as células foliculares são estimuladas a expressarem maiores concentrações de VEGF, que induz a angiogênese, logo, também o aumentando a vascularização da glândula tireoide e fluxo sanguíneo (FARHANGI; TAJMIRI, 2018).

Além disso, estudos mostram uma forte correlação entre a expressão da IL-23 com espécies reativas de oxigênio (EROs) (ZHENG *et al.*, 2018). De acordo com a literatura, uma quantidade adequada de EROs na glândula tireoide é necessária para a síntese de hormônios tireoidianos. No entanto, em situações de estresse oxidativo, quantidades excessivas de EROs são liberadas a partir do estímulo por fatores de crescimento e citocinas, causando assim, danos nas células foliculares, resultando no desenvolvimento de doenças autoimunes, como a TH (FORTUNATO *et al.*, 2013). Essa correlação da IL-23 com EROs foi observada no trabalho de Zheng *et al.* (2018), que evidenciaram que o aumento excessivo de EROs nos tireócitos foi induzido pela IL-23, indicando assim, a sua atuação no processo patogênico da TH. A partir disso, este estudo sugere que a IL-23 pode influenciar o desenvolvimento das THs a partir de uma ação conjunta de diferentes eventos que são estimulados na glândula tireoide, levando a sua destruição gradativa.

Considerando as fracas correlações estatisticamente significativas no conjunto de todas as lesões, entre as expressões da IL-17 e IL-23 nas células foliculares/tumorais, e significativamente moderadas nos linfócitos, pode-se sugerir, a partir disso, que nos linfócitos uma proteína pode estar influenciando na produção da outra.

Na avaliação por grupo, nos casos dos AFs, apesar da significativa forte correlação apresentada entre as citocinas estudadas nos linfócitos, tais resultados podem representar viés do estudo porque ambos os marcadores tiveram baixa expressão nestas lesões. Em relação as THs foram verificadas moderadas correlações significativas entre a expressão da IL-17/IL-23 tanto nas células foliculares/tumorais, como nos linfócitos. De forma semelhante, Zake *et al.* (2019) observaram correlações positivas entre IL-17 e IL-23, bem como entre expressão de IL-17 e IL-1 β nas células foliculares e linfócitos nos pacientes com TH. A partir desses achados, estes autores apoiaram a ideia de que a IL-23 estimula as células Th17 a expressarem maiores quantidades de IL-17, influenciando posteriormente no desenvolvimento da TH. Corroborando os achados anteriormente descritos, a hipótese da atuação da Th17 através do eixo IL-23/IL-17,

também foi proposta por Takatori et al. (2008), Qin *et al.* (2012), Ruggieri *et al.* (2014) e Zhang *et al.* (2018).

Diferentemente ao encontrado nesse estudo nos casos de CPTs, Hu et al. (2017) evidenciaram alta expressão gênica para IL-23 nestas lesões em comparação com a BCs e aos tecidos perineoplásicos da tireoide. Essa imunopositividade foi observada principalmente nas lesões que apresentavam estágio clínico avançado e metástase a distância. Estes pesquisadores, avaliando, ainda, a IL-23 com algumas características clínicas dos CPTs, observaram associação desta citocina com um pior prognóstico, já que correlacionou-se com bilateralidade, metástase linfonodal local e a distância e com o quadro clínico nos estágios avançados III/IV. De forma semelhante, Carvalho et al. (2017) observaram maior expressão de IL-23 nas células neoplásicas (CPTs, carcinomas foliculares da tireoide, carcinomas medulares da tireoide e AFs), quando comparado aos BCs, resultados estes que foram semelhantes para IL-17 no mesmo estudo, o qual sugeriram, a partir disso, a atuação da resposta Th17 nessas lesões. Além disso, os autores também indicaram uma associação das células Th17 com o pior prognóstico, pois verificaram alta expressão de IL-17 nos pacientes que apresentaram recidivas ou vieram a óbito.

Diante do que foi pesquisado, pode-se enfatizar que os papéis da IL-17 e IL-23 sobre as lesões estudadas, ainda não estão bem estabelecidos. Embora a imunoexpressão destas citocinas sejam documentadas na literatura nestas lesões, os mecanismos específicos pelos quais elas atuam precisam ser melhor esclarecidos. Assim, estudos moleculares envolvendo citocinas correlacionadas a estas, são necessários a fim de elucidar estes eventos.

7 CONCLUSÕES

- A imunoexpressão da IL-17 e IL-23 apresentada tanto nas células foliculares/tumorais e linfócitos em todos os grupos estudados (CPTs, AFs, BCs e THs), sugere que estas citocinas podem atuar na patogênese destas lesões.
- A marcante expressão da IL-17 pelas células tumorais nos CPTs, sugere que esta citocina pode influenciar na tumorigênese dessas lesões e a menor expressão da IL-23 reforça a tese de que esta citocina atue na manutenção do fenótipo de resposta TH17 descrito na literatura para estas lesões.
- A significativa imunomarcção da IL-17 nos linfócitos e da IL-23 nas células foliculares/tumorais e nos linfócitos nas THs corrobora o reconhecido papel da resposta Th17 em doenças autoimunes.

REFERÊNCIAS

- ACQUAVIVA, G. *et al.* Molecular pathology of thyroid tumours of follicular cells: a review of genetic alterations and their clinicopathological relevance. **Histopathology**, Oxford, v. 72, n. 1, p. 6–31, 2018.
- AL KHADER, A. *et al.* Mature bony metaplasia in multinodular goiter: A case report. **International Journal of Surgery Case Reports**, Amsterdam, v. 60, p. 1–3, 2019.
- ARAP, S. S. *et al.* Bócio atóxico: diagnóstico e tratamento. *In*: JATENE, F. B.; NOBRE, M. R. C.; BERNARDO, W. M. (Coords). **Projeto diretrizes**. São Paulo: AMB/CFM, 2006. p. 35-50.
- ASA, S. L. The current histologic classification of thyroid cancer. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, Philadelphia, v. 48, n. 1, p. 1-22, 2019.
- ASADZADEH, Z. *et al.* The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. **Cellular immunology**, New York, v. 322, p. 15-25, 2017.
- BERNARDINI, N. *et al.* IL-17 and its role in inflammatory, autoimmune, and oncological skin diseases: state of art. **International journal of dermatology**, Philadelphia, p. 1-6, 2019.
- BONGIOVANNI, M. *et al.* The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: A meta-analysis. **Acta Cytologica**, Chicago, v. 56, n. 4, p. 333-339, 2012.
- BORRELLI, N. *et al.* Characterization of Activating Mutations of the MEK1 Gene in Papillary Thyroid Carcinomas. **Thyroid : official journal of the American Thyroid Association**, New York, v. 29, n. 9, p. 1279–1285, 2019.
- BUONCERVELLO, M.; GABRIELE, L.; TOSCHI, E. The Janus Face of Tumor Microenvironment Targeted by Immunotherapy. **International journal of molecular sciences**, Basel, v. 20, n. 17, p. 4320, 2019.
- CARVALHO, D. F. G. *et al.* High IL-17 expression is associated with an unfavorable prognosis in thyroid cancer. **Oncology letters**, Athens, v. 13, n. 3, p. 1925–1931, 2017.
- CATUREGLI, P.; DE REMIGIS, A.; ROSE, N. R. Hashimoto thyroiditis: Clinical and diagnostic criteria. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, v. 13, n. 4-5, p. 391-397, 2014.
- CAUGHNOR, B.; YANG, Y.; YOUNG, M. R. I. Role of IL-23 signaling in the progression of premalignant oral lesions to cancer. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 4, 2018.
- CHEN, C. L. *et al.* IL-17 induces antitumor immunity by promoting beneficial neutrophil recruitment and activation in esophageal squamous cell carcinoma. **Oncoimmunology**, Austin, v. 7, n. 1, p. e1373234, 2018.
- CHENG, C. W. *et al.* Synchronized expressions of serum osteopontin and B cell-activating factor in autoimmune thyroid disease. **European journal of clinical investigation**, Berlin, v. 49, n. 7, p. e13122, 2019.

CIBAS, E. S.; ALI, S. The 2017 Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. **Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association**, New York, v. 27, n. 11, p.1341-1346, 2017.

CITTERIO, C. E.; TARGOVNIK, H. M.; ARVAN, P. The role of thyroglobulin in thyroid hormonogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, London, v. 15, n. 6, p. 323-338, 2019.

COOK, A. D. *et al.* Immune cytokines and their receptors in inflammatory pain. **Trends in immunology**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 240-255, 2018.

CRAMON, P. *et al.* Quality-of-Life Impairments Persist Six Months after Treatment of Graves' Hyperthyroidism and Toxic Nodular Goiter: A Prospective Cohort Study. **Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association**, New York, v. 26, n. 8, p. 1010–1018, 2016.

CUNHA, L. L. *et al.* Infiltration of a mixture of immune cells may be related to good prognosis in patients with differentiated thyroid carcinoma. **Clinical endocrinology**, Oxford, v. 77, n. 6, p. 918–925, 2012.

CYRANSKA-CHYREK, E. *et al.* Severe unilateral orbitopathy in a patient with Hashimoto's thyroiditis - A case report. **BMC Ophthalmology**, London, v. 19, n. 1, 2019.

DAROUASSI, Y. *et al.* Surgical management of hyperthyroidism: About 60 cases. **Pan African Medical Journal**, Kampala, v. 31, p. 43, 2018.

DELLAL, F. D. *et al.* Clinicopathological features of thyroid cancer in the elderly compared to younger counterparts: single-center experience. **Journal of endocrinological investigation**, Milano, v. 40, n. 5, p. 471–479, 2017.

DEGERTEKIN, C. K. *et al.* Circulating Th17 cytokine levels are altered in Hashimoto's thyroiditis. **Cytokine**, Philadelphia, v. 80, p. 13-17, 2016.

DELSHAD, H.; AZIZI, F. Review of Iodine Nutrition in Iranian Population in the Past Quarter of Century. **International journal of endocrinology and metabolism**, Tehran, v. 15, n. 4, p. e57758, 2017.

DUAN, Z. *et al.* Th17 cells promote tumor growth in an immunocompetent orthotopic mouse model of prostate cancer. **American journal of clinical and experimental urology**, Madison, v. 7, n. 4, p. 249–261, 2019.

FARHANGI, M. A.; TAJMIRI, S. The correlation between inflammatory and metabolic parameters with thyroid function in patients with Hashimoto's thyroiditis: The potential role of interleukin 23 (il-23) and vascular endothelial growth factor (VEGF)–1. **Acta Endocrinologica**. Bucharest, v. 14, n. 2, p. 163, 2018.

FAREBROTHER, J.; ZIMMERMANN, M. B.; ANDERSSON, M. Excess iodine intake: sources, assessment, and effects on thyroid function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1446, n. 1, p. 44–65, 2019.

FENG, S.; CHEN, X.M.; WANG, J.F.; XU, X.Q. Th17 cells associated cytokines and cancer. **European Review Medical Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 19, p. 4032-4040, 2016.

FORTUNATO, R. S. *et al.* Sexual dimorphism of thyroid reactive oxygen species production due to higher NADPH oxidase 4 expression in female thyroid glands. **Thyroid**, New York, v. 23, n. 1, p. 111-119, 2013.

FURMAN, D.; DAVIS, M. M. New approaches to understanding the immune response to vaccination and infection. **Vaccine**, Guildford, v. 33, n. 40, p. 5271–5281, 2015.

GEBREYOHANNES, E. A. *et al.* Normalization of thyroid function tests among thyrotoxicosis patients attending a University Hospital in North-West Ethiopia. **Thyroid Research**, London, v. 12, n. 1, 2019.

GNEPP, D. R. **Diagnostic Surgical Pathology of the Head and Neck E-Book**. 2. ed. New York: Elsevier Health Sciences, 2009. 1224 p.

GONZÁLEZ-AMARO, R.; MARAZUELA, M. T regulatory (Treg) and T helper 17 (Th17) lymphocytes in thyroid autoimmunity. **Endocrine**, Houndsmills, v. 52, n. 1, p. 30-38, 2016.

GUÉRY, L.; HUGUES, S. Th17 cell plasticity and functions in cancer immunity. **BioMed research international**, New York, v. 2015, ID 314620, p. 1-11, 2015.

GUO, Z. *et al.* Recent Advances in the Classification of Low-grade Papillary-like Thyroid Neoplasms and Aggressive Papillary Thyroid Carcinomas: Evolution of Diagnostic Criteria. **Advances in anatomic pathology**, New York, v. 25, n. 4, p. 263–272, 2018.

GUYTON, A. C; HALL, J. E. **Tratado de Fisiología Médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. 1145 p.

HAN, L. T. *et al.* IL-17A increases MHC class I expression and promotes T cell activation in papillary thyroid cancer patients with coexistent Hashimoto's thyroiditis. **Diagnostic pathology**, London, v. 14, n. 52, p. 1-10, 2019.

HUANG, M. *et al.* Relevance and clinicopathologic relationship of BRAF V600E, TERT and NRAS mutations for papillary thyroid carcinoma patients in Northwest China. **Diagnostic pathology**, London, v. 14, n. 74, p. 1-10, 2019.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature immunology**, New York, v. 16, n. 4, p. 343-353, 2015.

JIANG, G. *et al.* The prevalence and distribution of Th17 and Tc17 cells in patients with thyroid tumor. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 162, n. 1, p. 68–73, 2015.

KADDIS, A.; TELLEZ, T. Thyrotoxicosis: an unusual cause of syncope. **American Journal of Emergency Medicine**, Philadelphia, v. 37, n. 4, p. 797.e5-797.e6, 2019.

KESICI, U.; KESICI, S. Agenesis of the isthmus of the thyroid gland. **Turkish Journal of Surgery**, Çayyolu, v. 34, n. 1, p. 60–61, 2018.

KRYSIAK, R.; KOWALCZE, K.; OKOPIEN, B. Sexual function and depressive symptoms in young women with overt hyperthyroidism. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 234, p. 43–48, 2019.

KUMAR, V. *et al.* **Robbins: Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 910 p.

KURE, S.; WADA, R.; NAITO, Z. Relationship between genetic alterations and clinicopathological characteristics of papillary thyroid carcinoma. **Medical molecular morphology**, Tokyo, v. 52, n. 4, p.181-186, 2019.

LAM, A. Pathology of Endocrine Tumors Update: World Health Organization New Classification 2017—Other Thyroid Tumors. **AJSP: Reviews & Reports**, v. 22, n. 4, p. 209, 2017.

LEIDIG-BRUCKNER, G. Iodinated contrast medium in patients with thyroid disorders. **Der Radiologe**, Berlin, v. 59, n. 5, p. 413-424, 2019.

LI, A. A. *et al.* Practical considerations for developmental thyroid toxicity assessments: What's working, what's not, and how can we do better? **Regulatory toxicology and pharmacology** : RTP, New York, v. 106, p. 111–136, 2019.

LI, D. *et al.* Th17 cell plays a role in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis in patients. **Clinical immunology**, Orlando, v. 149, n. 3, p. 411-420, 2013.

LIN, Y. S. *et al.* Patient outcomes following surgical management of multinodular goiter: Does multinodularity increase the risk of thyroid malignancy? **Medicine**, Baltimore, v. 95, n. 28, p. e4194, 2016.

LIU, C. *et al.* Analysis of Treg/Th17 cells in patients with tongue squamous cell carcinoma. **Experimental and therapeutic medicine**, Athens, v. 18, n. 3, p. 2187-2193, 2019.

LIVOLSI, V. A.; BALOCH, Z. W. The Pathology of Hyperthyroidism. **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne, v. 9, p.737, 2018.

LLOYD, R. V. *et al.* **WHO classification of tumours of endocrine organs**. International agency for research on cancer (IARC). 4. ed. França: Lyon, 2017. 355 p.

LÖF, C. *et al.* Genetically modified mouse models to investigate thyroid development, function and growth. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 241-256, 2018.

LU, Y.; YUAN, Y. Serum level of interleukin-17 and interleukin-35 as a biomarker for diagnosis of thyroid cancer. **Journal of cancer research and therapeutics**, Mumba, v. 11, n. 6, p. 209-211, 2015. Suplemento 2.

MARKS, B. R. *et al.* Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation. **Nature immunology**, New York, v. 10, n. 10, p. 1125–1132, 2009.

- MARSHALL, J. S. *et al.* An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, Hamilton, v. 14, n. 49, p. 1-10, 2018. Supl. 2
- MARTINEZ, G. J. *et al.* Regulation and function of proinflammatory TH17 cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1143, p. 188, 2008.
- MEI, Z. *et al.* Interleukin-23 facilitates thyroid cancer cell migration and invasion by inhibiting SOCS4 expression via MicroRNA-25. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 10, p. 1-16, 2015.
- MEYER, E. S.; MAIA, A. L. Aspectos patogênicos e clínicos do bócio multinodular. **Revista do Hospital de Clínicas e da Faculdade de Medicina**, Porto Alegre, v. 29, n. 3, p. 246–254, 2009.
- MIDGLEY, J. E. M. *et al.* Time for a reassessment of the treatment of hypothyroidism. **BMC Endocrine Disorders**, London v. 19, n. 37, p. 1-8, 2019.
- MOULD, R. C. *et al.* Immune responses in the thyroid cancer microenvironment: making immunotherapy a possible mission. **Endocrine-Related Cancer**, Woodlands v. 24, n. 12, p. T311-T329, 2017.
- MUKTAR, M. *et al.* Goiter and its associated factors among primary school children aged 6-12 years in Anchar district, Eastern Ethiopia. **PLoS ONE**, San Francisco v. 14, n. 4, p. e0214927, 2019.
- NAGAYAMA, Y.; MISHIMA, H. Heterogenous nature of gene expression patterns in BRAF-like papillary thyroid carcinomas with BRAF V600E. **Endocrine**, Totowa, v. 66, n. 3, p. 607-613, 2019.
- NEURATH, M. F. IL-23 in inflammatory bowel diseases and colon cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, Oxford, v. 45, p. 1-8, 2019.
- NIKIFOROV, Y. E. *et al.* Nomenclature revision for encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a paradigm shift to reduce overtreatment of indolent tumors. **Jama Oncology**, Chicago v. 2, n. 8, p. 1023-1029, 2016.
- O'SHEA, J. J.; GADINA, M.; SIEGEL, R. M. Cytokines and cytokine receptors. *In*: RICH, R. R. *et al.* (eds.). **Clinical immunology: Principles and Practice**. 4.Th. London: Elsevier, 2019. cap. 9, p. 127-155.
- PAKETÇI, A. *et al.* Graves' disease following allogenic hematopoietic stem cell transplantation for severe aplastic anemia: Case report and literature review. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, London, v. 31, n. 5, p. 589–593, 2018.
- PENG, G. L. *et al.* CD8+ cytotoxic and FoxP3+ regulatory T lymphocytes serve as prognostic factors in breast cancer. **American journal of translational research**, Madison, v. 11, n. 8, p. 5039, 2019.
- PENNA, G. C. *et al.* Molecular markers involved in tumorigenesis of thyroid carcinoma: focus on aggressive histotypes. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 150, n. 3–4, p. 194–207, 2016.

PYZIK, A. *et al.* Immune disorders in Hashimoto's thyroiditis: what do we know so far? **Journal of Immunology Research**, Cairo, v. 2015, ID 979167, p. 1-8, 2015.

RAMOS-LEVÍ, A. M.; MARAZUELA, M. Pathogenesis of thyroid autoimmune disease: the role of cellular mechanisms. **Endocrinología y Nutrición**, Barcelona v. 63, n. 8, p. 421-429, 2016.

QIN, Q. *et al.* The increased but non-predominant expression of Th17-and Th1-specific cytokines in Hashimoto's thyroiditis but not in Graves' disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeiro Preto, v. 45, n. 12, p. 1202-1208, 2012.

QIU, R.; WANG, Y. Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor γ (ROR γ) Agonists as Potential Small Molecule Therapeutics for Cancer Immunotherapy: Miniperspective. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington v. 61, n. 14, p. 5794-5804, 2018.

RIERA ROMO, M.; PÉREZ-MARTÍNEZ, D.; CASTILLO FERRER, C. Innate immunity in vertebrates: An overview. **Immunology**, Oxford v. 148, n. 2, p. 125–139, 2016.

RIESTRA FERNÁNDEZ, M. *et al.* Iodine nutritional status in Asturian schoolchildren. **Endocrinología, Diabetes y Nutrición**, Barcelona, v. 64, n. 9, p. 491–497, 2017.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W.; BARNASH, T. A. **Atlas de histología descriptiva**. Porto Alegre: Saraiva, 2012.

RUGGERI, R. M. *et al.* Serum interleukin-23 (IL-23) is increased in Hashimoto's thyroiditis. **Endocrine journal**, Tokyo, v.61, n. 4, p. 259-261, 2014.

RYDZEWSKA, M. *et al.* Role of the T and B lymphocytes in pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. **Thyroid research**, London, v. 11, n.1, p. 2, 2018.

SANTANA, N. O. *et al.* Diagnostic performance of thyroid ultrasound in Hürthle cell carcinomas. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, São Paulo, v. 63, p. 3, p. 300-305, 2019.

SARFATI-LEBRETON, M. *et al.* Does hemithyroidectomy still provide any benefit? **Annales d'Endocrinologie**, Paris, v. 80, n. 2, p. 101–109, 2019.

SHAO, S.; YU, X.; SHEN, L. Autoimmune thyroid diseases and Th17/Treg lymphocytes. **Life Sciences**, Oxford, v. 192, p.160-165, 2018

SHARMA, A.; STAN, M. N. Thyrotoxicosis: Diagnosis and Management. **Mayo Clinic Proceedings**, Rochester, v. 94, n. 6, p. 1048-1068, 2019.

SONG, L. *et al.* Long-term prognostic significance of interleukin-17-producing T cells in patients with non-small cell lung cancer. **Cancer science**, v. 110, n. 7, p. 2100- 2109, 2019.

SOKOŁOWSKA, J. *et al.* Immunohistochemical characteristic of C cells in European bison thyroid gland. **Folia Histochemica Cytobiologica**, Warszawa v. 56, n. 4, p. 222-230, 2018.

SPANGLER, J. B. *et al.* Insights into Cytokine–Receptor Interactions from Cytokine Engineering. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 33, n. 1, p. 139–167, 2015.

STEPIEN, B. K.; HUTTNER, W. B. Transport, metabolism, and function of thyroid hormones in the developing mammalian brain. **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne v. 10, p. 209, 2019.

TAKATORI, H. *et al.* New complexities in helper T cell fate determination and the implications for autoimmune diseases. **Modern rheumatology**, Tokyo, v. 18, n. 6, p. 533-541, 2008.

TSATSOUKLIS, A. The Role of Insulin Resistance/Hyperinsulinism on the Rising Trend of Thyroid and Adrenal Nodular Disease in the Current Environment. **Journal of Clinical Medicine**, Basel, v. 7, n. 3, p. 37, 2018.

VALVO, V.; NUCERA, C. Coding Molecular Determinants of Thyroid Cancer Development and Progression. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, Philadelphia, v. 48, n. 1, p. 37–59, 2019.

VITALE-NOYOLA, M. *et al.* Pathogenic Th17 and Th22 cells are increased in patients with autoimmune thyroid disorders. **Endocrine**, Houndsmills, v. 57, n. 3, p. 409–417, 2017.

YANG, M. L.; LU, B. Treatment of Goiter with Traditional Chinese Medicine Regimen Xing Qi Hua Ying Tang: A Clinical Study on 72 Patients with Multinodular and Diffuse Goiter. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, New York, v. 24, n. 4, p. 374–377, 2018.

ZABLOTSKA, L. B. *et al.* Risk of thyroid follicular adenoma among children and adolescents in Belarus exposed to iodine-131 after the Chernobyl accident. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 182, n. 9, p. 781-790, 2015

ZAKE, T. *et al.* Heterogeneity of tissue IL-17 and tight junction proteins expression demonstrated in patients with autoimmune thyroid diseases. **Medicine**, Hagerstown v. 97, n. 25, p. e11211, 2018.

ZAKE, T. *et al.* Upregulated tissue expression of T helper (Th) 17 pathogenic interleukin (IL)-23 and IL-1 β in Hashimoto's thyroiditis but not in Graves' disease. **Endocrine journal**, Tokyo, v. 66, n. 5, p.423-430, 2019.

ZIVANCEVIC-SIMONOVIC, S. *et al.* Cytokine production in patients with papillary thyroid cancer and associated autoimmune Hashimoto thyroiditis. **Cancer Immunology Immunotherapy**, Berlin, v. 64, n. 8, p. 1011-1019, 2015.

ZHENG, T. *et al.* Increased interleukin-23 in Hashimoto's thyroiditis disease induces autophagy suppression and reactive oxygen species accumulation. **Frontiers in immunology**, Lausanne v. 9, p. 96, 2018.

ZHANG, L. *et al.* Effects of iodine-131 radiotherapy on Th17/Tc17 and Treg/Th17 cells of patients with differentiated thyroid carcinoma. **Experimental and therapeutic medicine**, Athens, v. 15, n. 3, p. 2661-2666, 2018.

ANEXO

UFRN - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO ONOFRE
LOPES DA UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA RESPOSTA Th17 EM NEOPLASIAS DA TIREÓIDE

Pesquisador: JOABE DOS SANTOS PEREIRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 60989616.2.0000.5292

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Departamento de Patologia

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.908.883

Apresentação do Projeto:

Estudo retrospectivo observacional para avaliação da expressão imunohistoquímica da IL-6, IL-17, IL-23 e do ROR γ t em carcinomas papilíferos, adenomas foliculares e adenomas de células de Hurthle da tireoide para analisar comparativamente a Imunoexpressão destas moléculas entre o Infiltrado Inflamatório dessas neoplasias e correlacionar com as suas características clínico-patológicas. As peças incluídas em parafina serão obtidas no Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, sendo avaliados 20 carcinomas papilíferos, 20 adenomas foliculares e 20 adenomas de células de Hurthle.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo deste estudo é investigar o papel da resposta inflamatória Th17 no carcinoma papilífero, adenoma folicular e adenoma de células de Hurthle da tireoide, através da expressão imunohistoquímica das proteínas IL-6, IL-17, IL-23 e ROR γ t, correlacionando com as características clinicopatológicas dessas lesões. Dessa forma, pretende-se contribuir para um melhor entendimento do papel das células Th17 na etiopatogenia e comportamento desses tumores.

Objetivo Secundário

• Correlacionar a expressão das proteínas IL-6, IL-17, IL-23 e ROR γ t com variáveis clínicas dos

Endereço: Avenida Nilo Peçanha, 620 - Prédio Administrativo - 1º Andar - Espaço João Machado
Bairro: Petrópolis CEP: 59.012-300
UF: RN Município: NATAL
Telefone: (84)3342-5000 Fax: (84)3302-3941 E-mail: cep_huor@yahoo.com.br

**UFRN - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO ONOFRE
LOPES DA UNIVERSIDADE**



Continuação do Processo: 1.906.003

pacientes, como idade, sexo e grupo étnico.*

Correlacionar a expressão das proteínas IL-6, IL-17, IL-23 e ROR γ t com o tamanho da lesão, multifocalidade, invasão extra-tireoidiana e o estadiamento patológico pTNM quando aplicáveis.* Verificar se existe diferença estatisticamente significativa na expressão das proteínas IL-6, IL-17, IL-23 e ROR γ t entre os diferentes neoplasmas estudados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Em se tratando de uma pesquisa retrospectiva, com manipulação e análise de dados presentes em prontuários, laudos de exames histopatológicos, lâminas histológicas e blocos de parafina, todos mantidos em arquivo – sendo o material biológico e as lâminas histológicas provenientes de espécimes de procedimento cirúrgico prévio – os riscos potenciais da presente pesquisa são mínimos, ou melhor, virtualmente inexistentes. Não haverá manipulação clínica ou cirúrgica dos pacientes.

Benefícios:

A pesquisa não trará benefício direto aos pacientes, no entanto, o estudo irá contribuir para o maior entendimento dos mecanismos subjacentes ao comportamento clínico e biológico dos referidos tumores tireoidianos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É um projeto muito bem elaborado, com plenas condições de realização, claramente definido em termos metodológicos e logísticos, caracterizando exequibilidade na proposta.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo em vista que o pesquisador respondeu adequadamente às pendências, quais sejam;

- Acrescentou na plataforma Brasil os três grupos que serão estudados;
- Elaborou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);
- Descreveu detalhadamente as medidas a serem adotadas para contatar os pacientes para a assinatura do TCLE, sendo assim, O projeto está adequado conforme exigências da resolução 466/12.

Endereço: Avenida Nilo Peçanha, 620 - Prédio Administrativo - 1º Andar - Espaço João Machado
Bairro: Petrópolis CEP: 59.012-300
UF: RN Município: NATAL
Telefone: (04)3342-5003 Fax: (04)3302-3241 E-mail: cep_huol@yahoo.com.br

**UFRN - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO ONOFRE
LOPES DA UNIVERSIDADE**



Continuação do Parecer: 1.900.003

Considerações Finais a critério do CEP:

1. Apresentar relatório parcial da pesquisa, semestralmente, a contar do início da mesma.
2. Apresentar relatório final da pesquisa até 30 dias após o término da mesma.
3. O CEP HUOL deverá ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo.
4. Quaisquer documentações encaminhadas ao CEP HUOL deverão conter junto uma Carta de Encaminhamento, em que conste o objetivo e justificativa do que esteja sendo apresentado.
5. Caso a pesquisa seja suspensa ou encerrada antes do previsto, o CEP HUOL deverá ser comunicado, estando os motivos expressos no relatório final a ser apresentado.
6. O TCLE deverá ser obtido em duas vias, uma ficará com o pesquisador e a outra com o sujeito de pesquisa.
7. Em conformidade com a Carta Circular nº. 003/2011-CONEPICONS, faz-se obrigatório a rubrica em todas as páginas do TCLE pelo sujeito de pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_788694.pdf	31/12/2016 02:48:24		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_tireolde_modificado.doc	25/12/2016 20:51:27	André Fernandes Silva	Aceito
Outros	Carta_de_encaminhamento_tireolde.pdf	25/12/2016 20:50:22	André Fernandes Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Tireolde_Modificado.pdf	27/11/2016 17:52:40	André Fernandes Silva	Aceito
Outros	declaracao_institucional.pdf	12/10/2016 14:09:08	André Fernandes Silva	Aceito
Outros	docs_ponts.pdf	12/10/2016 14:08:21	André Fernandes Silva	Aceito
Outros	carta_anuencia.pdf	12/10/2016 14:08:29	André Fernandes Silva	Aceito
Outros	Folha_de_identificacao_do_pesquisador.docx	24/09/2016 13:38:42	André Fernandes Silva	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	24/09/2016 13:36:06	André Fernandes Silva	Aceito

Endereço: Avenida Nilo Peçanha, 620 - Prédio Administrativo - 1º Andar - Espaço João Machado
 Bairro: Petrópolis CEP: 59.012-300
 UF: RN Município: NATAL
 Telefone: (84)3342-5003 Fax: (84)3202-3041 E-mail: cep_huol@yahoo.com.br

UFRN - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO ONOFRE
LOPES DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 1.906.003

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

NATAL, 06 de Fevereiro de 2017

Assinado por:

André Duótil Luohessi
(Coordenador)

Endereço: Avenida Nilo Peçanha, 620 - Prédio Administrativo - 1º Andar - Espaço João Machado
Bairro: Petrópolis CEP: 59.012-300
UF: RN Município: NATAL
Telefone: (84)3342-5003 Fax: (84)3322-3041 E-mail: cep_huol@yahoo.com.br