

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Bruna Schwengber Lutz

**Análise da expressão dos genes de
reparo do DNA no carcinoma papilar
da tireoide**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2017**

Bruna Schwengber Lutz

Análise da expressão dos genes de reparo do DNA no carcinoma papilar da tireoide

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa Dra. Jenifer Saffi
Coorientadora: Profa Dra. Erika Meyer

**Porto Alegre
2017**

Schwengber Lutz, Bruna

Análise da expressão dos genes de reparo do DNA no carcinoma papilar da tireoide / Bruna Schwengber Lutz. -- 2017.

105 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.

Orientador(a): Jenifer Saffi ; coorientador(a): Erika Meyer.

1. Carcinoma Papilar da Tireoide. 2. Reparo do DNA. 3. Expressão gênica. 4. BRAFV600E. 5. Agressividade tumoral. I. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa Dra. Jenifer Saffi**, pela oportunidade e confiança desde o início deste trabalho. Por dar continuidade ao desenvolvimento da minha autonomia e pelo suporte nos momentos de dificuldade.

À minha co-orientadora, **Profa Dra. Erika Meyer**, pelo esforço conjunto na realização deste trabalho. Pelo estímulo e disponibilidade constantes.

À **Dra. Natalia M. Leguisamo**, pela colaboração e comprometimento desde à escrita do projeto aos resultados finais.

À aluna de iniciação científica, **Nicole Cabral**, que se comprometeu e não mediu esforços para gerar bons resultados, tornando-se uma nova admiradora da endocrinologia e do reparo do DNA.

Aos colaboradores da ISCMPA, o cirurgião **Virgílio Zanella** e seus residentes, assim como as residentes em Patologia, **Suzana Elisabete Lamonatto, Renata Fragomeni Almeida e Karen Margarita Rico Escamilla** por estarem na linha de frente deste trabalho e por garantirem a participação dos pacientes.

Ao **Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA**, em especial à **Grasiela Agnes**, pelo auxílio com as técnicas.

Ao **Laboratório de Patologia da UFCSPA**, em especial à **Dra. Keli Reiter**, que não deixou que eu desistisse das imunohistoquímicas.

Aos colegas do **Laboratório de Genética Toxicológica da UFCSPA**, em especial à aluna de iniciação científica, **Helena C. Gloria** pelo auxílio com a técnica de imunohistoquímica.

Ao meu pai **Paulo**, que me ensinou o valor da honestidade e compartilhou comigo um pouco de sua teimosia. Assim sigo insistindo em viver e crescer tudo o que for possível.

À minha mãe **Ruth**, que nunca mede esforços para me ver bem e que está comigo em todos os momentos. Ao amor forte, recíproco e incondicional que compartilhamos.

Ao **Chico**, que sofre cada dificuldade e vibra cada conquista desde o início da minha vida acadêmica.

Ao meu namorado **Felipe**, por repetir comigo que “tudo vai dar certo”, por me estimular e compreender meus anseios.

Por fim, agradeço à minha **família** e alguns bons **amigos** pelos momentos felizes que compartilhamos e por serem meu porto seguro.

RESUMO

O carcinoma papilar da tireoide (CPT) é responsável por até 80% dos tumores malignos da tireoide, sendo que a maioria dos pacientes apresentam um desfecho favorável. No entanto, 5% a 20% dos pacientes desenvolvem recorrência local e 10% apresentam metástases. Apesar da etiologia do CPT ainda ser desconhecida, a exposição à radiação ionizante é relatada como o principal fator de risco ambiental. Alguns polimorfismos foram descritos em genes envolvidos em sistemas de reparo do DNA, como *XRCC1* (reparo de excisão de bases - BER), *XPB* (reparo de excisão de nucleotídeos - NER) e *XRCC3* (recombinação homóloga - HR). Além disso, a hipermetilação do *hMLH1* (reparo de mal pareamento - MMR) está associada à tumorigênese da tireoide promovida por mutações em *BRAF*. Deste modo, as alterações nos níveis de expressão gênica dos mecanismos de reparo do DNA podem estar associadas com o desenvolvimento e a progressão de tumores da tireoide. Considerando a carência de dados sobre o comportamento dos diferentes sistemas de reparo do DNA e a ausência de estudos pareados no CPT, o objetivo deste estudo foi investigar a expressão de genes representativos das principais vias de reparo do DNA, a presença da mutação *BRAF*^{V600E} e suas associações com características clínico-patológicas. Trinta e duas amostras de CPT e tecido tireoidiano normal adjacente foram obtidas de pacientes submetidos à tireoidectomia total. A expressão gênica de *MGMT* (reparo direto); *MLH1* e *MSH2* (MMR); *OGG1*, *APE1* e *XRCC1* (BER); *XPB* (NER); *XRCC2*, *XRCC3*, *RAD51* (HR); *KU80* (junção de extremidades não homólogas - NHEJ) foi avaliada por PCR em tempo real. A expressão gênica foi calculada através do método $\Delta\Delta CT$ e normalizada através dos genes de controle interno, *ACTB* e *B2M*. A análise da expressão proteica de *MGMT* e *XRCC2* em amostras de CPT foi realizada por imunohistoquímica. A mutação *BRAF*^{V600E} foi investigada através de sequenciamento direto. A média de idade foi de $39,8 \pm 14$ anos e a proporção de mulheres foi de 87,5%. A mediana do tamanho do tumor foi de 2,4 cm (0,7-6,3). *MGMT* e *XRCC2* tiveram, respectivamente, diminuição de 0,36 vezes ($p=0,038$) e aumento de 0,53 vezes ($p=0,003$) na expressão gênica quando comparado com o tecido normal adjacente. A diminuição da expressão do gene *MGMT* foi associada com tamanho tumoral inferior a 2 cm ($p=0,040$), presença de metástase em linfonodos ($p=0,002$) e risco intermediário de recorrência ($p=0,002$). A expressão proteica de *XRCC2* foi associada com invasão local mínima ($p=0,040$). A mutação *BRAF*^{V600E} foi encontrada em 59% dos casos e correlacionada com a expressão de *MLH1* ($p=0,037$) e *XPB* ($p=0,025$). Estes resultados, particularmente para o *MGMT*, sugerem que diferentes níveis de expressão de genes de reparo do DNA estão associados à agressividade tumoral e podem ter um papel no prognóstico do CPT.

PALAVRAS-CHAVE: carcinoma papilar da tireoide, reparo do DNA, expressão gênica, *BRAF*^{V600E}, agressividade tumoral.

ABSTRACT

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is responsible for up to 80% of malignant thyroid tumors and the majority of patients have a favorable outcome. However, 5%–20% of patients may develop local recurrence while 10% may have distant metastasis. Despite the etiology of PTC is still unknown, exposure to ionizing radiation is reported as the main environmental risk factor. Some polymorphisms have been described in genes involved in DNA repair systems, such as *XRCC1* (base excision repair - BER), *XPD* (nucleotide excision repair - NER) and *XRCC3* (homologous recombination - HR). In addition, hypermethylation of *hMLH1* (mismatch repair - MMR) is associated with BRAF-promoted thyroid tumorigenesis. Thus, alterations in gene expression levels of DNA repair mechanisms can be associated with development and progression of thyroid tumors. Considering the lack of data on the behavior of different DNA repair systems and the absence of paired studies in PTC, the purpose of this study was to investigate the expression of representative genes of the main DNA repair pathways, the presence of the BRAF^{V600E} mutation and its associations with clinicopathological features. Thirty-two samples of PTC and surrounding normal thyroid tissue were obtained from patients undergoing total thyroidectomy. The gene expression of *MGMT* (direct repair); *MLH1* and *MSH2* (MMR); *OGG1*, *APE1* and *XRCC1* (BER); *XPD* (NER); *XRCC2*, *XRCC3*, *RAD51* (HR); *KU80* (non-homologous end joining - NHEJ) were evaluated by real time RT-PCR Array system. Gene expression was calculated through $\Delta\Delta CT$ method and normalized by two housekeeping genes, *ACTB* and *B2M*. Protein expression of *MGMT* and *XRCC2* in PTC samples was obtained by immunohistochemistry. The BRAF^{V600E} mutation was screened through direct sequencing. Mean age was 39,8±14 years and the proportion of females was 87,5%. The median of tumor size was 2.4 cm (0,7-6,3). *MGMT* and *XRCC2* were, respectively, 0,36 fold decreased ($p=0,038$) and 0,53 fold increased ($p=0,003$) gene expression. Decreased *MGMT* gene expression was associated with tumor size less than 2 cm ($p=0,040$), lymph node metastasis presence ($p=0,002$) and intermediate risk of recurrence ($p=0,002$). *XRCC2* protein expression was associated with minimum local invasion ($p=0,040$). BRAF^{V600E} mutation was found in 59% of the cases and was correlated with *MLH1* ($p=0,037$) and *XPD* expression ($p=0,025$). These results, particularly for *MGMT*, suggest that different levels in DNA repair gene expression are associated with tumor aggressiveness and may play a prognostic role in PTC.

KEYWORDS: papillary thyroid cancer, DNA repair, gene expression, BRAF^{V600E}, tumor aggressiveness.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais alterações moleculares no carcinoma papilar da tireoide e sua prevalência média.

Figura 2. Reparo direto. A enzima O⁶-DNA-metiltransferase (MGMT) transfere o grupamento metil para a cisteína presente no seu sítio ativo, removendo a lesão do DNA.

Figura 3. Reparo de mal pareamento. A base mal pareada é reconhecida pelo heterodímero MutS α (MSH2/MSH6), que se complexa com MutL α (MLH1/PMS2) para realizar a excisão. Em seguida Exo1 remove a sequência e Pol δ insere a base correta.

Figura 4. Mecanismos de reparo por excisão de bases. A lesão é reconhecida e removida por DNA glicosilases e sofre a ação de uma endonuclease AP. Em seguida, de acordo com o tipo de lesão, o BER é realizado através da via curta ou via longa.

Figura 5. Reparo por excisão de nucleotídeos. O dano é inicialmente reconhecido por XPC ou UV-DDB (DDB1 e DDB2) no reparo do genoma global (GGR), e por CSA e CSB quando recrutados pela RNA Pol II no reparo acoplado à transcrição (TCR). XPA e RPA confirmam a presença do dano e protegem a cadeia de DNA não danificada, respectivamente. XPA e XPB, parte do complexo TFIIH, desenrolam a fita do DNA. XPF e XPG promovem a incisão da fita contendo a lesão e a lacuna é preenchida por Pol ϵ ou Pol δ . A ligação ocorre através da DNA ligase I.

Figura 6. Recombinação homóloga. O reparo inicia com a identificação e ressecção da DSB através do complexo MRE11-RAD50-NBS1. RAD52 liga-se à extremidade 3' recém formada e permite a inserção de um filamento de RAD51, facilitado por proteínas homólogas (RAD51B, RAD51C e RAD51D, XRCC2 e XRCC3). Após a síntese de DNA, ligação e migração das fitas, a estrutura resultante é classicamente resolvida através de junções Holliday.

Figura 7. Junção de extremidades não-homólogas. A DSB é reconhecida através de KU70 e KU80. DNA-PK é recrutada e ativa o complexo XRCC4/LIG4 que une as duas extremidades após o processamento realizado pelo complexo MRE11-Rad50-NBS1 e pela proteína Artemis.

Figura 8. Câncer de tireoide e mecanismos de reparo do DNA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5'-dRP	5'-desoxirribose fosfato
6-4PP	6,4-fotoproduto
8-OxoG	8-oxo-7,8 dihidroguanina
AATg	Anticorpo anti-tireoglobulina
AGES	<i>Age, grade, tumor extent, tumor size</i>
ALKBH	<i>Alkylation repair homologs</i>
AMES	<i>Age, distant metastasis, tumor extent, tumor size</i>
AP	<i>Apurinic/aprimidinic</i>
APE1	<i>Apurinic/aprimidinic endonuclease 1</i>
ATA	<i>American Thyroid Association</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BER	Reparo por excisão de bases; <i>base excision repair</i>
BLM	<i>Bloom syndrome RecQ like helicase</i>
BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
BRCA2	<i>Breast cancer 2</i>
CAK	<i>Cyclin-activated kinase</i>
CDK7	<i>Cyclin dependent kinase 7</i>
CDT	Carcinoma diferenciado da tireoide
CFT	Carcinoma folicular da tireoide
CPD	Dímeros de ciclobutano pirimidina
CPT	Carcinoma papilar da tireoide
CSA	<i>Cockayne syndrome complementation group A</i>
CSB	<i>Cockayne syndrome complementation group B</i>
CtIP	<i>CtBP-interacting protein</i>
DDB1	<i>DNA damage-binding protein 1</i>
DDB2	<i>DNA damage-binding protein 2</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DR	Reparo direto; <i>direct repair</i>
DSB	<i>Double-stranded break</i>
E	Ácido glutâmico
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>

ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
EXO1	<i>Exonuclease I</i>
FEN1	<i>Flap structure-specific endonuclease 1</i>
GGR	Reparo do genoma global; <i>global genome repair</i>
HMGN1	<i>High mobility group nucleosome binding domain 1</i>
HNPCC	Câncer colorretal hereditário sem polipose
HR	Recombinação homóloga; <i>homologous recombination</i>
HR23B	<i>UV excision repair protein RAD23 homolog B</i>
HRAS	<i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
IDH1	<i>Isocitrate dehydrogenase 1</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
Ku80	<i>Lupus Ku autoantigen protein p80</i>
LIG4	<i>DNA ligase IV</i>
LP-BER	<i>Long-patch BER</i>
MACIS	<i>Distant metastasis, age, completeness of primary tumor resection, local invasion, tumor size</i>
MAPK	Via das proteíno-quinases ativadas por mitógenos
MAT1	<i>CDK-activating kinase assembly factor MAT1</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MGMT	O ⁶ -metilguanina-DNA-metiltransferase
MLH1	<i>MutL homolog 1</i>
MLH3	<i>MutL homolog 3</i>
MMR	Reparo de mal pareamento; <i>mismatch repair</i>
MRE11	<i>MRE11 homolog, double strand break repair nuclease</i>
MSH2	<i>MutS homolog2</i>
MSH3	<i>MutS homolog 3</i>
MSH6	<i>MutS homolog 6</i>
Mut	<i>Methylmalonyl-CoA mutase</i>
MUTYH	<i>MutY DNA glycosylase</i>
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrome protein 1</i>
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos; <i>nucleotide excision repair</i>
NHEJ	Junção de extremidades não homólogas; <i>non-homologous end joining</i>

NRAS	<i>Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
NTH1	<i>Endonuclease III homologue</i>
NTHL1	<i>NTH like DNA glycosylase 1</i>
NTRK1	<i>Neurotrophic receptor tyrosine kinase 1</i>
O ⁶ meG'	<i>O⁶-metilguanina</i>
OGG1	<i>8-Oxoguanine glycosylase</i>
OMS	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
p8	<i>p8 protein</i>
p34	<i>p34 protein</i>
p44	<i>p44 protein</i>
p52	<i>p52 protein</i>
p62	<i>p62 protein</i>
PARP1	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase-1</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PMS1	<i>Post meiotic segregation increased 1</i>
PMS2	<i>Post meiotic segregation increased 2</i>
Polβ	<i>DNA polymerase β</i>
Polδ	<i>DNA polymerase δ</i>
Polε	<i>DNA polymerase ε</i>
RAD50	<i>RAD50 double strand break repair protein</i>
RAD51	<i>DNA repair protein RAD51 homolog 1</i>
RAD51B	<i>RAD51 paralog B</i>
RAD51C	<i>RAD51 paralog C</i>
RAD51D	<i>RAD51 paralog D</i>
RAD52	<i>DNA repair protein RAD52 homolog</i>
RAF	<i>Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
RAS	<i>Rat sarcoma virus</i>
RET/PTC	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor</i>
RET/PTC1	<i>RET gene rearrangement 1</i>
RET/PTC3	<i>RET gene rearrangement 3</i>
RFC	<i>Replication factor C</i>
RMI1/2	<i>RecQ mediated genome instability 1 e RecQ mediated genome instability 2</i>
RNA Pol II	<i>RNA polymerase II</i>

RPA	<i>Replication protein A</i>
SP-BER	<i>Short-patch BER</i>
ssDNA	<i>Single-stranded DNA</i>
TCR	<i>Reparo acoplado à transcrição; transcription coupled repair</i>
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TFIIH	<i>Transcription factor II human</i>
TFIIS	<i>Transcription factor S-II</i>
Tg	<i>Tireoglobulina</i>
TNM	<i>Tumor-nódulo-metástase; tumor, node, metastasis</i>
TopoIII α	<i>Topoisomerase (DNA) III alpha</i>
TRK	<i>Tyrosine kinase receptor</i>
TSH	<i>Hormônio tireoestimulante</i>
UNG	<i>Uracil-DNA glycosylase</i>
UV-DDB	<i>UV-damaged DNA binding</i>
V	<i>Valina</i>
XAB2	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group A binding protein 2</i>
XPA	<i>Xeroderma pigmentosum group A</i>
XPB	<i>Xeroderma pigmentosum group B</i>
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group C</i>
XPD	<i>Xeroderma pigmentosum group D</i>
XPF	<i>Xeroderma pigmentosum group F</i>
XPG	<i>Xeroderma pigmentosum group G</i>
XRCC1	<i>X-ray repair cross-complementing protein 1</i>
XRCC2	<i>X-ray repair cross complementing 2</i>
XRCC3	<i>X-ray repair cross complementing 3</i>
XRCC4	<i>X-ray repair cross complementing 4</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Câncer de tireoide	15
1.2. Fatores prognósticos clínico-patológicos para o carcinoma diferenciado de tireoide	17
1.2.1. Idade	17
1.2.2. Gênero	18
1.2.3. Histórico familiar	18
1.2.4. Tamanho tumoral	19
1.2.5. Classificação histológica	19
1.2.6. Multifocalidade e bilateralidade	20
1.2.7. Extensão do tumor	20
1.3. Marcadores laboratoriais de prognóstico para o carcinoma diferenciado de tireoide	21
1.3.1. Tireoglobulina	21
1.3.2. Anticorpo anti-tireoglobulina	21
1.4. Marcadores moleculares de prognóstico para o carcinoma papilar de tireoide	22
1.4.1. BRAF	23
1.4.2. RAS	24
1.4.3. Rearranjos RET/PTC e TRK	25
1.4.4. TERT	26
1.5. Reparo do DNA	26
1.5.1. Reparo direto	27
1.5.2. Reparo de mal pareamento	28
1.5.3. Reparo por excisão de bases	30
1.5.4. Reparo por excisão de nucleotídeos	32
1.5.5. Reparo de quebras duplas	34
1.5.5.1. Recombinação homóloga	35
1.5.5.2. Junção de extremidades não-homólogas	37
1.6. Reparo do DNA e tumorigênese da tireoide	38
2. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivo geral	41
2.2. Objetivos específicos	41

3. ARTIGO.....	42
Abstract.....	43
1. Introduction	44
2. Materials and methods.....	46
2.1. Patients and tissues.....	46
2.2. Extraction of nucleic acids and reverse transcription	46
2.3. Quantitative real-time PCR	47
2.4. Immunohistochemistry studies.....	47
2.5. BRAF ^{V600E} mutation analysis	48
2.6. Statistical analysis.....	49
3. Results	50
3.1. <i>MGMT</i> and <i>XRCC2</i> gene expression is altered in papillary thyroid carcinoma	50
3.2. Low <i>MGMT</i> gene expression is associated with clinicopathological characteristics of tumor aggressiveness in papillary thyroid carcinoma.....	53
3.3. <i>XRCC2</i> protein expression is associated with minimum local invasion	54
3.4. BRAF ^{V600E} mutation is associated with <i>MLH1</i> and <i>XPD</i> gene expression	56
4. Discussion.....	58
5. Conclusion	61
Acknowledgements	61
Disclosure statement.....	61
References.....	62
4. CONCLUSÕES FINAIS.....	67
4.1. Conclusão geral	67
4.2. Conclusões específicas	67
5. PERSPECTIVAS.....	68
6. REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética da UFCSPA	85
ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética da ISCMPA	87
ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	90
ANEXO D - Normas do periódico "Molecular and Cellular Endocrinology"	93

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de tireoide

O câncer de tireoide é o tipo mais frequente dentre os tumores endócrinos malignos e representa aproximadamente 2,1% de todos os tipos de tumores que acometem os humanos (Wartofsky, 2010; Globocan, 2012). De acordo com a histologia, o câncer de tireoide é tradicionalmente classificado em grupos: carcinoma medular, indiferenciado (anaplásico) e diferenciado (carcinoma papilar e folicular) (Delellis et al., 2004). O carcinoma medular se desenvolve a partir das células parafoliculares (células C) da tireoide, responsáveis pela produção de calcitonina. Os carcinomas anaplásico e diferenciado da tireoide (CDT) são originários das células epiteliais foliculares, sendo que o CDT (80-90% dos casos) preserva características das células foliculares normais como a síntese e secreção de tireoglobulina e captação de iodo (Schlumberger, 1999; Sherman, 2003).

Nas últimas décadas, a incidência de câncer da tireoide tem aumentado, especialmente de carcinomas papilares, chegando a 95% dos casos de CDT diagnosticados, enquanto que a taxa de carcinomas foliculares mantém-se relativamente estável (La Vecchia et al., 2014; Howlader et al., 2016). Em adição, embora as taxas de mortalidade tenham aumentado discretamente nos Estados Unidos, Reino Unido e Austrália, as mesmas permanecem estáveis ou reduziram na maioria dos países (Sierra, Soerjomataram e Forman, 2016). Xie e colaboradores (2014) sugerem que o aumento da incidência pode estar associado a uma combinação de técnicas sensíveis de diagnóstico, como a ultrassonografia da tireoide e de possíveis exposições ambientais. No Brasil, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2016 é de 1.090 novos casos de câncer de tireoide para o sexo masculino e de 5.870 para o sexo feminino (INCA, 2016). Para o Rio Grande do Sul foram estimados 460 novos casos de câncer na glândula tireoide, sendo 17% diagnosticados em pacientes de Porto Alegre (INCA, 2016). Já em São Paulo, a incidência de carcinoma da tireoide no período de 1997 a 2008 foi de 18,43 para mulheres e de 4,42 para homens por 100.000 habitantes por ano. O índice de mortalidade foi semelhante para ambos os sexos, estando ligeiramente mais elevado para mulheres (Veiga et al., 2013).

A exposição à radiação é o principal fator de risco ambiental associado ao câncer da tireoide, especialmente quando relacionado a crianças (Ron et al., 1995; Sinnott, Ron e Schneider, 2010; Veiga et al., 2012). De maneira geral, a radiação ionizante produz danos celulares levando a instabilidade cromossômica e alterações nucleotídicas devido à geração de radicais livres, o que contribui para a tumorigênese (Little, 2000). Estudos recentes têm buscado compreender os mecanismos envolvidos com a exposição ao iodo radioativo e o surgimento de carcinoma papilar da tireoide (CPT) na infância após acidentes nucleares, como Chernobyl (Suzuki et al., 2015). Além disso, considerando que o iodo possui papel na formação dos hormônios da tireoide, dietas deficientes neste mineral são um fator de risco para o câncer, especialmente carcinoma folicular da tireoide (CFT) (Zimmermann e Galetti, 2015). Outros fatores como medida antropométrica, histórico de hipotireoidismo ou hipertireoidismo, exposição a éteres de difenilapolibromados, tabagismo e consumo de álcool continuam a ser estudados, com resultados conflitantes até o momento (Rossing et al., 2000; Preston-Martin et al., 2003; Zhang et al., 2008; Xhaard et al., 2015).

O tratamento inicial para o CDT é cirúrgico, e inclui lobectomia (tumores menores de 1 cm) ou tireoidectomia total (remoção de todo o tecido tireoidiano visível) (Haugen et al., 2016). Em casos selecionados, a utilização de iodo radioativo (^{131}I) é recomendada após a tireoidectomia total para ablação de células neoplásicas remanescentes, diminuindo o potencial de recidiva e aumentando a sensibilidade dos testes de seguimento, especialmente a dosagem sérica da tireoglobulina (Wartofsky e Van Nostrand, 2012). O iodo radioativo atua se inserindo nas células da tireoide através dos transportadores de iodeto de sódio e emitem raios beta de curto comprimento de onda, causando a morte celular aguda (Nguyen et al., 2015).

Para o tratamento de pacientes com CDT avançado e progressivo resistente ao iodo radioativo são utilizados agentes citotóxicos convencionais, como a doxorubicina e a cisplatina, que geram taxas de resposta não maiores do que 25% (Huyck e Agulnik, 2011). Além disso, a remissão completa é rara e a toxicidade deste tratamento é significativa (Sarlis, 2001). Recentemente, as drogas Sorafenibe e Lenvatinibe, que inibem a auto-fosforilação dos receptores

tirosino-quinase, estão sendo recomendadas para o tratamento dos casos refratários ao iodo radioativo (Ferrari et al., 2015).

1.2. Fatores prognósticos clínico-patológicos para o carcinoma diferenciado de tireoide

Fator prognóstico é uma característica (clínica ou histológica) ou um marcador que pode auxiliar na predição sobre a evolução e desfechos de determinada doença, guiando decisões terapêuticas (Clark, 2008). No caso do CDT, a maioria dos pacientes possui prognóstico favorável, com taxa de sobrevida de 10 anos em mais de 90% dos casos (Zhu et al., 2015). Porém, aproximadamente 15% dos pacientes desenvolvem recidiva local e 5 a 10% apresentam metástases (Rouxel et al., 2004; Guimarães e Rosa, 2008). O CPT gera metástases em linfonodos cervicais e apresenta alta incidência de extensão extratireoidiana para órgãos adjacentes, enquanto o CFT normalmente se dissemina via hemática para órgãos distantes (Benbassat, Mechlis-Frish e Hirsch, 2006). Um desafio no manejo do CDT é a identificação da parcela de pacientes com maior risco de desfechos desfavoráveis.

1.2.1. Idade

Alguns sistemas de classificação de risco consideram a idade como o principal fator prognóstico para pacientes diagnosticados com CDT. A classificação tumor-nódulo-metástase (TNM) é comumente adotada e utiliza a idade de 45 anos como ponto de corte para estratificar pacientes como baixo ou alto risco para mortalidade (Sobin et al., 2009; Edge e Compton, 2010). A expectativa de vida dos pacientes acima de 45 anos de idade é reduzida, especialmente se associada com invasão local, presença de linfonodos e metástases (Wada et al., 2008; Verburg et al., 2013).

Outros sistemas, tais como AGES (*age, grade, tumor extent, tumor size*), AMES (*age, distant metastasis, tumor extent, tumor size*), EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*) e MACIS (*distant metastasis, age, completeness of primary tumor resection, local invasion, tumor size*) consideram a idade como um fator contínuo que afeta o prognóstico de CPT sem qualquer estratificação (Lang et al., 2007). Além disso, um estudo recente sugere idade superior a 60 anos como fator

prognóstico independente para desfecho desfavorável e risco de mortalidade no CDT (Shi et al., 2016).

1.2.2. Gênero

Apesar do prognóstico ser pior para pacientes do sexo masculino, a frequência do diagnóstico de câncer de tireoide é maior em mulheres, com uma razão feminino/masculino de 4:1 (Micheli et al., 2009; Jemal et al., 2010; Colonna et al., 2015). Com isso, os hormônios sexuais femininos, principalmente os estrógenos, podem influenciar na proliferação e invasão de células cancerosas da tireoide através de reconhecimento dos receptores hormonais expressos nessas células, como os receptores alfa e beta de estrógeno (Zane et al., 2014). Diversos fatores reprodutivos e hormonais como contracepção oral, terapia de reposição hormonal, idade da menarca, idade ao primeiro parto e menopausa foram estudados sem encontrar associações significativas com o risco de desenvolvimento de câncer da tireoide (Kabat et al., 2012; Zamora-Ros et al., 2015).

1.2.3. Histórico familiar

Estudos de caso-controle revelaram que indivíduos com histórico familiar de doenças malignas da tireoide possuem maior probabilidade para o desenvolvimento de CDT (Brindel et al., 2010; Xu et al., 2012). Em adição, síndromes familiares incomuns, como a Doença de Cowden e Síndrome de Gardner, incluem o CPT entre suas manifestações (Nosé, 2010). Entre parentes de primeiro grau, o risco para câncer de tireoide pode aumentar de três a dez vezes (Leux et al., 2012). Nesses casos, os tumores geralmente são agressivos e ocorrem em jovens, com frequência de CPT maior que CFT (Alsanea et al., 2000; Uchino et al., 2002).

Alterações genéticas como mutação nos genes BRAF (*V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*) e RAS (*rat sarcoma virus*) têm sido identificadas como fatores de susceptibilidade (Cavaco et al., 2008). No entanto, Tuya e colaboradores relataram que a contribuição do fator hereditário é pequena, pois apenas 5% dos pacientes investigados possuíam histórico familiar de carcinomas não medulares da tireoide (Tuya et al., 2001).

1.2.4. Tamanho tumoral

O tamanho tumoral é adotado em escalas de classificação de risco como TNM e AMES. Na escala TNM existem dois pontos de corte, 2 e 4 cm (T1 para 2 cm ou menos, T2 para 2,1 a 4 cm e T3 para tumores maiores que 4 cm) (Sobin et al., 2009). Na escala AMES o ponto de corte para pacientes com alto ou baixo risco é 5 cm (Cady e Rossi, 1988). Um estudo realizado com 366 pacientes diagnosticados com CPT indica que tumores com tamanho a partir de 2 cm podem apresentar pior prognóstico (Machens, Holzhausen e Dralle, 2005).

Na análise retrospectiva realizada por Ito e colaboradores (2007), indivíduos com neoplasias maiores que 4 cm apresentaram índices mais altos de mortalidade quando comparado a tumores menores. Além disso, Mazzaferri e Jhiang (1994) observaram que a mortalidade em 30 anos para tumores <1,5 cm foi de 0,4% enquanto que para tumores >4,5 cm foi de 22%.

1.2.5. Classificação histológica

Com relação ao CDT, para pacientes com CFT a sobrevida livre de doença em 10 anos é de 75%, enquanto para o CPT é de aproximadamente 90% (Kushchayeva, et al., 2008; Zhu et al., 2015). O CPT possui diversos subtipos histológicos, caracterizados por uma combinação de fatores de crescimento específicos, tipos celulares e alterações estromais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica as variantes histopatológicas de CPT em 9 categorias: folicular, macrofolicular, oncocítica (incluindo Warthin-like), células claras, esclerosante difusa, células altas, células colunares, sólidas e cribriforme (DeLellis et al., 2004).

A arquitetura papilar coberta por células com citoplasma eosinofílico e núcleos aumentados é característica do CPT clássico. Por sua vez, a variante folicular é a principal variante descrita, sendo composta por folículos de diversos tamanhos. Warthin-like é uma variante rara no CPT, normalmente relatado em mulheres acima dos 50 anos e associada com infiltração linfóide no tumor e áreas não tumorais. Em geral, o prognóstico destas variantes é favorável (Apel, Asa e LiVolsi, 1995; D'Antonio et al., 2000; Amico et al., 2010; Lloyd, Buehler e Khanafshar, 2011).

A principal variante com curso clínico agressivo, correspondendo a 10% dos casos de CPT é a de células altas, apresentando características clínicas como maior tamanho tumoral (>6 cm), extensão extratireoidiana, necrose e doença metastática (LiVolsi, 2011). Histologicamente, esses tumores têm células cuja altura é 2 a 3 vezes maior que sua largura (Lloyd, Buehler e Khanafshar, 2011). Outras variantes como colunar, esclerosante difusa e sólida são raras e mais agressivas do que o CPT clássico (Schneider e Chen, 2013).

1.2.6. Multifocalidade e bilateralidade

Os pacientes diagnosticados com CPT geralmente possuem mais de um foco da doença (multifocalidade), chegando a 80% dos casos. Por sua vez, a doença bilateral, caracterizada pela presença de nódulos malignos em ambos os lobos da tireoide, acomete até 60% dos pacientes (Schneider e Chen, 2013). Kim e colaboradores (2013) revisaram laudos médicos de 2095 pacientes, concluindo que apenas a multifocalidade possui associação com risco elevado de persistência da neoplasia. A doença multifocal também é relacionada com linfonodos metastáticos, metástases à distância e recidiva regional (Al Afif et al., 2015; So, Kim e Son, 2015). Além disso, a taxa de sobrevida diminui significativamente com o aumento do número de focos de CPT (Qu et al., 2014).

1.2.7. Extensão do tumor

A extensão da doença contribui para o risco de recidiva e mortalidade no CDT (Ito et al., 2012; Lee et al., 2014). A presença de linfonodos metastáticos é reconhecida como um dos principais fatores de prognóstico e ocorre em 30 a 80% dos casos de CPT. O risco para recorrência aumenta com idade avançada, tumores maiores e subtipos histológicos agressivos. A importância do número de linfonodos removidos durante a dissecação lateral do pescoço permanece controversa (Leboulleux et al., 2005; Albuja-Cruz et al., 2012; Kim et al., 2014).

A extensão extratireoidiana, definida pela extensão do tumor primário além da cápsula da tireoide, possui incidência no CPT que varia de 5 a 34%. É associada a pacientes com linfonodos metastáticos, tumores não encapsulados maiores que 4 cm e idade acima de 50 anos (Ortiz et al., 2001). Um estudo

demonstrou que o desfecho é pior para pacientes com doença extratireoidiana macroscópica do que para aqueles com invasão local microscópica durante a avaliação histopatológica (Radowsky et al., 2014). Metástases distantes ocorrem em até 10% dos pacientes, podendo acometer pulmão, ossos e cérebro (Benbassat, Mechlis-Frish e Hirsch, 2006; Durante et al., 2006). No CDT a presença de metástases distantes é relacionada com mortalidade, com taxa de sobrevida de apenas 50% após 10 anos (Elisei et al., 2010).

1.3. Marcadores laboratoriais de prognóstico para o carcinoma diferenciado de tireoide

1.3.1. Tireoglobulina

A tireoglobulina (Tg) é uma glicoproteína produzida pelas células foliculares tireoidianas e uma ferramenta laboratorial importante para acompanhamento pós-cirúrgico de pacientes com CDT pois suas dosagens são muito baixas ou nulas em indivíduos submetidos a tireoidectomia (Pacini et al., 1980; Rosário et al., 2013). Consensos atuais indicam a dosagem da Tg estimulada 6 a 12 meses após o tratamento inicial em todos os pacientes, a fim de avaliar a eficácia do tratamento e guiar o seguimento do paciente. Os níveis séricos de Tg devem ser <0.2 ng/mL durante a supressão do TSH ou <1 ng/mL após sua estimulação na ausência de anticorpos interferentes (Haugen et al., 2016).

Além deste importante papel da Tg no seguimento em longo prazo dos pacientes com CDT, a Tg pode ser utilizada como marcador prognóstico inicial. Uma meta-análise envolvendo 3947 pacientes demonstrou que a dosagem de Tg pós-operatória possui papel importante também no seguimento em longo prazo dos pacientes, atribuindo ao teste um valor preditivo negativo de 94,2% (IC 95%; 92,8-95,3) (Webb et al., 2012).

1.3.2. Anticorpo anti-tireoglobulina

O anticorpo anti-tireoglobulina (AATg) possui papel no monitoramento de pacientes com CDT. A dosagem é recomendada, pois sua presença pode interferir na avaliação de Tg, gerando resultados falso positivos ou falso negativos (Haugen et al., 2016). É importante ressaltar que pacientes com CDT

possuem prevalência de AATg até duas vezes maior que a população geral (Spencer, 2011).

Buscando verificar sua utilidade prognóstica, Kim e colaboradores (2008) acompanharam 824 pacientes realizando a dosagem de AATg logo após e 6-12 meses depois da tireoidectomia e ablação de células remanescentes. Destes, 54 apresentaram AATg positivo. Quando divididos em 3 grupos, houve diminuição do valor de AATg maior que 50% em 21 pacientes, menor que 50% em 16 pacientes e aumento em 19 pacientes. A taxa de recorrência tumoral representou respectivamente 0, 19 e 37%.

Por sua vez, um estudo retrospectivo multicêntrico investigou o valor clínico da dosagem de AATg na primeira avaliação após o tratamento cirúrgico. Foram utilizadas duas coortes, uma incluindo 220 pacientes com AATg positivo (estudo) e outra 1020 pacientes com AATg negativo (controle). O grupo de estudo apresentou maior risco de acordo com a *American Thyroid Association* (ATA) (6,9% vs. 3,2%) e maior diagnóstico de extensão extratireoidiana (28,2% vs. 24%). Após um ano de seguimento, o grupo de pacientes com AATg positivo revelou maior recorrência da doença (5,8% vs. 1,4%) (Durante et al., 2014).

1.4. Marcadores moleculares de prognóstico para o carcinoma papilar de tireoide

Sabendo-se que o surgimento do câncer está relacionado com o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, diversas mutações e rearranjos foram descritos na patogênese dos tumores da tireoide (Nikiforov e Nikiforova, 2011). No CPT, são comumente encontradas modificações que promovem a desregulação da via das proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Pollock e Meltzer, 2002). Mutações em BRAF e RAS, assim como rearranjos RET/PTC são os principais eventos genéticos nestes tumores (Figura 1). Estudos têm relatado também a presença de mutações em TERT, assim como raros rearranjos TRK (Frattini et al., 2004; Nikiforov e Nikiforova, 2011; Liu e Xing, 2016). Essas alterações moleculares são propostas como marcadores prognósticos com possibilidade de avaliar o risco de persistência ou recorrência tumoral após o tratamento inicial.

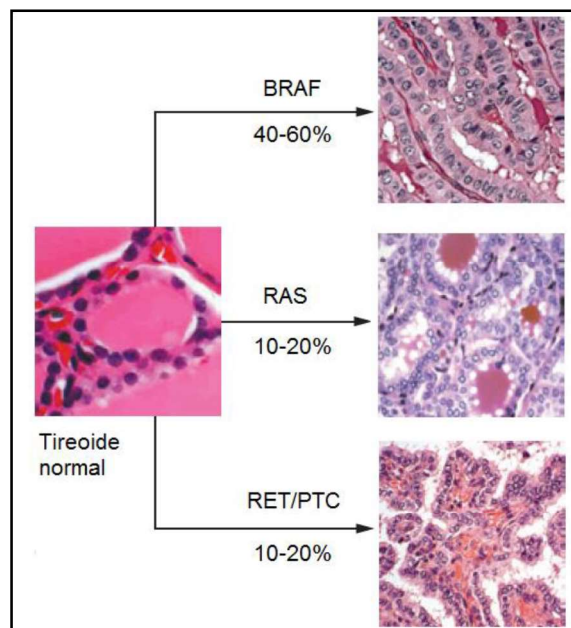


Figura 1. Principais alterações moleculares no carcinoma papilar da tireoide e sua prevalência média. Fonte: adaptado de Nikiforov e Nikiforova, 2012.

1.4.1. BRAF

O gene BRAF codifica a isoforma da proteína RAF tipo B e está localizado no braço longo do cromossomo 7 (Hussain et al., 2015). Este gene codifica uma serina/treonina-quinase, enzima que modula a função de outras proteínas na via da MAPK através da transferência de grupamentos fosfato (Pollock e Meltzer, 2002). Mutações em BRAF levam a proteína a manter-se em sua forma ativada, resultando na ativação constitutiva da cascata de sinalização RAF-MEK-ERK (Schneider e Chen, 2013). Como consequência, há o estímulo crônico da via MAPK e favorecimento do desenvolvimento tumoral (Mercer e Pritchard, 2003; Nikiforov e Nikiforova, 2011).

Mais de 40 mutações já foram descritas para o gene BRAF, sendo que 90% delas correspondem a BRAF^{V600E}, onde o aminoácido valina (V) é substituído por um ácido glutâmico (E) na posição 600. Esta mutação é do tipo *missense*, devido à transversão somática de uma timina por uma adenina na posição 1799 no éxon 15 (T1799A) (Davies et al., 2002; Garnett e Marais, 2004).

Na tireoide, BRAF localiza-se predominantemente nas células foliculares e a mutação é sugerida como um potencial marcador prognóstico no CPT, ocorrendo em média em 60% dos pacientes (Fagin e Wells, 2016). Em adição, é frequentemente encontrada nas variáveis clássica e de células altas e

raramente na variante folicular do CPT (Trovisco et al., 2004; Henderson et al., 2009; Rivera et al., 2010).

Fatores clinico-patológicos relacionados à pior prognóstico do CPT, como invasão extratireoidiana, estadio TNM avançado, presença de linfonodos metastáticos e recorrência são comprovadamente associados com a mutação $BRAF^{V600E}$ (Kim et al., 2012; Liu, Chen e Liu, 2016). Um estudo multicêntrico retrospectivo revelou a correlação da presença da mutação com maior potencial para recorrência em pacientes com microcarcinomas e inicialmente classificados como baixo risco (Xing et al., 2014a).

Entretanto, após análise ajustada para características tumorais (linfonodos metastáticos, invasão extratireoidiana e metástases distantes), $BRAF^{V600E}$ não foi associado significativamente com maior índice de mortalidade no CPT (Xing et al., 2013). Subsequentemente, o valor prognóstico do diagnóstico da mutação foi questionado em um editorial de acompanhamento (Cappola e Mandel, 2013). Com isso, a avaliação de $BRAF^{V600E}$ tem sido debatida, a fim de verificar seu real valor como marcador prognóstico.

1.4.2. RAS

A família de oncogenes RAS (isoformas KRAS, NRAS e HRAS) sintetiza pequenas proteínas GTPases que agem propagando sinais dos receptores tirosina quinase e não-tirosina quinase, ativando a via MAPK (Tavares et al., 2016). Mutações em RAS, que ocorrem predominantemente nos códons 12, 13 e 61, promovem a aceleração da atividade mitogênica e contribuem para a progressão tumoral. No carcinoma de tireoide, mutações em NRAS e HRAS no códon 61 são as mais comuns, sendo particularmente encontradas no carcinoma folicular e anaplásico (Motoi et al., 2000; Nikiforov e Nikiforova, 2011). Por sua vez, adenomas foliculares podem ser precursores de carcinoma folicular da tireoide, principalmente devido a mutações em NRAS e KRAS (Mchenry e Phitayakorn, 2011).

Quanto ao CPT, a prevalência das mutações é baixa e varia consideravelmente de acordo com a classificação histológica, sendo rara no CPT clássico e frequente na variante folicular (>25%) (Cristofaro et al., 2006; Rivera et al., 2010; Park et al., 2013). Estudos recentes demonstram que

mesmo que a histologia indique maior agressividade, tumores com mutações no gene RAS possuem agressividade limitada. A maioria deles são variante folicular do CPT, sem associação com fatores clínicos como extensão extratireoidiana e presença de linfonodos metastáticos. Portanto, se for diagnosticada presença de mutações somente em RAS, tais tumores são considerados altamente curáveis e possuem bom prognóstico (Xing, 2016).

1.4.3. Rearranjos RET/PTC e TRK

O gene RET localiza-se no cromossomo 10, contém 21 exons e codifica um receptor transmembrana da família das tirosinoquinases. Este gene é expresso primariamente em células urogenitais e derivadas da crista neural durante a embriogênese, possuindo papel na transdução de sinais para a proliferação, diferenciação e migração celular (Arighi, Borello e Sariola, 2005).

As células foliculares normais da tireoide não expressam RET, no entanto, aproximadamente 10-20% das amostras de CPT possuem rearranjos neste gene (Santoro et al., 2002; Legakis e Syrigos, 2011). Os rearranjos são resultado de inversões ou translocações cromossômicas que causam a recombinação do gene RET com genes heterólogos, podendo resultar em 13 diferentes oncogenes quiméricos denominados RET/PTCs (Santoro et al., 2004; Prescott e Zeiger, 2015). Os principais rearranjos identificados são RET/PTC1, relacionado com CPT clássico e RET/PTC3 frequentemente associado com a variante de células altas e variante sólida (especialmente no contexto pós-Chernobyl) (Tallini et al., 1998; Rabes et al., 2000; Basolo et al., 2002).

Rearranjos cromossômicos no gene NTRK1, localizado no cromossomo 1 também são encontrados no CPT. NTRK1 pode se fundir com pelo menos três genes diferentes localizados no mesmo ou em outros cromossomos. No entanto, tais rearranjos ocorrem com menor prevalência que RET/PTC, não ultrapassando 12% (Frattini et al., 2004; Greco, Miranda e Pierotti, 2010). Em adição, uma análise de taxa de sobrevida revelou que em pacientes com CPT, rearranjos TRK são preditores de pior prognóstico quando comparados com pacientes com rearranjos RET/PTC ou sem qualquer rearranjo diagnosticado (Musholt et al., 2000).

1.4.4. TERT

A atividade da telomerase, responsável por manter a integridade cromossômica e a estabilidade genômica, é regulada por sua unidade catalítica denominada TERT (Moyzis et al., 1988; Blasco, 2005). A substituição de uma citosina por uma timina nas posições C228T e C250T são as principais mutações descritas em TERT, resultando em proteção contra a senescência de células tumorais (Bae et al., 2016).

Neste sentido, mutações em TERT são amplamente descritas em diversos tipos de câncer, incluindo melanoma, sistema nervoso central, bexiga e tireoide (Huang et al., 2013; Killela et al., 2013; Vinagre et al., 2013; Weinhold et al., 2014). Com relação ao CPT, mutações somáticas em TERT têm demonstrado frequência de 7-22% (Liu e Xing, 2016). As principais variantes histológicas envolvidas são o CPT clássico e de células altas (Bullock et al., 2016).

Um estudo incluindo 507 pacientes submetidos à tireoidectomia total com diagnóstico de CPT revelou que a coexistência de TERT C228T e BRAF^{V600E} está relacionada com maior recorrência da doença (Xing et al., 2014b). Em adição, Gandolfi e colaboradores (2015) demonstraram a associação da presença das mutações TERT C228T e C250T com metástases no CPT. A partir destes resultados, é possível prever um comportamento agressivo do tumor na presença de mutações em TERT.

1.5. Reparo do DNA

Alterações na estrutura do DNA podem ser causadas por agentes intrínsecos derivados do metabolismo ou por agentes extrínsecos, como exposições tóxicas agudas e exposições ambientais crônicas (Bont e Larebeke, 2004; Kinsella, 2009). Por este motivo, durante o ciclo celular existem pontos de verificação (*checkpoints*) antes da divisão e distribuição do material genômico das células mitóticas para as células filhas (Reinhard e Yaffe, 2013). Quando algum erro é detectado, há uma pausa na replicação para que ocorra o reparo do DNA ou para que haja a indução de morte celular. Este conjunto de mecanismos de sinalização denomina-se resposta aos danos do DNA (Jackson e Bartek, 2009; Reinhardt e Schumacher, 2012).

As células de mamíferos utilizam mecanismos de reparo lesão-específicos para corrigir os diferentes tipos de danos. Estes mecanismos incluem: reparo direto (DR), reparo de mal pareamento (MMR), reparo por excisão de bases (BER), reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e sistema de reparo de quebras duplas (DSB), subdividido em recombinação homóloga (HR) e junção de extremidades não homólogas (NHEJ) (Lord e Ashworth, 2012).

1.5.1. Reparo direto

O reparo direto (DR) é assim denominado pois ocorre em uma reação rápida e livre de erros onde, em células de mamíferos, a lesão que pode ser causada pela alquilação de bases, é revertida através de um único passo. Este mecanismo não utiliza nucleotídeo molde, não rompe a estrutura fosfodiéster e não requer síntese de DNA (Nay e O'Connor, 2013). De acordo com o tipo de lesão, podem ser recrutadas duas principais enzimas: (1) família ALKBH, que catalisa a reversão direta de certas lesões N-alkil (1meA e 3meC) através de uma reação de desalquilação oxidante única ou (2) O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT), que remove grupos O⁶-metil de O⁶-metilguanina (O⁶meG) (Fu, Calvo e Samson, 2012).

Em humanos, a enzima MGMT atua transferindo o grupamento metil ou cloroetil da guanosina alquilada para um resíduo interno de cisteína no seu sítio ativo (Figura 2) (Kaina et al., 2007). Para cada lesão reparada, uma molécula de MGMT é inativada através de ubiquitinação, seguindo para degradação pelo proteassoma (Xu-Welliver e Pegg, 2002). Quando o aduto não é removido, a O⁶meG é reconhecida como adenina, resultando em um polimorfismo de nucleotídeo único do tipo transversão (Delaney e Essigmann, 2001).

Dumenco e colaboradores (1993) relataram pela primeira vez que a presença de MGMT está envolvida na prevenção de câncer induzido por nitrosureias. Neste trabalho, ratos com superexpressão de MGMT foram capazes remover adutos O⁶meG eficientemente, suprimindo completamente o desenvolvimento de linfomas tímicos (Dumenco et al., 1993). Por outro lado, ratos com baixa expressão de MGMT foram mais sensíveis a metilação e cloroetilação que ratos selvagens (Shiraishi, Sakumi e Sekiguchi, 2000). Com isso, pacientes com glioblastoma e com baixa expressão de MGMT ou

metilação no promotor de MGMT demonstram maior sensibilidade a medicamentos alquilantes, como a temozolomida (Sonoda et al., 2010).

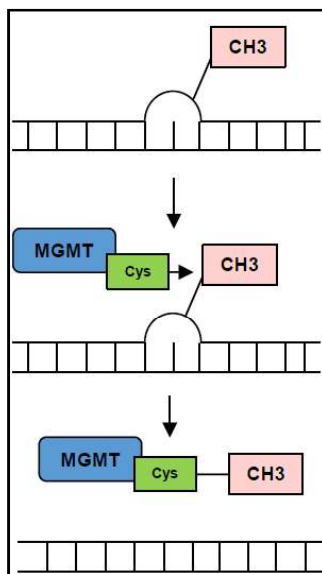


Figura 2. Reparo direto. A enzima O⁶-DNA-metiltransferase (MGMT) transfere o grupamento metil para a cisteína presente no seu sítio ativo, removendo a lesão do DNA. Fonte: adaptado de Fu, Calvo e Samson, 2012.

1.5.2. Reparo de mal pareamento

O reparo de mal pareamento (MMR) é um processo pós replicativo de excisão que remove bases mal pareadas ou mal inseridas, assim como inserções e deleções no DNA que não foram reparadas pelas polimerases replicativas (Jiricny, 2008). Proteínas codificadas pelo gene *Mut* percorrem o DNA recentemente sintetizado em busca destes erros a fim de remover os segmentos de fita simples contendo nucleotídeos incorretos. Este processo mantém a integridade genética reduzindo a taxa de erros associados à replicação de 100 para 1 a cada 10^9 vezes (Peña-Diaz e Jiricny, 2012; Helleday, Eshtad e Nik-Zainal, 2014).

Para promover a distorção da estrutura helicoidal do DNA através da via MMR são necessários dois grupos proteicos: (1) MutS, composto por MSH2 (*MutS homolog 2*), MSH3 (*MutS homolog 3*) e MSH6 (*MutS homolog 6*) e (2) MutL, formado por MLH1 (*MutL homolog 1*), MLH3 (*MutL homolog 3*), PMS1 (*Post Meiotic Segregation Increased 1*) e PMS2 (*Post Meiotic Segregation Increased 2*). Na etapa de reconhecimento da base mal pareada, enquanto MutS α (MSH2/MSH6) é recrutado na presença de lesões pequenas contendo até dois nucleotídeos errôneos, MutS β (MSH2/MSH3) permite a identificação

de deleções ou inserções maiores. Em uma etapa subsequente, a excisão é catalisada pelo heterodímero MutL α (principalmente MLH1/PMS2), com a participação das proteínas PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) e RFC (*Replication Factor C*). Então, as enzimas EXO1 (Exonuclease I) e RPA (*Replication Protein A*) removem a sequência resultante da incisão e a lacuna formada no DNA é preenchida através da ação da Pol δ (DNA *polymerase* δ) com o auxílio de PCNA e RFC. Por fim, uma DNA ligase religa a extremidade recém-sintetizada com a fita original (Christmann et al., 2003; Hsieh e Yamane, 2008; Li, 2008). A Figura 3 ilustra a via MMR com as principais proteínas envolvidas no reparo, utilizando como exemplo o reconhecimento de uma lesão pequena através de MutS α .

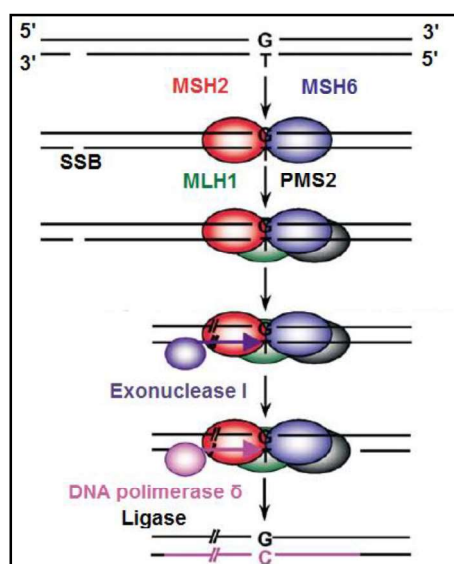


Figura 3. Reparo de mal pareamento. A base mal pareada é reconhecida pelo heterodímero MutS α (MSH2/MSH6), que se complexa com MutL α (MLH1/PMS2) para realizar a excisão. Em seguida Exo1 remove a sequência e Pol δ insere a base correta. Fonte: Christmann et al., 2003.

A presença de mutações em genes chave desta via provocam perda total ou parcial de alguns componentes desta, caracterizando a sua deficiência. A principal consequência de tal disfunção é o surgimento da Síndrome de Lynch, ou Câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC) (Edelbrock, Kaliyaperumal e Williams 2009). A Síndrome de Lynch é uma doença autossômica dominante, com surgimento precoce (<45 anos), caracterizada por um risco aumentado de desenvolvimento de câncer, principalmente colorretal (após os 70 anos de idade) (Hsieh e Yamane, 2008). As mutações mais frequentes ocorrem nos genes MSH2 e MLH1, correspondendo a aproximadamente 95% dos casos (Peltomaki e Vasen, 1997).

1.5.3. Reparo por excisão de bases

Quebras simples (*single-stranded breaks*, SSB) e pequenas modificações no DNA que não distorcem a dupla hélice são reparadas através do reparo por excisão de bases (BER) (Sharma e Dianov, 2007). A maioria das alterações de uma única base é causada pelo próprio metabolismo celular, embora também possa ser provocada por produtos químicos ambientais, tratamento com produtos citostáticos ou radiação ionizante (Lindahl, 1993). A instabilidade no DNA que leva a alquilação, oxidação, redução ou fragmentação de bases gera produtos como incorporação de uracila, pirimidinas fragmentadas, purinas N-alquiladas (7-metilguanina, 3-metiladenina, 3-metilguanina), 8-oxo-7,8dihidroguanina (8-OxoG) e timina glicol (Christmann, et al., 2003).

O BER é um processo multienzimático que, de maneira geral, requer quatro principais enzimas: uma DNA glicosilase, uma AP endonuclease ou AP DNA liase, uma DNA polimerase e uma DNA ligase (Figura 4) (Robertson et al., 2009). Na etapa inicial do reparo, as DNA glicosilases são responsáveis por reconhecer e remover o dano ou a base incorreta gerando um sítio abásico (sítio AP) (Krokan e Bjøra, 2013). Atualmente, são reconhecidas 11 DNA glicosilases em células de mamíferos, caracterizadas por diferentes modos de ação (Dianov e Hubscher, 2013). De acordo com o mecanismo catalítico, tais enzimas são classificadas como monofuncionais, pois removem as bases modificadas deixando um sítio AP no DNA (ex.: UNG, *uracil-DNA glycosylase*) ou como glicosilases bifuncionais, que removem a base e subsequentemente clivam o sítio AP (ex: OGG1, *8-Oxoguanine glycosylase*) (Jacobs e Schär, 2012).

APE1 (*Apurinic/aprimidinic endonuclease 1*), portanto, reconhece e cliva o esqueleto fosfodiéster em 5' do sítio AP, criando uma quebra simples flanqueada por uma terminação 3'-OH e um grupamento 5'-desoxirribose fosfato (5'-dRP). De maneira alternativa, algumas DNA glicosilases bifuncionais (OGG1 e NTH1, *endonuclease III homologue*) também podem contribuir com a incisão do esqueleto de DNA através da reação de β -eliminação, criando uma lacuna de nucleotídeo único, flanqueado por 5'-fosfato e 3'- α,β -aldeído insaturado. A partir disso, APE1, além de sua atividade endonuclease principal,

auxilia na remoção do 3'- α,β -aldeído insaturado, restaurando a extremidade 3'-OH (Carter e Parsons, 2016).

A partir deste momento o BER pode seguir duas vias distintas: via curta (SP-BER, *short-patch BER*), que repara apenas uma base ou via longa (LP-BER, *long-patch BER*), responsável pelo reparo de duas a oito bases. Os mecanismos pelos quais o direcionamento para uma ou outra via ocorrem ainda não foram totalmente elucidados. Acredita-se que a decisão pode ser dependente da disponibilidade de ATP na proximidade do sítio AP ou do tipo de intermediário que é gerado após a incisão (Robertson et al., 2009).

Na via curta, Pol β (DNA *polymerase* β) corrige o erro inserindo a nova base de maneira simultânea com a remoção de 5'-dRP. Em seguida, a ligação é feita através da interação entre DNA ligase III com XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing protein 1*) e PARP1 [*poly(ADP-ribose) polymerase-1*]. Já na via longa, a inserção dos novos nucleotídeos ocorre através da ação das polimerases β , δ ou ϵ (Pol ϵ , DNA *polymerase* ϵ) em conjunto com PCNA e RFC. Por fim, a remoção de 5'-dRP é realizada pela enzima FEN1 (*Flap structure-specific endonuclease 1*) e a ligase I promove a ligação da nova fita, ambas com o auxílio de PCNA (Christmann, et al., 2003; Carter e Parsons, 2016).

Alterações na expressão de DNA glicosilases têm sido identificadas em doenças neurodegenerativas, como a diminuição de APE1 em pacientes com esclerose lateral amiotrófica e o aumento de OGG1 na substância negra de pacientes com Parkinson (Maynard et al., 2009). Mutações e polimorfismos em Pol β , OGG1 e XRCC1 são associados ao risco de desenvolvimento de câncer de próstata (Dobashi et al., 1994; Altieri et al., 2008).

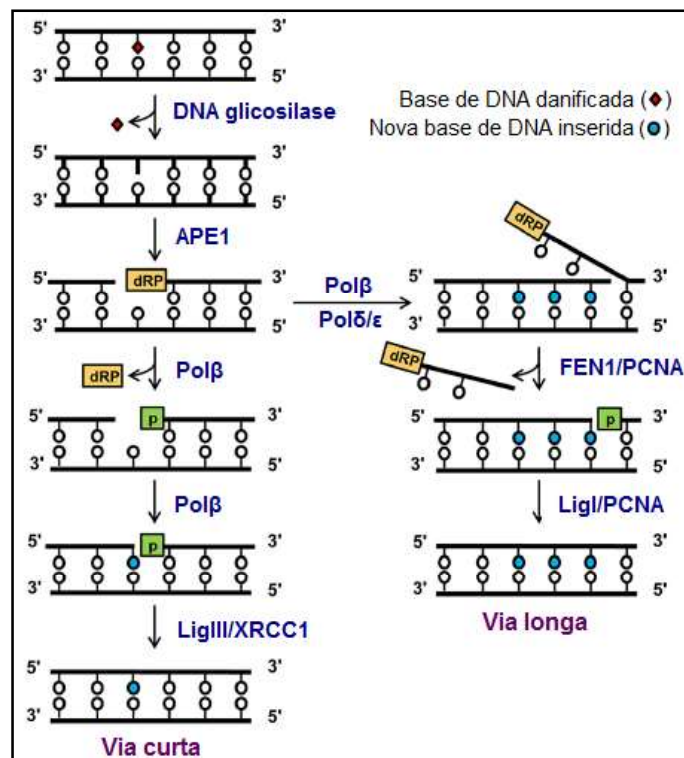


Figura 4. Mecanismos de reparo por excisão de bases. A lesão é reconhecida e removida por DNA glicosilases e sofre a ação de uma endonuclese AP. Em seguida, de acordo com o tipo de lesão, o BER é realizado através da via curta ou via longa. Fonte: adaptado de Carter e Parsons, 2016.

1.5.4. Reparo por excisão de nucleotídeos

O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é um processo inespecífico, ativado após a detecção de lesões volumosas que distorcem a dupla hélice do DNA (Helleday, Eshtade Nik-Zainal, 2014). Esses danos são causados por fotolesões (6,4-fotoprodutos; 6-4PP) e dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) induzidos por radiação ultravioleta; adutos químicos oriundos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos como o benzo(a)pireno, presente na fumaça do cigarro e *crosslinks* induzidos por agentes quimioterápicos, como a cisplatina. O NER também tem sido relacionado com a remoção de lesões menores, resultantes de oxidações e alquilações (Altieri et al., 2008; Takaishi et al., 2009).

De acordo com o tipo de lesão e as proteínas envolvidas, o mecanismo de excisão de nucleotídeos subdivide-se em reparo do genoma global (GGR, *global genome repair*) e em reparo acoplado à transcrição (TCR, *transcription coupled repair*) (Figura 5) (Christmann, et al., 2003). O GGR examina todo o genoma identificando lesões e, por este motivo, é um processo relativamente lento e menos eficiente. Por outro lado, o TCR elimina lesões que causam

distorções nas regiões ativas da cromatina levando ao bloqueio da RNA Pol II (*RNA polymerase II*) e, conseqüentemente, da maquinaria de transcrição (Melis, Steeg e Luijten, 2013).

O reconhecimento por GGR ocorre pela ação do complexo formado entre XPC (*Xeroderma pigmentosum complementation group C*), HR23B (*UV excision repair protein RAD23 homolog B*) e centrin2 ou através do complexo UV-DDB (*UV-damaged DNA binding*) composto pelas proteínas DDB1 (*DNA damage-binding protein 1*) e DDB2 (*DNA damage-binding protein 2*). Enquanto XPC possui alta especificidade para 6-4PPs e pode reconhecer danos causados por agentes alquilantes e radiação ionizante, UV-DDB tem alta especificidade para CPDs (Wakasugi et al., 2001; Hey et al., 2002).

O TCR é ativado através da interação da RNA Pol II com as proteínas de reconhecimento de lesão, CSA e CSB (*Cockayne syndrome complementation group A and B*) (Patel, Venkatesh, e Edwards, 2004; Schärer, 2013). Ainda nesta sub-via, são recrutados para a cromatina os fatores de remodelagem XAB2 (*Xeroderma pigmentosum complementation group A binding protein 2*), HMGN1 (*High mobility group nucleosome binding domain 1*) e TFIIS (*Transcription factor S-II*) (Fousteri e Mullenders, 2008).

A partir deste momento, GGR e TCR convergem para uma via comum, que se inicia com uma nova verificação da lesão através de XPA (*Xeroderma pigmentosum group A*) e da proteção da cadeia não danificada pela RPA (*Replication protein A*) (Evans et al., 1997). Após a formação do complexo TFIIH (*Transcription factor II human*), composto por 10 subunidades: XPD (*Xeroderma pigmentosum group D*), XPB (*Xeroderma pigmentosum group B*), p52, p8, p62, p34, p44 e CAK (*Cyclin-activated kinase*, formada por CDK7, *cyclin H* e MAT1), ocorre o desenrolamento da dupla fita de DNA, principalmente pela atuação de XPB e XPD, que possuem atividade de helicase (Schärer, 2013). A etapa de incisão acontece através da ação das endonucleases XPF (*Xeroderma pigmentosum group F*) e XPG (*Xeroderma pigmentosum group G*) nas extremidades 5' e 3', respectivamente. A lacuna de cadeia simples recém-formada é então preenchida por Pol ϵ ou Pol δ juntamente com PCNA e as bases são ligadas pela DNA ligase I (Shivji, 1995; Overmeer et al., 2010).

Conforme demonstrado, a atividade do NER depende da função coordenada e sequencial de aproximadamente 30 proteínas (Melis, Steeg e Luijten, 2013). Defeitos nesta via provocam doenças genéticas autossômicas recessivas, tais como *Xeroderma pigmentosum*, caracterizadas por mutações nos genes XPA, XPB, XPD e XPG; Síndrome de Cockayne, apresentando mutações principalmente em CSA e CSB; e Tricotodistrofia, associada a mutações em XPB e XPD (Lehmann, 2003; Altieri et al., 2008; Cleaver, Lam e Revet, 2009).

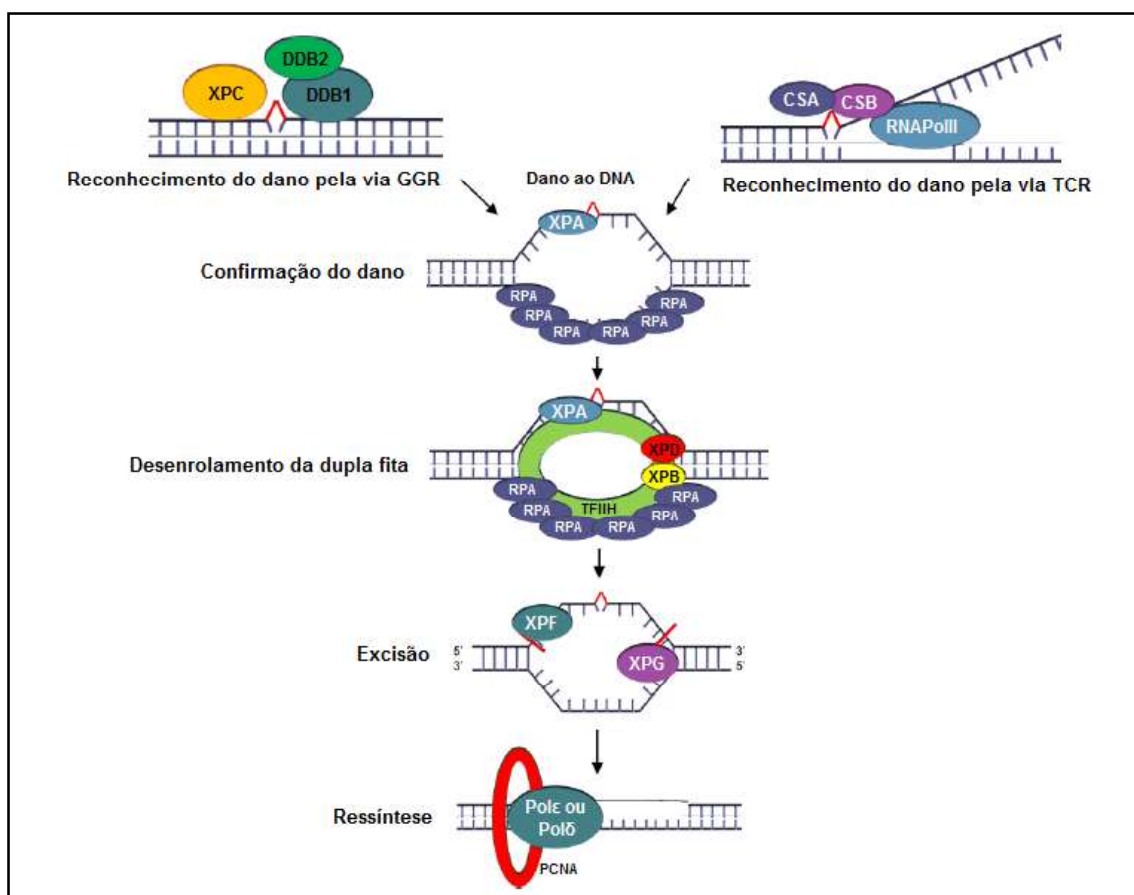


Figura 5. Reparo por excisão de nucleotídeos. O dano é inicialmente reconhecido por XPC ou UV-DDB (DDB1 e DDB2) no reparo do genoma global (GGR), e por CSA e CSB quando recrutados pela RNA Pol II no reparo acoplado à transcrição (TCR). XPA e RPA confirmam a presença do dano e protegem a cadeia de DNA não danificada, respectivamente. XPA e XPB, parte do complexo TFIIH, desenrolam a fita do DNA. XPF e XPG promovem a incisão da fita contendo a lesão e a lacuna é preenchida por Polε ou Polδ. A ligação ocorre através da DNA ligase I. Fonte: adaptado de Helleday, Eshtad e Nik-Zainal, 2014.

1.5.5. Reparo de quebras duplas

Quebras duplas no DNA (*double-stranded breaks*, DSB) são lesões altamente citotóxicas e podem levar a aneuploidia, aberrações genéticas e morte celular (Krejci et al., 2012). Esses danos podem ocorrer naturalmente

enquanto topoisomerasas desenrolam o DNA ou serem induzidos por radiação ionizante ou quimioterápicos (Helleday et al., 2008). As duas vias responsáveis por realizar o reparo das DSBs são a recombinação homóloga (HR) e a junção de extremidades não-homólogas (NHEJ). Ao contrário da HR, NHEJ é passível de erros (*error prone*), e constitui a principal forma de reparo de DSBs em células de mamíferos. Além disso, enquanto HR ocorre principalmente durante o processo de replicação, nas fases S tardia e G2 do ciclo celular, NHEJ é predominante nas fases G0/G1 (Pfeiffer, Goedecke e Obe, 2000; Lord e Ashworth, 2012).

1.5.5.1. Recombinação homóloga

A recombinação homóloga (HR) envolve um cromossomo danificado e uma molécula de DNA íntegra que é utilizada como molde para o reparo (Renkawitz, Lademann e Jentsch, 2014). O reconhecimento da lesão inicia-se com a ligação do complexo MRE11-RAD50-NBS1 nas extremidades quebradas do DNA (Stracker e Petrini, 2011). A subunidade portadora da atividade nucleasa, MRE11, se liga a proteína CtIP (*CtBP-interacting protein*) iniciando a ressecção da extremidade 5'. Durante esse processo, a formação da simples fita de DNA (ssDNA, *single-stranded DNA*) continua através da ação de Exo1 em conjunto com o complexo BLM-TopoIII α -RMI1/RMI2 (BTR)-DNA2, que possui atividade helicase-endonucleasa (Symington e Gautier, 2011).

Em seguida, RPA atua protegendo a ssDNA da formação de estruturas secundárias para que haja a incorporação correta de filamentos RAD51 (*DNA repair protein RAD51 homolog 1*) mediada por BRCA2 (*Breast cancer 2*) e RAD52 (*DNA repair protein RAD52 homolog*) ou por proteínas homólogas a RAD51, como RAD51B (*RAD51 paralog B*), RAD51C (*RAD51 paralog C*), RAD51D (*RAD51 paralog D*), XRCC2 (*X-ray repair cross complementing 2*) e XRCC3 (*X-ray repair cross complementing 3*) (Heyer, Ehmsen e Liu, 2010). RAD51 é responsável pela formação de um filamento pré sináptico de nucleoproteína na ssDNA que parecia com um duplex homólogo não danificado encontrado durante o processo de pesquisa de homologia (Forget e Kowalczykowski, 2010). Há, portanto, a invasão da cadeia de DNA não danificada gerando um *loop* de deslocamento (*D-loop*) e o início da síntese de DNA a partir da extremidade 3' (Heyer, Ehmsen e Liu, 2010). Por fim, a

segunda extremidade de DSB alinha-se com o *D-loop* estendido e as estruturas resultantes são resolvidas de acordo com o modelo clássico de Holliday (Christmann, et al., 2003). Um modelo esquemático simplificado da via HR pode ser observado na Figura 6.

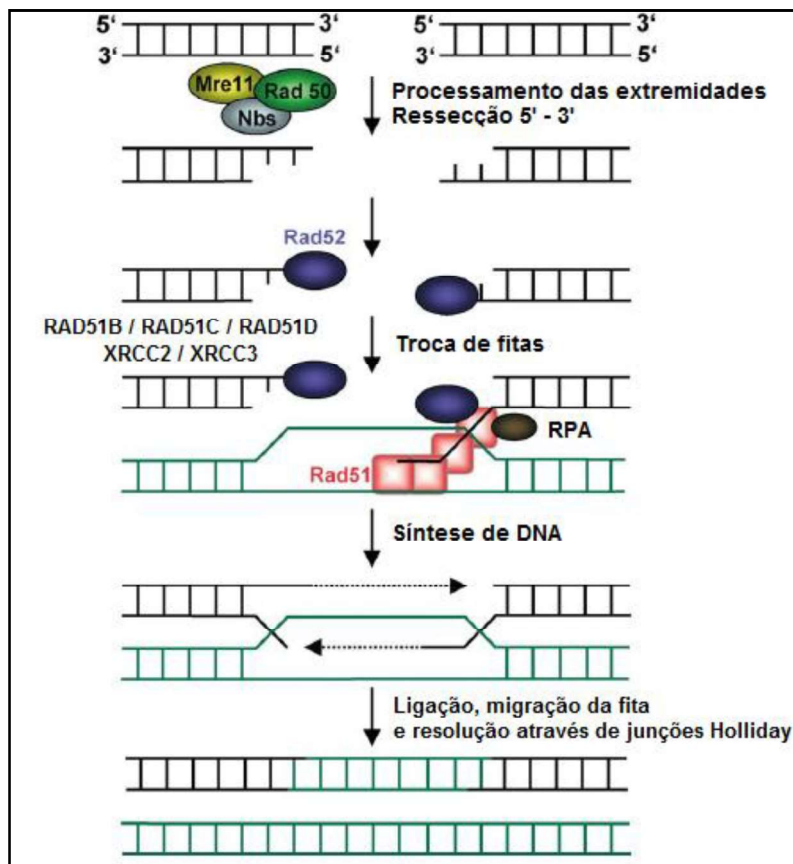


Figura 6. Recombinação homóloga. O reparo inicia com a identificação e ressecção da DSB através do complexo MRE11-RAD50-NBS1. RAD52 liga-se à extremidade 3' recém formada e permite a inserção de um filamento de RAD51, facilitado por proteínas homólogas (RAD51B, RAD51C e RAD51D, XRCC2 e XRCC3). Após a síntese de DNA, ligação e migração das fitas, a estrutura resultante é classicamente resolvida através de junções Holliday. Fonte: Christmann, et al., 2003.

Dada a importância de RAD51 e de seus reguladores no reparo de lesões através do processo de HR, alterações genéticas nestas proteínas podem predispor ao surgimento de tumores (Krejci et al., 2012). Mutações heterozigóticas em BRCA2 e RAD51C, por exemplo, aumentam a susceptibilidade para câncer de ovário e de mama, enquanto a translocação de RAD51B é associada ao fibromioma uterino (Schoenmakers, Huysmans e Vem, 1999; Levy-Lahad e Friedman, 2007; Meindl et al., 2010). Em adição, mutações na helicase BLM podem levar ao desenvolvimento da Síndrome de

Bloom, que causa envelhecimento precoce e eleva o risco de desenvolvimento de câncer (Chu e Hickson, 2009).

1.5.5.2. Junção de extremidades não-homólogas

O sistema de junção de extremidades não-homólogas (NHEJ) liga as duas extremidades da DSB sem buscar homologia com sequências conservadas de DNA (Figura 7). Como consequência, este processo pode causar deleções ou mutações no local ou ao redor da DSB (Lord e Ashworth, 2012). Na primeira etapa da via NHEJ, as proteínas KU70 e KU80 reconhecem e protegem a fita contendo o dano (Christmann et al., 2003). Há, então, o recrutamento e associação da subunidade catalítica da DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) com o complexo de XRCC4 (*X-Ray repair cross complementing 4*) e LIG4 (*DNA ligase IV*) (Dynane Yoo, 1998). A ligação das duas extremidades através de XRCC4/LIG4 ocorre após as DSBs terem sido processadas pelo complexo MRE11-Rad50-NBS1, que remove o excesso de *flaps* (estruturas em aba) 5' e 3' (Stracker et al., 2004). Em adição, a obtenção da atividade exonuclease específica de cadeia simples pela DNA-PK, ocorre pela união com a proteína Artemis. Através deste complexo, Artemis é fosforilado e passa a atuar como uma endonuclease (Moshous et al., 2001).

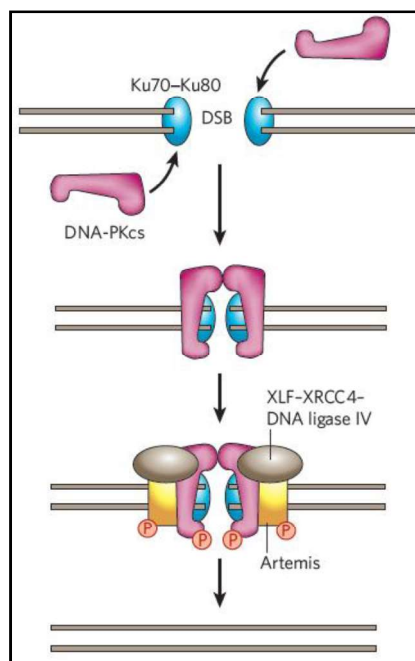


Figura 7. Junção de extremidades não-homólogas. A DSB é reconhecida através de KU70 e KU80. DNA-PK é recrutada e ativa o complexo XRCC4/LIG4 que une as duas extremidades após o processamento realizado pelo complexo MRE11-Rad50-NBS1 e pela proteína Artemis. Fonte: adaptado de Downs, Nussenzweig e Nussenzweig, 2007.

Em humanos, algumas doenças são associadas a defeitos na capacidade de reparo das DSBs por enzimas presentes na via NHEJ. A deficiência de LIG4 provocada por mutações, leva ao desenvolvimento da Síndrome LIG4, uma desordem autossômica recessiva rara caracterizada por microcefalia, sensibilidade à radiação ionizante e imunodeficiência combinada (Altmann e Gennery, 2016). Pacientes portadores de mutações que alteram a função da proteína Artemis sofrem com imunodeficiência severa combinada com sensibilidade a radiação ionizante, ou com a Síndrome de Omenn (Pannicke et al., 2009).

1.6. Reparo do DNA e tumorigênese da tireoide

A exposição à radiação ionizante, principal fator de risco para o desenvolvimento de CDT, pode provocar várias lesões na estrutura do DNA, incluindo quebras simples e duplas, ruptura de cromossomos e troca de nucleotídeos devido à geração de radicais livres (Little, 2000; Veiga et al., 2012). Com isso, a alteração na expressão gênica e proteica, assim como a presença de polimorfismos e metilação de diversos genes do sistema de reparo do DNA tem sido descritos no câncer de tireoide. A Figura 8 demonstra a associação do câncer de tireoide com as principais vias de reparo já descritas.

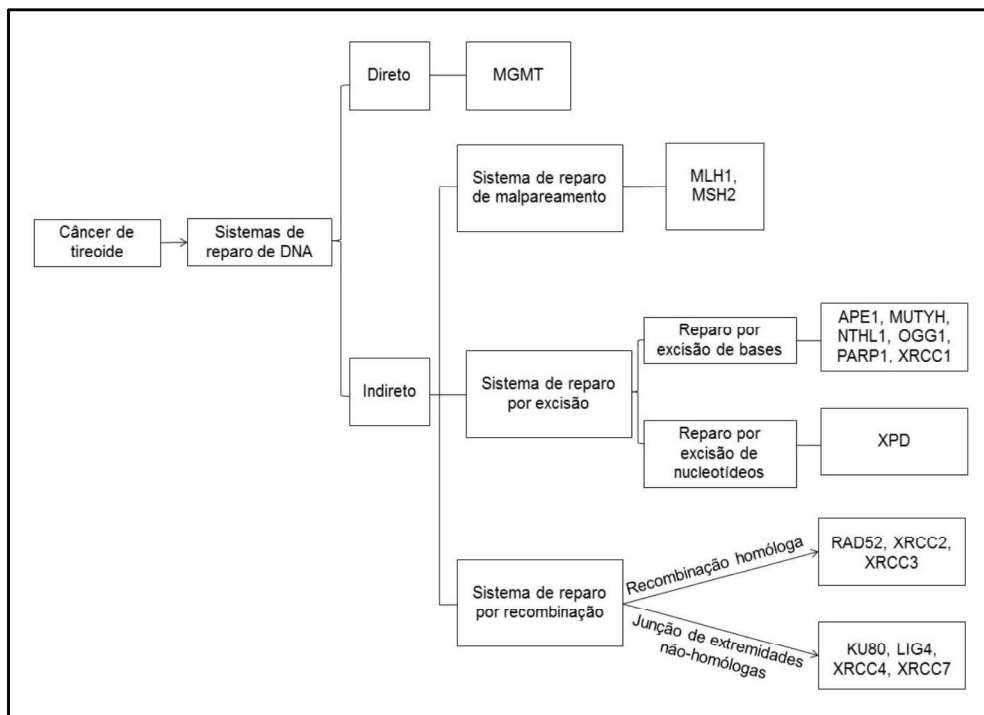


Figura 8. Câncer de tireoide e mecanismos de reparo do DNA. Adaptado de Gatzidou et al. (2010).

Na via DR, a proteína MGMT está mais expressa em lesões benignas do que em lesões malignas da tireoide (Giaginis et al., 2011). No entanto, não foi encontrada correlação entre a diminuição da expressão de *MGMT* e/ou hipermetilação com a presença de mutações em tumores tireoidianos, sugerindo que a regulação da expressão de *MGMT* não passa por mecanismos epigenéticos neste tipo tumoral (Santos et al., 2013).

Na via MMR, a proteína MLH1 é mais expressa em lesões malignas quando comparada com lesões benignas da tireoide, sendo que MSH2 aparentemente não apresenta diferença significativa entre os dois tipos de lesão (Giaginis et al., 2011). Ainda neste sistema de reparo, apesar de não encontrarem mutações, Ruschenburg e colaboradores (2006) observaram MLH1, MSH2 e PMS1 mais expressas em lesões malignas da tireoide. Por sua vez, a baixa expressão e a hipermetilação do gene MLH1 foram relatadas na tumorigênese do carcinoma de tireoide, especialmente quando associadas à mutação *BRAF*^{V600E}, rearranjos *RET* e transições *NRAS* e *IDH1* (*Isocitrate dehydrogenase 1*) (Guan et al., 2008; Santos et al., 2013).

Com relação à via BER, a associação dos polimorfismos em *XRCC1* e *PARP1* pode aumentar a susceptibilidade para CDT e metástases em linfonodos (Chiang et al., 2008). Apesar de outros trabalhos também terem identificado polimorfismos em *XRCC1*, uma meta-análise concluiu que não há correlação da sua presença com o risco para carcinoma de tireoide (Ho et al., 2009; García-Quispes et al., 2011; Wu et al., 2014). Karger et al. (2012) revelaram que a expressão gênica de *OGG1*, *MUTYH* (*MutY DNA glycosylase*) e *NTHL1* (*NTH like DNA glycosylase 1*) está diminuída no CFT quando comparada com o adenoma folicular, podendo colaborar para a formação de tumor a partir de uma lesão benigna. De maneira individual, polimorfismos em *XRCC1*, *PARP1*, *MUTYH* e *OGG1* não foram relacionados com a susceptibilidade individual para carcinoma de tireoide (Santos et al., 2012).

Em adição, *APE1*, que está presente no núcleo e no citoplasma de células foliculares normais da tireoide, constitui um importante foco de estudo. A alteração na sua expressão e localização pode contribuir para a regulação anormal da diferenciação e proliferação celular, fatores essenciais para a carcinogênese tireoidiana (Gatzidou et al., 2010). Até o momento, não foi

encontrada diferença significativa entre os grupos caso e controle para a presença de APE1-Asp148Glu (Chiang et al., 2008; Santos et al., 2012).

No NER, Silva e colaboradores (2005) avaliaram a presença dos polimorfismos G23591A no exon 10 e A35931C no exon 23 do gene XPD. Indivíduos simultaneamente homozigotos para ambos os polimorfismos apresentaram risco aumentado para câncer de tireoide, especialmente para CPT. Na população ucraniana, portadores de polimorfismos em XPD expostos a radiação ionizante pós Chernobyl também possuem maior propensão para o surgimento de neoplasias tireoidianas (Shkarupa et al., 2015).

Quanto ao reparo de DSBs, na via HR polimorfismos no gene XRCC3 têm sido frequentemente descritos e indicam um risco até três vezes maior para CDT (Sturgis et al., 2005; Bastos et al., 2009; Yan et al., 2016). Polimorfismos em RAD52 também podem estar associados com o desenvolvimento e progressão de CPT (Siraj et al., 2008). Estudos recentes sugerem que variações genéticas na região codificadora de XRCC2 não possuem efeitos na susceptibilidade para CDT (Fayaz et al., 2012; Yan et al., 2016). Já na via NHEJ, polimorfismos no alelo 3434Thr de XRCC7 foram relacionados com risco de CDT em uma população iraniana (Rahimi et al., 2012). Enquanto polimorfismos nos genes XRCC4 e LIG4 não possuem correlação com câncer de tireoide, dois polimorfismos em KU80 foram associados a risco aumentado para CPT (Gomes et al., 2010).

Considerando, portanto, que a tumorigênese da glândula tireoide envolve um processo complexo de interação gênica, é fundamental identificar novos marcadores moleculares prognósticos e de agressividade tumoral. Para os carcinomas da tireoide, pouco se sabe sobre o papel dos componentes do sistema de reparo de DNA na gênese e comportamento tumoral. Desta forma, tendo em vista que o tecido tireoideano está sujeito a diversas injúrias causadas por agentes endógenos e exógenos, justifica-se a necessidade de uma melhor compreensão do perfil de expressão do sistema de reparo do DNA no CPT, bem como sua correlação com aspectos clínico-patológicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil de expressão de genes de diferentes vias de reparo do DNA em pacientes com carcinoma papilar da tireoide.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar uma análise comparativa dos níveis da expressão de genes das vias de reparo direto do DNA, MMR, BER, NER, HR e NHEJ em carcinomas papilares da tireoide com os tecidos adjacentes normais pareados;
- Correlacionar os dados de expressão gênica das vias de reparo do DNA com dados clínico-patológicos;
- Avaliar a presença da mutação BRAF^{V600E} assim como a sua correlação com dados clínico-patológicos;
- No tecido tumoral, avaliar a presença das proteínas com expressão gênica significativamente alterada, correlacionando com dados clínico-patológicos.

3. ARTIGO

Revista: Molecular and Cellular Endocrinology

Impact factor: 3.859

Manuscript title: Imbalance in DNA repair machinery is associated to tumor aggressiveness and may have a potential prognostic value in papillary thyroid carcinoma

Bruna S. Lutz¹, Natalia M. Leguisamo¹, Nicole K. Cabral¹, Helena C. Gloria¹, Keli C. Reiter²; Grasiela Agnes³; Virgilio Zanella⁴, Erika L. S. Meyer⁴, Jenifer Saffi^{1*}

¹Laboratory of Genetic Toxicology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Laboratory of Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Laboratory of Molecular Biology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁴ Thyroid Section, Endocrine Division, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed. Laboratory of Genetic Toxicology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. jenifers@ufcspa.edu.br. Tel: +55 51 33038861.

Abstract

The role of DNA repair in papillary thyroid carcinoma (PTC) malignancy remains largely unknown. Molecular changes such as polymorphisms in genes of different pathways and few studies associating gene or protein expression with characteristics of poor prognosis have been described. Considering the lack of data on the behavior of different DNA repair systems and the absence of paired studies, this work aimed to investigate the expression profile of 11 representative genes of the main DNA repair pathways in PTC samples. Thirty-two consecutive PTC and surrounding normal thyroid tissues were obtained from patients undergoing total thyroidectomy. Gene expression was assessed by real time PCR. Genes that exhibited their mRNA expression altered had its protein product evaluated by immunohistochemistry. Data were correlated to BRAF^{V600E} mutational status and clinicopathological characteristics. Direct repair (*MGMT*) and homologous recombination (*XRCC2*) genes were shown down and upregulated, respectively, in tumor samples when compared to parental normal tissue. *MGMT* direct gene repair was significantly correlated to characteristics of tumor aggressiveness. Homologous recombination (*XRCC2*) low protein expression was significantly correlated to minimum local invasion. These results, particularly for *MGMT*, suggest that DNA repair gene expression is associated to increased tumor aggressiveness and may have a potential prognostic value in PTC.

Keywords: papillary thyroid cancer, DNA repair, gene expression, BRAF^{V600E}, tumor aggressiveness, *MGMT*.

1. Introduction

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is responsible for up to 95% of malignant thyroid tumors and the majority of patients have a favorable outcome (Zhu et al., 2015; Howlader et al., 2016). However, 15% will develop local tumor recurrence and 5-10% will have distant metastasis (Mazzaferri and Jhiang, 1994; Sherman, 2003). Clinical and pathological factors of tumor aggressiveness and recurrence include age over 45 years, male sex, size of primary tumor, histological classification, multifocality, tumor extension and presence of BRAF^{V600E} mutation (Zhu et al., 2015; Fagin and Wells, 2016). Despite the etiology of PTC is still unknown, exposure to ionizing radiation in childhood is a known-established risk factor (Ron et al., 1995; Inskip, 2001; Sinnott, Ron and Schneider, 2010). These and other injuries including normal metabolic activities of thyroid follicular cells can result in single and double-strand breaks (SSB and DSB, respectively), leading to genetic instability due to generation of free radicals (Little, 2000).

Genomic instability is the universal characteristic of neoplastic cells and, probably, the result of DNA damage, tumor-specific DNA repair deficiencies, and a failure to discontinue cell cycle before the damaged DNA is passed on to daughter cells (Lord and Ashworth, 2012). In mammalian cells, DNA damage response can be performed by different pathways. While direct repair (DR) removes inappropriately methylated guanine residues in DNA (Kaina et al., 2007), other DNA injuries may be repaired normally by excision of lesion and repair synthesis, executed by base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER), and mismatch repair (MMR) (Friedberg, 2001; Lord and Ashworth, 2012). Additionally, the repair by recombination is a crucial cellular defense system that removes very toxic DNA lesions, such as double-stranded breaks (DSB). Unrepaired or incorrectly repaired DSB lead to chromosome aberrations and cause translocation of genetic material in thyroid cells. Two mechanisms are able to correct DSB, homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ) (Mao et al., 2008).

Polymorphisms in DNA repair genes have been associated to development of thyroid cancer (for review see Gatzidou et al., 2010). Although polymorphisms in BER genes (for example, XRCC1, X-ray repair cross-complementing protein 1 and PARP1, Poly (ADP-ribose) polymerase-1) have been identified as

predisposing factors for thyroid cancer and presence of lymph node metastases, meta-analyzes studies indicate that these results should be interpreted with caution (Chiang et al., 2008; Ho et al., 2009; Wu et al., 2014). Patients with somatic mutations in XPD (Xeroderma pigmentosum group D), an helicase of NER pathway, and that were exposed to ionizing radiation after Chernobyl accident have a higher risk for thyroid neoplasms (Shkarupa, et al., 2015). Meanwhile, polymorphisms in XRCC3 (X-ray repair cross complementing 3), a DSB repair protein, indicate up to two-fold increased risk for differentiated thyroid carcinoma (Sturgis et al., 2005; Yan et al., 2016).

Few studies have focused on DNA repair genes expression profile in thyroid tissues. A previous report demonstrated that the proteic expression of MLH1 (*MutL homolog 1*) of MMR pathway is upregulated and MGMT (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase) of DR is down-regulated in malignant compared to benign thyroid lesions. In addition, altered expression of these pathways in malignant lesions is associated to clinicopathological characteristics of greater aggressiveness, such as larger tumor size and presence of lymphatic and vascular invasion (Giaginis et al., 2011). More recently, down-regulation of MMR in PTC samples was associated to point mutations (BRAF^{V600E}, IDH1 and NRAS) (Santos et al., 2013). These findings suggest a role of DNA repair genes in thyroid tumorigenesis and progression.

Here, we have investigated more widely the expression of DNA repair genes in human PTC. We demonstrated that the *MGMT* is underexpressed in human PTC samples when compared to normal tissues. Reduced expression of *MGMT* was positively correlated with clinicopathological characteristics of tumor aggressiveness. For the first time, we described that *XRCC2* of homologous recombination pathway is highly expressed in PTC tissue.

2. Materials and methods

2.1. Patients and tissues

Tumor and surrounding normal thyroid tissue were collected consecutively from 32 unselected patients diagnosed with PTC attending the Endocrine or Head and Neck Surgery Divisions at *Irmadade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre* – Brazil. Surgery was independently indicated by attending physicians based on clinical indication. Informed consent from all participants and clearance from the Ethical Committees of the participating Institutions were obtained (approval numbers 331.061 and 362.887). We excluded patients who had a history of head and neck irradiation or received chemotherapy prior to surgery. Specimens were frozen in liquid nitrogen after surgical resection and stored at 80°C. Experienced pathologists confirmed final histological classification from paraffin-embedded sections. Tumors were histological classified according to WHO recommendations (Delellis et al., 2004). Clinical stage was determined by Tumor/Node/Metastasis (TNM) system (Edge et al., 2010). The risk of recurrence was classified according to the American Thyroid Association (ATA) (Cooper et al., 2009). The information obtained from this study did not influence or affect the patients' diagnosis or treatment.

2.2. Extraction of nucleic acids and reverse transcription

Total RNA was extracted from 30 mg of frozen tumors and surrounding normal thyroid tissues by RNeasy[®] mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) including a DNase treatment with RNase-Free DNase Set (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). To enrich the tumor specimens, regions of high cellularity were obtained from the central region of the tumor. For DNA extraction, the tissue paraffin-embedded blocks were sectioned at 5 µm without any stain or fixer and the thyroid cancer cells were scraped from the glass slides using a surgical blade. Then, DNA was obtained according the manufacturer's protocol of MagneSil[®] Genomic, Fixed Tissues System (Promega Corporation, Madison, WI, USA). The amount of isolated nucleic acids was determined through spectrophotometry by BioSpec-Nano (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) and the integrity of nucleic acids was confirmed using gel electrophoresis. Reverse transcription was performed from 1 µg of RNA by RT²

PCR Array First Strand Kit (QIAGEN Sciences, Maryland, USA) according to the manufacturer's recommendations.

2.3. Quantitative real-time PCR

Differential DNA repair gene expression between tumor and surrounding normal thyroid tissues were assessed by quantitative real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) on an Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the RT² RNA QC PCR Array (PAHS-999ZC-1, QIAGEN Sciences, Maryland, EUA) quality control plates and the custom RT² Profiler™ PCR Array (CAPH-13265, QIAGEN Sciences, Maryland, EUA). The pathways and the representative genes selected to compose this predesigned assay are detailed as follows: direct repair (*MGMT*, NM_002412), mismatch repair (*MLH1*, NM_000249; *MSH2*, NM_000251), base excision repair (*APE1*, NM_080649; *OGG1*, NM_002542; *XRCC1*, NM_006297), nucleotide excision repair (*XPD*, NM_000400), homologous recombination pathway (*RAD51*, NM_002875; *XRCC2*, NM_005431; *XRCC3*, NM_005432) and non-homologous end joining recombination (*KU80*, NM_021141). Data analysis was based on the $\Delta\Delta C_t$ method and the C_t values were normalized according to the expression of *ACTB* and *B2M* in each sample.

2.4. Immunohistochemistry studies

For protein expression analysis one representative paraffin-embedded block from each case containing tumor tissue was selected. The blocks were sectioned at 4 μ m and submitted to a routine immunohistochemical technique, which included deparaffinization and rehydration, antigen retrieval, inactivation of endogenous peroxidase and blockage of non-specific reactions. The primary antibodies incubated overnight at 4°C were monoclonal mouse anti-*MGMT* (1:100 dilution; #ab81705; Abcam, Cambridge, MA, USA) and polyclonal rabbit anti-*XRCC2* (1:100 dilution; #PA5-32643; Thermo Fisher Scientific, USA). To follow the assay, slides were incubated with the secondary and tertiary antibodies for 30 min each at room temperature (Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System, Spring Bioscience, CA, EUA). Normal human tonsil tissue and testis cancer tissue, respectively, were used as positive control. The

negative control was obtained by omission of the primary antibody. The reaction products were visualized by DAB. Slides were counterstained with hematoxylin. Protein expression was evaluated using immunohistochemistry images of all PTC tissue samples, captured using a DM6 Leica coupled to LAS X system of image capture software (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) at 200× magnification. Five hot spots fields were randomly selected and analyzed through ImageJ Version 1.50i (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) by two blinded observers. All background area was removed by moving brightness and hue sliders. To measure only stained areas, the brightness slider was increased without changing the hue slider, and the immunohistochemistry stained areas were selected. Mean and stained area were recorded to the excel sheet (Sati et al., 2016). The percentages of positively stained follicular cells were obtained by the percentage of the stained area with a given intensity. Specimens were considered positive for MGMT and XRCC2 when more than 5% of follicular cells were stained. The immunoreactivity of follicular cells for MGMT and XRCC2 was scored according to the percentage of stained area as 0: negative staining - 0–4% of tumor positivity; 1: 5–24% of tumor positivity; 2: 25–49% of tumor positivity; 3: 50–100% of tumor positivity. Its intensity was classified as it follows: 0, negative staining; 1, mild staining; 2, intermediate staining; 3, intense staining, based on intensity mean. Finally, both values were multiplied together, and the staining score was stratified as weak (score range, 0–2) or strong (score range ≥3) according to the proportion and intensity of positively stained tumor cells. Both nuclear and cytoplasmic immunostaining were considered to analysis (Giaginis et al, 2011).

2.5. *BRAF*^{V600E} mutation analysis

The exon 15 of *BRAF* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) through Platinum[®]Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen by Life technologies, São Paulo, Brazil) and appropriate primer pairs: forward 5'-CTTCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3' and reverse 5'-CAGGGCCAAAATTTAATCAGTGGA-3'. PCR products were purified with the Illustra[™] GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) as specified by the manufacturer. Sanger sequencing

reaction was performed with the BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) on an ABI PRISM 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). The presence of BRAF^{V600E} mutation was confirmed in both forward and reverse directions by an independent PCR amplification and sequencing reaction.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) statistical software. Descriptive statistics include frequencies and corresponding percentages for binary variables and means for continuous variables. The difference in RNA expression between paired tumor and normal specimens was evaluated using Wilcoxon matched-pair test. To analyze the association between protein expression and clinicopathological characteristics the chi-square test was applied. The correlation of fold change and clinicopathological characteristics was evaluated with either the Mann-Whitney or the Kruskal-Wallis tests. Chi-square test was also conducted to assess the associations between BRAF^{V600E} mutation and clinicopathological characteristics. In all analyses, a two-tailed $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. *MGMT* and *XRCC2* gene expression is altered in papillary thyroid carcinoma

Clinical and pathological characteristics of 32 PTC patients included in this study are detailed in Table 1. The mean age at the moment of the diagnosis was 39.8 ± 14 years. The median size tumor was 2.4 cm (0.7-6.3). All patients presented normal serum TSH levels (0.4-4.0 UI/L) at surgery.

Table 1
Study population characteristics.

Clinicopathological parameters		Number	%
Age (years)	≤45	22	69
	>45	10	31
Gender	Male	4	12.5
	Female	28	87.5
Tumor size	≤2	19	59,0
	>2	13	41,0
Histological variants of PTC	Classic	16	50
	Follicular	11	34
	Encapsulated	4	13
	Warthin-like	1	3
Multifocality	Present	8	25
	Absent	24	75
Minimum local invasion	Present	21	66
	Absent	11	34
Lymph nodes metastasis	Present	9	28
	Absent	23	72
AJCC/TNM stage	I-II	26	81
	III	6	19
Risk of recurrence	Low	13	41
	Intermediate	19	59

PTC: Papillary thyroid carcinoma.

Only 2 of 11 representative DNA repair genes selected exhibited altered gene expression between PTC and respective surrounding normal tissue (Figure 1). The direct repair gene, *MGMT* showed a decrease of 0.36-fold of mRNA expression level in thyroid tumor tissues in comparison to matched normal tissues ($p=0.038$). On the other hand, regarding the homologous recombination pathway, *XRCC2* had its mRNA level significantly higher in thyroid tumor tissues than in the normal tissues with a 0.53-fold higher ($p=0.003$). Relative mRNA expression of the pathway genes is shown in Figure 2.

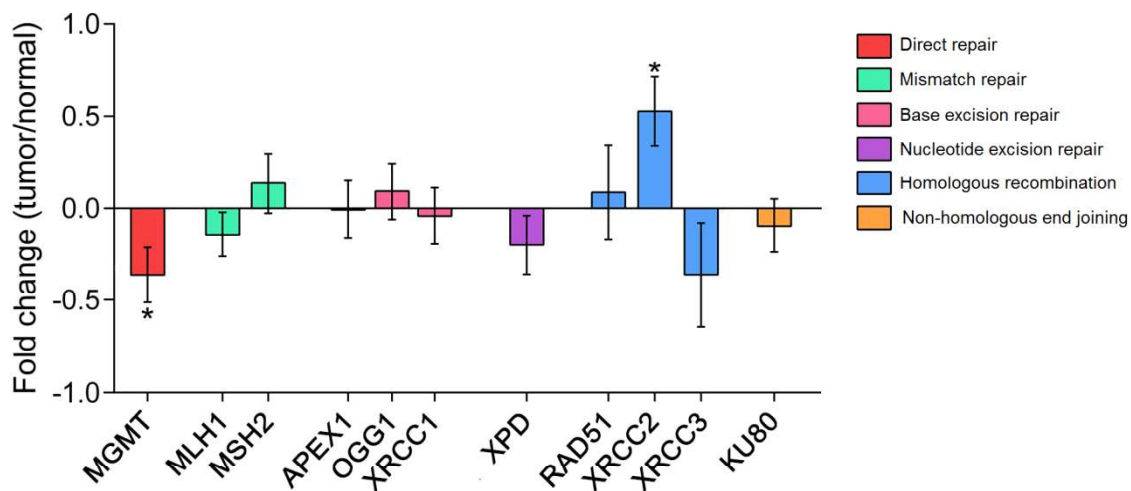


Figure 1. Relative fold change (tumor/normal tissue) in the mRNA expression level between tumor and surrounding normal thyroid tissues was shown as logarithmic scale of relative fold change in expression (RQ) $2^{-\Delta\Delta CT}$ values. The statistical significance of the observed fold change in expression was determined by Mann-Whitney test. * represent statistically significant difference ($p < 0.05$).

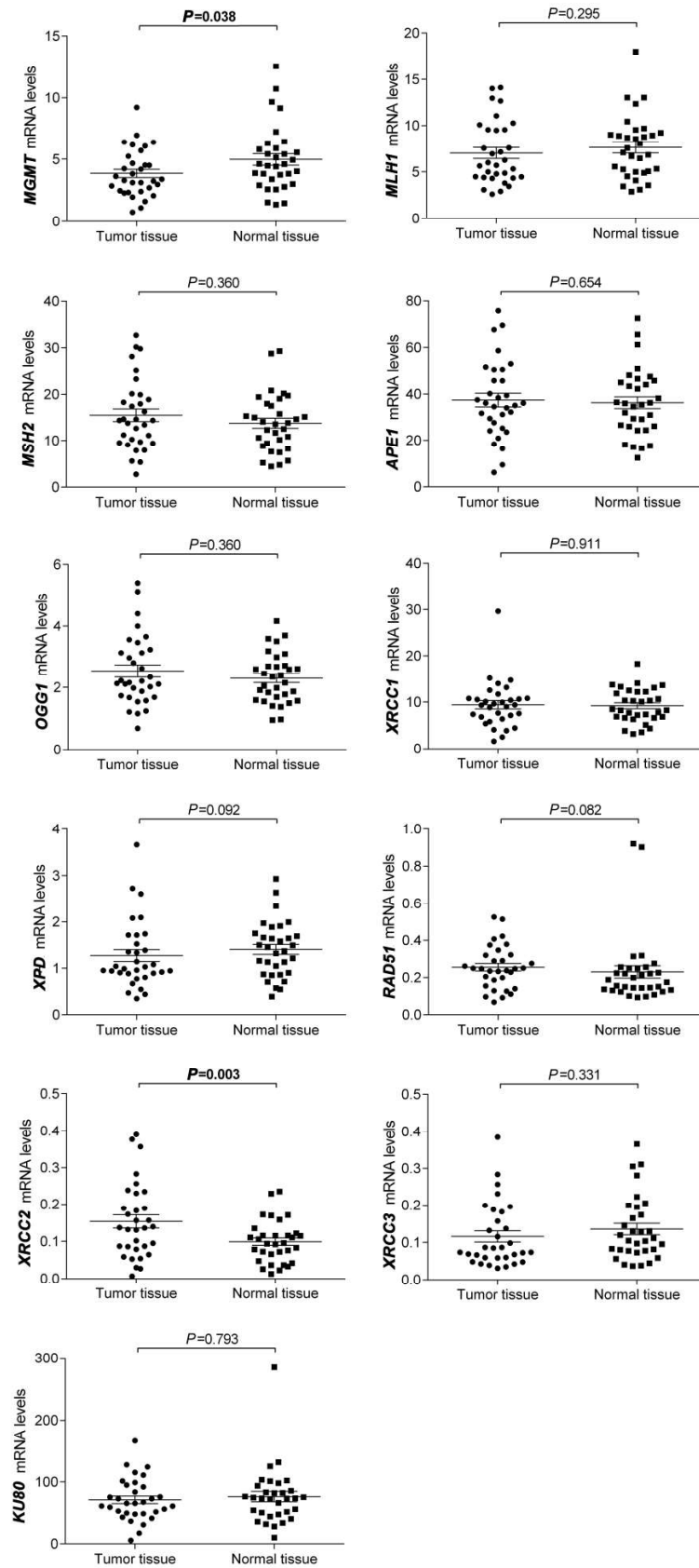


Figure 2. mRNA levels (Δ CT) of the 11 representative DNA repair genes in matched tumor and normal tissues. The statistical significance of the observed change in mRNA expression was determined by Wilcoxon matched-pair test. Significant p values are highlighted in bold font ($p < 0.05$).

3.2. Low *MGMT* gene expression is associated with clinicopathological characteristics of tumor aggressiveness in papillary thyroid carcinoma

All associations between representative genes of six distinct DNA repair pathways (namely, direct repair, MMR, BER, NER, HR and NHEJ) and clinicopathological characteristics are described in Figure 3A. Low *MGMT* fold change was significantly correlated to tumor size less than 2 cm ($p=0.040$), presence of lymph node metastasis ($p=0.002$) and intermediate risk of recurrence ($p=0.002$) (Figure 3B). On the other hand, no correlations were found to *XRCC2* higher expression on tumor tissue and clinicopathological characteristics.

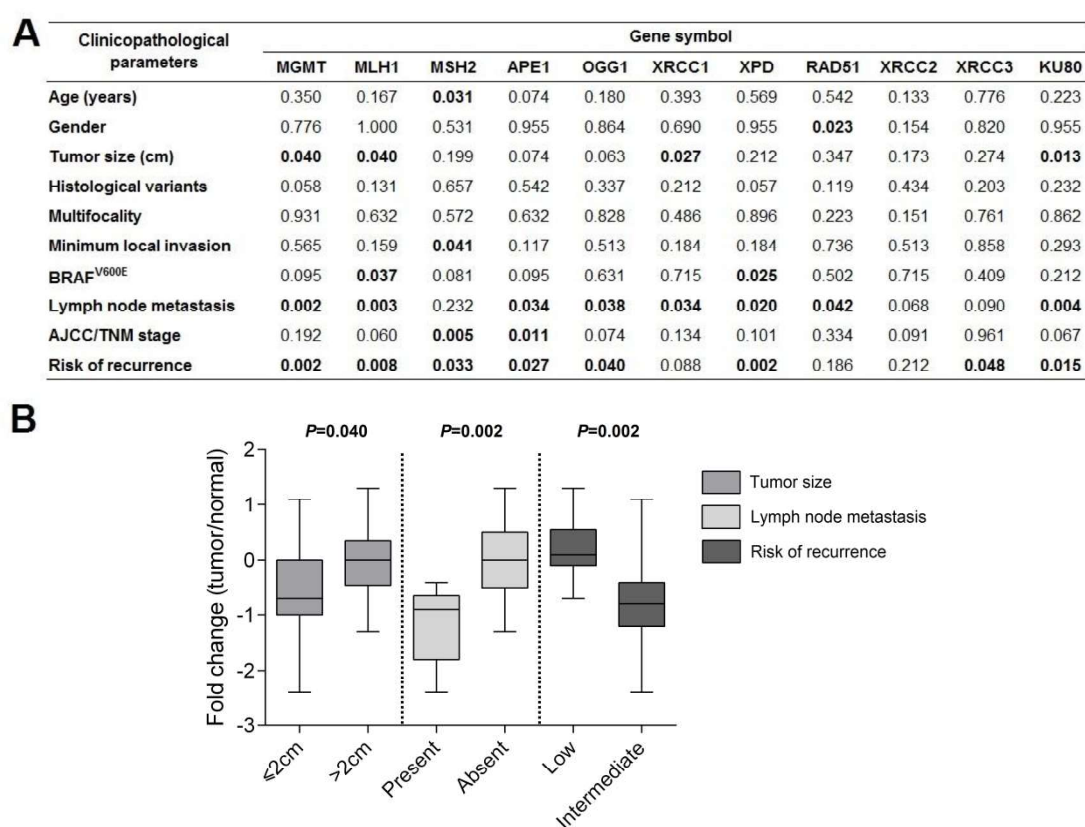


Figure 3. Expression changes in representative pathway genes associated with clinicopathological characteristics in PTC patients. (A) Correlations between gene expression and clinicopathological characteristics were determined; statistical significance was assessed by Mann Whitney or Kruskal-Wallis tests. Statistically significant gene expression correlates of clinicopathological characteristics are highlighted in bold font ($p<0.05$). (B) Box plot showing low *MGMT* expression between tumor and surrounding normal thyroid tissues (y axis) significantly associated with tumor size less than 2 cm, lymph node metastasis presence and intermediate risk of recurrence. Horizontal lines represent the median; the bottom and top of the boxes represent the 25th and 75th percentiles, respectively; and the vertical bars represent the range of data. The statistical significance was determined by Mann Whitney test.

3.3. XRCC2 protein expression is associated with minimum local invasion

Positive protein expression in PTC samples (IHC score >0) was noted in 32 (100%) of cases for MGMT and in 28 (87.5%) out of 32 cases for XRCC2. The pattern of distribution was nuclear and cytoplasmic for MGMT whereas for XRCC2 the distribution was predominantly cytoplasmic. About staining score, MGMT and XRCC2 demonstrated, respectively, strong and weak expression in PTC tissue (Table 2). We found a significant correlation between XRCC2 expression and minimum local invasion ($p=0.040$). Other clinicopathological characteristics were not significantly associated with MGMT or XRCC2 expression. Figure 4 demonstrates representative images of strong and weak expression of MGMT and XRCC2 in PTC tissue compared to their expression in surrounding normal tissue.

Table 2

Protein expression of MGMT and XRCC2 in papillary thyroid carcinoma and correlation with clinicopathological characteristics.

Variable	Number (%)	MGMT			XRCC2		
		Strong	Weak	P value	Strong	Weak	P value
Total cases	32	23 (72)	9 (28)		10 (31)	22 (69)	
Age (years)							
≤45	22 (69)	17 (53)	5 (16)	0.314	6 (19)	16 (50)	0.472
>45	23 (69)	6 (19)	4 (13)		4 (12)	6 (19)	
Gender							
Female	19 (59)	20 (63)	8 (25)	0.882	8 (25)	20 (63)	0.387
Male	13 (41)	3 (9)	1 (3)		2 (6)	2 (6)	
Tumor size (cm)							
≤2	4 (12.5)	14 (44)	5 (16)	0.783	6 (19)	13 (41)	0.961
>2	28 (87.5)	9 (28)	4 (13)		4 (12)	9 (28)	
Histological variants of PTC							
Classic	16 (50)	12 (38)	4 (13)	0.249	6 (19)	10 (31)	0.517
Encapsulated	11 (34)	2 (6)	2 (6)		2 (6)	2 (6)	
Follicular	4 (13)	9 (28)	2 (6)		2 (6)	9 (28)	
Warthin-like	1 (3)	0 (0)	1 (3)		0 (0)	1 (3)	
Multifocality							
Present	21 (66)	7 (22)	1 (3)	0.256	1 (3)	7 (22)	0.186
Absent	11 (34)	16 (50)	8 (25)		9 (28)	15 (47)	
Minimum local invasion							
Present	8 (25)	15 (47)	6 (19)	0.938	4 (12)	17 (53)	0.040
Absent	24 (75)	8 (25)	3 (9)		6 (19)	5 (16)	
BRAFV600E mutation							
Present	19 (59)	13	6	0.599	6	13	0.961
Absent	13 (41)	10	3		4	9	
Lymph node metastasis							
Present	9 (28)	6 (19)	3 (9)	0.682	4 (12)	5 (16)	0.314
Absent	23 (72)	17 (53)	6 (19)		6 (19)	17 (53)	
AJCC/TNM stage							
I-II	26 (81)	19 (59)	7 (22)	0.753	8 (25)	18 (56)	0.903
III	6 (19)	4 (13)	2 (6)		2 (6)	4 (12)	
Risk of recurrence							
Low	13 (41)	10 (31)	3 (9)	0.599	4 (12)	9 (28)	0.961
Intermediate	19 (59)	13 (41)	6 (19)		6 (19)	13 (41)	

NOTE: The statistical significance was assessed by χ^2 test. P value in bold are significant (<0.05).

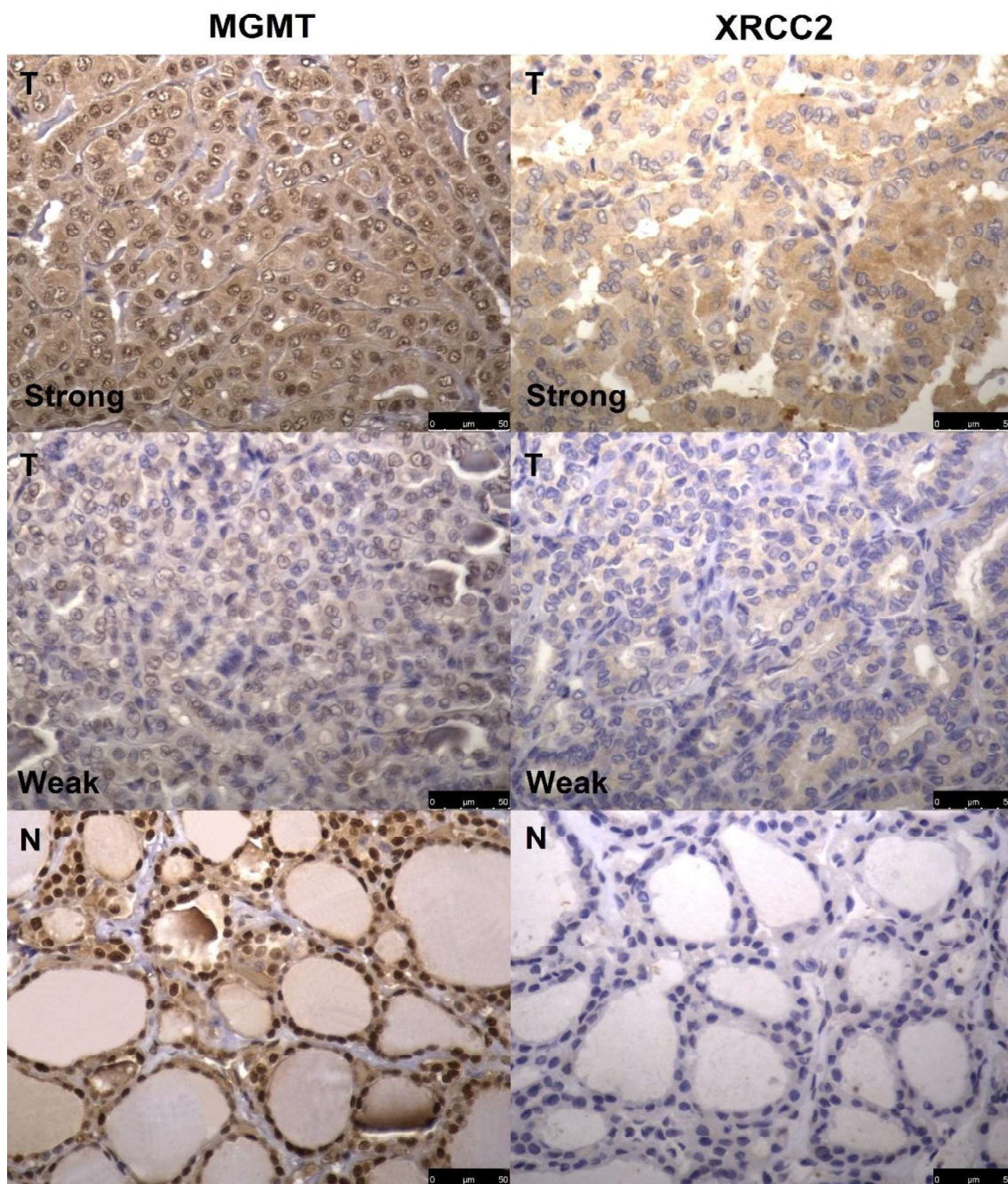


Figure 4. Representative photomicrographs showing immunohistochemical staining in papillary thyroid carcinoma (T) and adjacent normal tissue (N) for MGMT and XRCC2. Images were taken at x400 magnification.

3.4. $BRAF^{V600E}$ mutation is associated with *MLH1* and *XPB* gene expression

The $BRAF^{V600E}$ mutation was found in 19 of 32 cases (59%) of PTC. We found a significant association between $BRAF^{V600E}$ presence and low expression of *MLH1* ($p=0.037$) and *XPB* ($p=0.025$) expression (Figure 5). However, the presence of $BRAF^{V600E}$ mutation was not significantly associated with *MGMT* or *XRCC2* expression (Figure 2A). $BRAF^{V600E}$ mutational status was not

associated with clinicopathological characteristics, except for a trend of correlation with gender ($p=0.077$), histological variants ($p=0.066$) and minimum local invasion ($p=0.055$). Patients diagnosed with classic variant of PTC had a higher frequency of presence of this mutation (34%). The same was observed for minimal local invasion where 15 of 20 patients (47% of the total, $n=32$) presented BRAF^{V600E}. This and other frequencies can be explored in Supplementary Table 1.

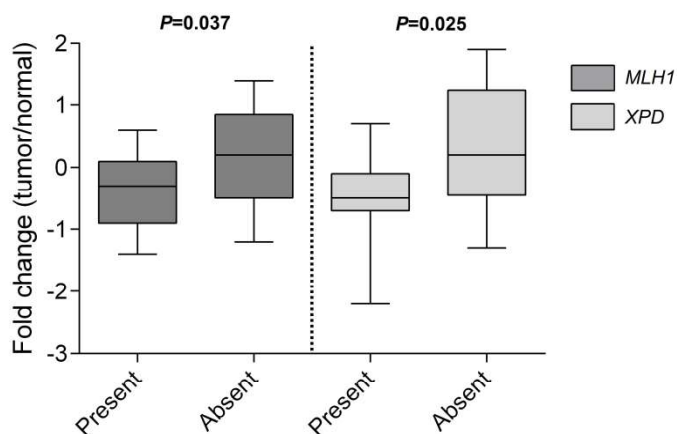


Figure 5. Low *MLH1* and *XPD* expression between tumor and surrounding normal thyroid tissues (y axis) is associated with BRAF^{V600E} presence. Horizontal lines represent the median; the bottom and top of the boxes represent the 25th and 75th percentiles, respectively; and the vertical bars represent the range of data. The statistical significance was determined by Mann Whitney test.

4. Discussion

In the present study, we demonstrated that MGMT, a direct DNA repair enzyme, is significantly under-expressed in PTC samples when compared with surrounding normal thyroid tissues, and it is correlated with smaller tumors, presence of lymph node metastasis and intermediate recurrence risk. For the first time, we also described that *XRCC2*, a representative component of homologous recombination pathway, is upregulated in PTC tissue, despite this data was not correlated with any of the evaluated clinical features. Moreover, we showed that low expression of *MLH1* and *XPD* is associated with presence of *BRAF*^{V600E} mutational status. In fact, DNA repair machinery plays an important role in the organism defense against DNA damage caused by environmental factors and normal metabolic activities (Friedberg, McDaniel and Schultz, 2004). To date, the defective DNA repair machinery leads to the accumulation of toxic intermediates and is involved with thyroid tumor development and progression (Gatzidou et al., 2010).

MGMT is located in chromosome 10q26, and acts as the main enzyme in the direct repair, in an error-free pathway. This mechanism protects cells from mutagenic agents and confers resistance to alkylating chemotherapeutic drugs (Hoeijmakers, 2001). In agreement with other studies in human neoplasias (Mokhtar et al., 2014; Yousuf et al., 2014; Asiaf et al., 2015), we demonstrated an association between lower expression of MGMT prognostic features of disease at diagnosis. Reduced expression and hypermethylation of MGMT has been associated with tumorigenesis in several human cancer tissues, such as gastric carcinoma, thymic epithelial tumor, ductal breast carcinoma and colorectal cancer, leading to cell malignancy, modulation of chemotherapy responses and numerous clinical outcomes (Bardhan e Liu, 2013; Mokhtar et al., 2014; Yousuf et al., 2014; Asiaf et al., 2015, Leguisamo et al., 2017). Gastric carcinomas with reduced *MGMT* expression and promoter methylation presented higher tumor grades and advanced tumor stages (Yousuf et al., 2014). In thymic epithelial tumors, reduced *MGMT* methylation and loss of expression were significantly more frequent in advanced tumors (III-IV) than in early tumors (I-II) (Mokhtar et al., 2014). Reduced expression of MGMT was also associated with lymph node involvement and tumor grade in invasive ductal carcinoma of the breast (Asiaf et al., 2015). In malign lesions of thyroid,

MGMT protein content was found to be down-regulated (Giaginis et al., 2011), probably as result of *MGMT* promoter methylation, which can product low protein expression (Ishida et al., 2007; Santos et al., 2013). This event is also responsible for microsatellite instability even in patients with benign thyroid lesions (Ishida et al., 2007; Santos et al., 2013).

Loss of MGMT is defined as “field defect”, which means it is not the only responsible but contributes to the progression of cancer (Nagasaka et al., 2008), which can explain the correlation between *MGMT* lower levels and smaller tumors, indicating that loss of this gene may be an initial step to cellular malignance. Giaginis et al. (2011) have already reported a possible trend of correlation of MGMT protein with tumor size, where the larger are malign tumors, the greater is the frequency of negative/weak MGMT immunoreactivity when compared to benign tumors. Thus, the reduced expression of *MGMT* in PTC is in accordance with other human tumors and corroborates the assumption that direct repair can play a role on development and progression of thyroid cancer. Nevertheless, longitudinal studies are still necessary to predict a long-term prognosis of patients with thyroid cancer.

Another noteworthy result of our study is regarding the increased expression of *XRCC2* in PTC comparing with surrounding normal thyroid tissue. *XRCC2* is a HR pathway gene located in chromosome 7q36.1 that encodes a member of the Rad51-like protein (Thacker et al., 1995; Johnson et al, 1999). *XRCC2* contains the ATP binding domain known as Walker motifs A and B and its cell-deficiency results in a decrease of up to 100-fold of HR repair system capacity (Walker et al., 1982; Johnson, et al 1999). We did not find any correlation between *XRCC2* gene expression and clinicopathological characteristics, but we found a significant association between *XRCC2* protein expression and minimum local invasion.

To date, no studies have demonstrated the expression of this gene on thyroid cancer. In primary colorectal tumors, levels of *XRCC2* were significantly higher than in matched adjacent normal tissues. It was associated with tumor site, Dukes' and Tumor-nodes-metastasis (TNM) staging. The authors also demonstrated that *XRCC2* upregulation inhibited CRC cell apoptosis and promoted proliferation enriching cells in G0/G1 phase (Xu et al., 2014). Moreover, studies have reported an association between *XRCC2* SNPs and

incidence risk for breast cancer, colorectal tumors and ovarian cancer (Lin et al., 2011; Li et al., 2014; Michalska et al., 2016). It is possible due to a non-conservative substitution or deletion of amino acid 188, which can affect cellular sensitivity to DNA damage (Liu et al., 1998; Rafii et al., 2002). However, genetic variations in the coding region of *XRCC2* appear to have no effect on the susceptibility for thyroid carcinoma (Bastos et al., 2009; Yan et al., 2016).

Considering a previous report where hypermethylation of *MLH1* (MMR pathway) was associated with *BRAF*-promoted thyroid tumorigenesis, we evaluated the presence of *BRAF* on PTC samples and correlated with tumor mRNA levels of representative pathway genes (Guan et al., 2008). In fact, we found expression of *MLH1* correlated with *BRAF*^{V600E} mutational status. For the first time, we reported *BRAF*^{V600E} association with *XPD* (NER pathway) down-regulation in PTC. In the same way, low *XPC* was previously correlated with *BRAF* and *NRAS* mutation in melanoma samples (Davey, 2016). It has been suggested that NER and MMR pathways influence the DSB repair by three steps: physical facilitation of HR or NHEJ machinery through the processing of intermediates during DSB repair; participation in primary damage surveillance; and signaling between primary damage reorganization, induction of cell cycle checkpoint and permission for cell cycle progress (Zhang, Rohde and Wu, 2009). We suggest that the correlation between *BRAF*^{V600E} and *MLH1* or *XPD* reduced, but not significant, expression can be a malignant process involved with the *XRCC2* significant increased activity and the correlation of *XRCC2* protein expression with minimum local invasion.

In consistency with a previous report, we did not find significant relationship between *MGMT* expression and *BRAF*^{V600E} (Santos et al., 2013). We showed that *BRAF*^{V600E} mutation was present in 59% of our samples despite the absence of correlation with clinicopathological characteristics. In PTC, *BRAF*^{V600E} accounts for 60% of the mutations, being the main mutation in this type of cancer (Fagin e Wells, 2016). The frequency of this mutation can vary of 27 to 69% depending on the population studied (Cohen et al., 2003; Goutas et al., 2008). In light of our results, we provide evidence on alterations of DNA repair machinery among PTC and normal thyroid tissues. The correlation of *MGMT* expression and clinicopathological characteristics indicate the possible role of DR in tumor aggressiveness. In addition, the correlation between

reduced expression of *MLH1* or *XPD* and BRAF^{V600E} presence can be involved with significant increased of *XRCC2*.

5. Conclusion

Our results characterize the expression of DNA repair genes in PTC tissues with alteration in key-components of DR (MGMT) and HR (*XRCC2*) pathways. We believe that the decreased MGMT expression - besides its role in tumor aggressiveness - may also act as a “field defect”, which means that it has greater contribution in early steps of PTC. However, further investigations of MGMT mutations and promoter methylation status are required to better understand the cause of MGMT gene modulation. The association of BRAF^{V600E} with MMR and NER pathway genes suggests an interaction with the increased activity of HR pathway, especially for *XRCC2*, due to its influence on DSD repair.

Acknowledgements

We thank Dr. Suzana Elisabete Lamonatto, Dr. Renata Fragomeni Almeida and Dr. Karen Margarita Rico Escamilla for assistance in collecting tissues samples. This research was supported by grants from Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul – PPSUS – FAPERGS/MS/CNPq/SESRS No 002/2013 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – MCTI/CNPQ/Universal No 14/2014.

Disclosure statement

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

References

- Asiaf, A., Ahmad, S.T., Malik, A.A., Aziz, S.A., Rasool, Z., Masood, A., Zargar, M.A., 2015. Protein expression and methylation of MGMT, a DNA repair gene and their correlation with clinicopathological parameters in invasive ductal carcinoma of the breast. *Tumour Biology* 36, 6485-6496.
- Bardhan K, Liu K., 2013 Epigenetics and Colorectal Cancer Pathogenesis. *Cancers*, 5, 676–713.
- Bastos, H.N., Antão, M.R., Silva, S.N., Azevedo, A.P., Manita, I., Teixeira, V., Pina, J.E., Gil, O.M., Ferreira, T.C., Limbert, E., Rueff, J., Gaspar, J.F., 2009. Association of polymorphisms in genes of the homologous recombination DNA repair pathway and thyroid cancer risk. *Thyroid* 19, 1067-1075.
- Cohen, Y., Xing, M., Mambo, E., Guo, Z., Wu, G., Trink, B., Beller, U., Westra, W.H., Ladenson, P.W., Sidransky, D., 2003. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 16, 625-627.
- Davey, R.J., 2016. Examining the expression of nucleotide excision repair genes in melanoma tumors. University of New Castle, *Thesis*.
- Edge, S.B., Byrd, D.R., Compton, C.C., Fritz, A.G., Greene, F.L., Trotti, A., 2010. *AJCC cancer staging manual*, seventh ed. Springer, New York.
- Fagin, J., A., Wells, A.S., 2016. Biologic and clinical perspectives on thyroid cancer. *The New England Journal of Medicine* 375, 1054-1067.
- Friedberg, E.C. 2011. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nature Reviews Cancer* 23, 22-33.
- Friedberg, E.C., McDaniel, L.D., Schultz, R.A., 2004. The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. *Current Opinion in Genetics & Development* 14, 5-10.
- Gatzidou, E., Michailidi, C., Tseleni-Balafouta, S., Theocharis, S., 2010. An epitome of DNA repair related genes and mechanisms in thyroid carcinoma. *Cancer Letters* 290, 139–147.
- Giaginis, C., Michailidi, C., Stolakis, V., Alexandrou, P., Tsourouflis, G., Klijanienko, J., Delladetsima, I., Theocharis, S., 2011. Expression of DNA repair proteins MSH2, MLH1 and MGMT in human benign and malignant thyroid lesions: an immunohistochemical study. *Medical Science Monitor* 17, BR81-BR90.
- Goutas, N., Vlachodimitropoulos, D., Bouka, M., Lazaris, A.C., Nasioulas, G., Gazouli, M., 2008. BRAF and K-RAS mutation in a Greek papillary and medullary thyroid carcinoma cohort. *Anticancer Research* 28, 305-308.
- Guan, H., Ji, H., Hou, P., Liu Z., Wang, C., Shan, Z., Teng, W., Xing, M., 2008. Hypermethylation of the DNA Mismatch Repair Gene hMLH1 and Its

Association With Lymph Node Metastasis and T1799A BRAF Mutation in Patients With Papillary Thyroid Cancer. *Cancer* 113, 247-255.

Halford, S., Rowan, A., Sawyer, I., Talbot, I., Tomlinson, I., 2005. O(6)-methylguanine methyltransferase in colorectal cancers: detection of mutations, loss of expression, and weak association with G:C>A:T transitions. *Gut* 54, 797-802.

Hoeijmakers, J.H.J., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-74.

Howlander, N., Noone, A.M., Krapcho, M., Miller, D., Bishop, K., Altekruze, S.F., Kosary, C.L., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., Lewis, D.R., Chen, H.S., Feuer, E.J., Cronin, K.A., (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/, based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016.

Inskip, P.D., 2001. Thyroid cancer after radiotherapy for childhood cancer. *Med Pediatr Oncol* 36, 568-573.

Ishida, E., Nakamura, M., Shimada, K., Higushi, T., Takatsu, K., Yane, K., Konishi, N., 2007. DNA hypermethylation status of multiple genes in papillary thyroid carcinomas. *Pathobiology* 74, 344-352.

Johnson, R.D., Liu, N., Jasin, M., 1999. Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Nature* 401, 397-399.

Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., Roos, W.P. 2007. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair* 6, 1079-1099.

Leguisamo, N.M., Gloria, H.C., Kalil, A.N., Martins, T.V., Laporte, G.A., Azambuja, D.B., Meira, L.B., Saffi, 2017. Base excision repair imbalance in colorectal cancer has prognostic value and modulates response to chemotherapy. *Oncotarget* in press.

Li, X.B., Luo, H., Huang, J., Zhang, J.D., Yang, Z.X., Sun, X.W., 2014. XRCC2 gene polymorphisms and its protein are associated with colorectal cancer susceptibility in Chinese Han population. *Medical Oncology* 31.

Lin, W.Y., Camp, N.J., Cannon-Albright, L.A., Allen-Brady, K., Balasubramanian, S., Reed, M.W., Hopper, J.L., Apicella, C., Giles, G.G., Southey, M.C., Milne, R.L., Arias-Pérez, J.I., Menéndez-Rodríguez, P., Benítez, J., Grundmann, M., Dubrowskaja, N., Park-Simon, T.W., Dörk, T., Garcia-Closas, M., Figueroa, J., Sherman, M., Lissowska, J., Easton, D.F., Dunning, A.M., Rajaraman, P., Sigurdson, A.J., Doody, M.M., Linet, M.S., Pharoah, P.D., Schmidt, M.K., Cox, A. 2011. A role for XRCC2 gene polymorphisms in breast cancer risk and survival. *Journal of Medical Genetics* 48, 477-484.

- Little, J.B., 2000. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 397–404.
- Liu, N., Lamerdin, J.E., Tebbs, R.S., Schild, D., Tucker, J.D., Shen, M.R., Brookman, K.W., Siciliano, M.J., Walter, C.A., Fan, W., *et al.*, 1998. XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Molecular Cell* 1, 783-793.
- Lord, C. J., Ashworth, A., 2012. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 481, 287-294.
- Mao, Z., Bozzela, M., Seluanov, A., Gorbunova, V., 2008. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle* 7, 2902-2906.
- Michalska, M.M., Samulak, D., Romanowicz, H., Jabłoński, F., Smolarz, B., 2016. Association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of XRCC2 and XRCC3 homologous recombination repair genes and ovarian cancer in Polish women. *Experimental and Molecular Pathology* 100, 243-247.
- Mokhtar, M., Kondo, K., Namura, T., Ali, A.H., Fujita, Y., Takai, C., Takizawa, H., Nakagawa, Y., Toba, H., Kajiura, K., Yoshida, M., Kawakami, G., Sakiyama, S., Tangoku, A. 2014. Methylation and expression profiles of MGMT gene in thymic epithelial tumors. *Lung Cancer* 83, 279-287.
- Nagasaka, T., Goel, A., Notohara, K., Takahata, T., Sasamoto, H., Uchida, T., Nishida, N., Tanaka, N., Boland, C.R. Matsubar, N., 2008. Methylation pattern of the O6 -methylguanine-DNA methyltransferase gene in colon during progressive colorectal tumorigenesis. *International Journal of Cancer* 122, 2429-2436.
- Ogino, S., Kawasaki, T., Kirkner, G.J., Suemoto, Y., Meyerhardt, J.A., Fuchs, C.S., 2007. Molecular correlates with MGMT promoter methylation and silencing support CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) in colorectal cancer. *Gut* 56, 1564-1571.
- Rafii, S., O'Regan, P., Xinarianos, G., Azmy, I., Stephenson, T., Red, M., Meuth, M., Thacker, J., Cox, A., 2002. A potential role for the XRCC2 R188H polymorphic site in DNA-damage repair and breast cancer. *Human Molecular Genetics* 11, 1433–1438.
- Ron, E., Lubin, J.H., Shore. R.E., Mabuchi, K., Modan, B., Pottern, L.M., Schneider, A.B., Tucker, M.A., Boice, J.D. JR., 1995. Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. *Radiat Res* 141, 259–277.
- Santos, J.C., Bastos, A.U., Cerutti, J.M., Ribeiro, M.L., 2013. Correlation of MLH1 and MGMT expression and promoter methylation with genomic instability in patients with thyroid carcinoma. *BMC Cancer* 13, 1-7.

Sherman, S.I., 2003. Thyroid carcinoma. *The Lancet* 361, 501-511.

Schkarupa, V.M., Henyk-Berezovska, S.O., Palamarchuk, V.O., Talko, V.V., Klymenko, S.V. 2015. Research of DNA repair genes polymorphism XRCC1 and XPD and the risks of thyroid cancer development in persons exposed to ionizing radiation after the Chornobyl disaster. *Probl Radiac Med Radiobiol* 20, 552-571.

Sinnott, B., Ron, E., Schneider, A. B., 2010. Exposing the thyroid to radiation: a review of its current extent, risks, and implications. *Endocrine Reviews* 31, 756–773.

Sturgis E.M., Zhao, C., Zheng, R., Wei, Q., 2005. Radiation response genotype and risk of differentiated thyroid cancer: a case-control analysis. *Laryngoscope* 115, 938-945.

Thacker, J., Tambini, C.E., Simpson, P.J., Tsui, L.C. Scherer, S.W., 1995. Localization to chromosome 7q36.1 of the human XRCC2 gene, determining sensitivity to DNA-damaging agents. *Human Molecular Genetics* 4, 113-20.

Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J., 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal*, 945–951.

Xu, K., Song, X., Chen, Z., Qin, C., He, Y., Zhan, W., 2014. XRCC2 promotes colorectal cancer cell growth, regulates cell cycle progression, and apoptosis. *Medicine* 93.

Yan, L., Li, Q., Li, X., Ji, H., Zhang, L., 2016. Association studies between XRCC1, XRCC2, XRCC3 polymorphisms and differentiated thyroid carcinoma. *Cellular Physiology and Biochemistry* 38, 1075-1084.

Yousuf, A., Bhat, Y.M., Pandith, A.A., Afroze, D., Khan, N.P., Alam, K., Shah, P., Shah, M.A., Mudassar, S., 2014. MGMT gene silencing by promoter hypermethylation in gastric cancer in a high incidence area. *Cellular Oncology* 37, 245-252.

Zhang, Y., Rohde, L.H., Wu, H., 2009. Involvement of nucleotide excision and mismatch repair mechanisms in double strand break repair. *Current Genomics* 10, 250-258.

Zhu, J., Wang, X., Zhang, X., Li, P., Hou, H., 2015. Clinicopathological features of recurrent papillary thyroid cancer. *Diagnostic Pathology* 10.

Supplementary Table 1Frequency of BRAF^{V600E} and its association with clinicopathological characteristics.

Variable	Number (%)	BRAF ^{V600E}		
		Present Number (%)	Absent Number (%)	P value
Total cases	32	19 (59)	13 (41)	
Age (years)				
≤45	22 (69)	12 (38)	10 (31)	0.409
>45	23 (69)	7 (22)	3 (9)	
Gender				
Female	19 (59)	15 (47)	13 (41)	0.077
Male	13 (41)	4 (13)	0 (0)	
Tumor size (cm)				
≤2	4 (12.5)	10 (31)	9 (28)	0.378
>2	28 (87.5)	9 (28)	4 (13)	
Histological variants of PTC				
Classic	16 (50)	11 (34)	5 (16)	0.066
Encapsulated	11 (34)	4 (13)	7 (22)	
Follicular	4 (13)	4 (13)	0 (0)	
Warthin-like	1 (3)	0 (0)	1 (3)	
Multifocality				
Present	21 (66)	6 (19)	2 (6)	0.299
Absent	11 (34)	13 (41)	11 (34)	
Minimum local invasion				
Present	8 (25)	15 (47)	6 (19)	0.055
Absent	24 (75)	4 (13)	7 (22)	
Lymph node metastasis				
Present	9 (28)	6 (19)	3 (9)	0.599
Absent	23 (72)	13 (41)	10 (31)	
AJCC/TNM stage				
I-II	26 (81)	14 (44)	12 (38)	0.185
III	6 (19)	5 (16)	1 (3)	
Risk of recurrence				
Low	13 (41)	6 (19)	7 (22)	0.208
Intermediate	19 (59)	13 (41)	6 (19)	

NOTE: The statistical significance was accessed by χ^2 test.

4. CONCLUSÕES FINAIS

4.1. Conclusão geral

A alteração nos níveis de expressão de genes e proteínas-chave das vias de reparo do DNA no carcinoma papilar da tireoide, especialmente da via de reparo direto (DR) e da via de recombinação homóloga (HR) apresenta associação com características de maior agressividade tumoral. A presença da mutação BRAF^{V600E} foi encontrada em 59% da população e está especialmente relacionada com a desregulação de genes das vias de reparo de mal pareamento (MMR) e reparo por excisão de nucleotídeos (NER).

4.2. Conclusões específicas

- A expressão gênica de *MGMT*, representando a via DR, está diminuída, enquanto *XRCC2*, que representa a via HR, está aumentada no carcinoma papilar da tireoide em comparação com o tecido normal adjacente.
- A diminuição na expressão gênica de *MGMT* está associada a tumores inferiores a 2 cm, presença de linfonodos metastáticos e risco intermediário para recorrência tumoral.
- No tecido tumoral, a fraca expressão proteica de *XRCC2* está associada à invasão local mínima.
- A mutação BRAF^{V600E} acomete 59% da população estudada.
- A presença de BRAF^{V600E} está associada com a diminuição da expressão de *MLH1* (MMR) e de *XPB* (NER).

5. PERSPECTIVAS

- Aumentar o tamanho amostral, analisando a expressão gênica e proteica de *MGMT*, *XRCC2*, *MLH1*, *XPB*, assim como de outros componentes da via NER e HR e a presença de *BRAF*^{V600E};
- Avaliar o *status* mutacional de outros genes descritos no carcinoma papilar da tireoide, tais como: *RAS*, *TERT* e rearranjos *RET/PTC* e *TRK*;
- Investigar a presença de mutações e de metilação do promotor do gene *MGMT* para investigar a causa da diminuição da expressão no tecido tumoral;
- Acompanhar os pacientes para construir curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com os dados moleculares encontrados.

6. REFERÊNCIAS

AL AFIF, A.; Multifocal papillary thyroid cancer increases the risk of central lymph node metastasis. **Thyroid**, v. 25, n. 9: p. 008-12, 2015.

ALBUJA-CRUZ, M. B.; et al. Number of lymph nodes removed during modified radical neck dissection for papillary thyroid cancer does not influence lateral neck recurrence. **Surgery**, v. 152, p. 1177-1183, 2012.

ALTIERI, F.; et al. DNA Damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxidants and Redox Signaling**, 2008.

ALTMANN, T.; GENNERY, A. R. DNA ligase IV syndrome; a review. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 11, n. 137, 2016.

ALSANEA, O.; et al. Is familial non-medullary thyroid carcinoma more aggressive than sporadic thyroid cancer? A multicenter series. **Surgery**, v. 128, p. 1043-1051, 2000.

AMICO, P.; et al. Warthin tumor-like papillary thyroid carcinoma with a minor dedifferentiated component: report of a case with clinicopathologic considerations. **Case Reports in Medicine**, 2010.

APEL, R. L.; ASA, S. L.; LIVOLSI, V. A. Papillary hurthle cell carcinoma with lymphocytic stroma: 'Warthin-like tumor' of the thyroid. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 19, n. 7, p. 810-814, 1995.

ARIGHI, E.; BORRELLO, M. G.; SARIOLA, H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 16, p. 441-467, 2005.

BAE, J. S.; et al. Clinical utility of TERT promoter mutations and ALK rearrangement in thyroid cancer patients with a high prevalence of the BRAF V600E mutation. **Diagnostic Pathology**, v. 11, n. 21, 2016.

BASOLO, F.; et al. Potent mitogenicity of the RET/PTC3 oncogene correlates with its prevalence in tall-cell variant of papillary thyroid carcinoma. **American Journal of Pathology**, v. 160, n. 1, 2002.

BASTOS, H. N. et al. Association of polymorphisms in genes of the homologous recombination DNA repair pathway and thyroid cancer risk. **Thyroid**, v. 19, n. 10, p. 1067-1075, 2009.

BENBASSAT, C. A.; MECHLIS-FRISH, S.; HIRSCH, D. Clinicopathological characteristics and long-term outcome in patients with distant metastases from differentiated thyroid cancer. **World J Surg**, v. 30, n. 6, p. 1088-1095, 2006.

BLASCO, M. A. Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. **Nature**, v. 6, 2005.

BONT, R.; LAREBEKE, N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. **Mutagenesis**, v. 19, n. 3, p. 169-185, 2004.

BRINDEL, P.; et al. Family history of thyroid cancer and the risk of differentiated thyroid cancer in French polynesia. **Thyroid**, v. 20, n. 4, p. 393-400, 2010.

BULLOCK, M.; et al. TERT promoter mutations are a major indicator of recurrence and death due to papillary thyroid carcinomas. **Clinical Endocrinology**, v. 85, p. 283-290, 2016.

CADY, B.; ROSSI, R. An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. **Surgery**, v. 104, n. 6, p. 947-953, 1988.

CAMPALANS, A.; et al. Distinct spatiotemporal patterns and PARP dependence of XRCC1 recruitment to single-strand break and base excision repair. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 5, p. 3115-3129, 2013.

CAPPOLA, A. R.; MANDEL, S. J. Molecular testing in thyroid cancer: BRAF mutation status and mortality. **JAMA**, v. 309, p. 1529-1530, 2013.

CARTER, R. J.; PARSONS, J. L. Base excision repair, a pathway regulated by posttranslational modifications. **Molecular and Cellular Biology**, v.36, n. 10, p. 1426-1437, 2016.

CAVACO, B. M.; et al. Familial non-medullary thyroid carcinoma (FNMTC): analysis of fPTC/PRN, NMTC1, MNG1 and TCO susceptibility loci and identification of somatic BRAF and RAS Mutations. **Endocrine-Related Cancer**, v.15, p. 207-215, 2008.

CHIANG, F. Y.; et al. Association between polymorphisms in DNA base excision repair genes XRCC1, APE1, and ADPRT and differentiated thyroid carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 18, 2008.

CHRISTMANN et al., Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology**, v. 193, n. 1-2, p. 3-34, 2003.

CHU, W. K.; HICKSON, I. D. RecQ helicases: multifunctional genome caretakers. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, 2009.

CLARK, G. M. Prognostic factors versus predictive factors: Examples from a clinical trial of erlotinib. **Molecular Oncology**, V. 1, p. 406-412, 2008.

CLEAVER, J. E.; LAM, E. T.; REVET, I. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 11, p. 756-768, 2009.

COLONNA, M.; et al. Recent trends in incidence, geographical distribution, and survival of papillary thyroid cancer in France, **Cancer Epidemiology**, v. 39, p. 511-518, 2015.

CRISTOFARO, J.; et al. Molecular genetic study comparing follicular variant versus classic papillary thyroid carcinomas: association of N-ras mutation in codon 61 with follicular variant. **Human Pathology**, v. 37, p. 824-830, 2006.

D'ANTONIO, A.; et al. Warthin-like tumour of the thyroid gland: RET/PTC expression indicates it is a variant of papillary carcinoma. **Histopathology**, v. 36, n. 6, p. 493-498, 2000.

DAVIES, H.; et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, 2002.

DELANEY, J. C.; ESSIGMANN, J. M. Effect of sequence context on O6-methylguanine repair and replication in vivo. **Biochemistry**, v. 40, n. 49, p. 14968-14975, 2001.

DELELLIS, R. A.; et al. **Pathology and Genetics Tumors of Endocrine Organs**. Lyon (France): IARC; 2004.

DIANOV, G. L.; HUBSCHER, U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. **Nucleic Acids Research**, p. 1-8, 2013.

DOBASHI, Y.; et al. DNA polymerase β gene mutation in human prostate cancer. **Cancer Research**, v. 54, p. 2827-2829, 1994.

DOWNS, J. A.; NUSSENZWEIG, M. C.; NUSSENZWEIG, A. Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. **Nature**, v. 447, n. 21, 2007.

DUMENCO, L. L.; et al. The Prevention of thymic lymphomas in transgenic mice by human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. **Science**, v. 259, 1993.

DURANTE, C.; et al. Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 8, p. 2892-2899, 2006.

DURANTE, C.; et al. Clinical aggressiveness and long-term outcome in patients with papillary thyroid cancer and circulating anti-thyroglobulin autoantibodies. **Thyroid**, v. 24, n. 7, 2014.

DYNAN, W. S.; YOO, S. Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 7, p. 1551-1559, 1998.

EDELBROCK, M. A.; KALIYAPERUMAL, S.; WILLIAMS, K.J. DNA mismatch repair efficiency and fidelity are elevated during DNA synthesis in human cells. **Mutat Res**, v. 662, n. 1-2, p. 59-66, 2009.

EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The American joint committee on cancer: the 7th edition of the ajcc cancer staging manual and the future of TNM. **Annals of surgical oncology**, v. 17, n. 6, p. 1471-1474, 2010.

ELISEI, R.; et al. Are the clinical and pathological features of differentiated thyroid carcinoma really changed over the last 35 years? Study on 4187 patients from a single Italian institution to answer this question. **Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 4, p. 1516-1527, 2010.

EVANS, E.; et al. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. **The EMBO Journal**, v.16, n. 21, p. 6559–6573, 1997.

FAGIN, J. A.; WELLS, S. A. JR. Biologic and clinical perspectives on thyroid cancer. **N Engl J Med**, v. 375, n. 11, p. 1054-1067, 2016.

FAYAZ, S.; et al. Assessment of genetic mutations in the XRCC2 coding region by high resolution melting curve analysis and the risk of differentiated thyroid carcinoma in Iran. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 32-37, 2012.

FERRARI, S. M.; et al. Molecular targeted therapies of aggressive thyroid cancer. **Front Endocrinol**, v. 6, n. 176, p. 1-40, 2015.

FORGET, A. L.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. Single-molecule imaging brings Rad51 nucleoprotein filaments into focus. **Trends in Cell Biology**, v. 20, n. 5, p. 269-276, 2010.

FOUSTERI, M.; MULLENDERS, L. H. F. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. **Cell Research**, v. 18, p. 73-84, 2008.

FRATTINI, M.; et al. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. **Oncogene**, v. 23, p. 7436-7440, 2004.

FU, D.; CALVO, J. A.; SAMSON, L. D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, p. 104-120, 2012.

GANDOLFI, G.; et al. TERT promoter mutations are associated with distant metastases in papillary thyroid carcinoma. **European Journal of Endocrinology**, v. 172, n. 4, p. 403-413, 2015.

GARCÍA-QUISPE, W. A.; et al. Association studies of OGG1, XRCC1, XRCC2 and XRCC3 polymorphisms with differentiated thyroid cancer. **Mutation Research**, v. 709, n. 710, p. 67-72, 2011.

GARNETT, M. J.; MARAIS, R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. **Cancer Cell**, v. 6, 2004.

GATZIDOU, E.; et al. An epitome of DNA repair related genes and mechanisms in thyroid carcinoma. **Cancer Letters**, v. 290, p. 139-147, 2010.

GIAGINIS, C.; et al. Expression of DNA repair proteins MSH2, MLH1 and MGMT in human benign and malignant thyroid lesions: Na immunohistochemical study. **Med Sci Monit**, v. 17, n. 3, p. BR81-90, 2011.

Globocan 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base No. 11. World Health Organization. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx>. Acesso em 16 de setembro de 2016.

GOMES, B. C.; et al. The role of common variants of non-homologous end-joining repair genes XRCC4, LIG4 and Ku80 in thyroid cancer risk. **Oncology Reports**, v. 24, p. 1079-1085, 2010.

GRECO, A.; MIRANDA, C.; PIEROTTI, M.A. Rearrangements of NTRK1 gene in papillary thyroid carcinoma. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 321, p. 44-49, 2010.

GUAN, H.; et al. Hypermethylation of the DNA mismatch repair gene hmlh1 and its association with lymph node metastasis and t1799a BRAF mutation in patients with papillary thyroid cancer. **Cancer**, v. 113, n. 2, 2008.

GUIMARÃES, J. L. M.; ROSA, D. D. **Rotinas em oncologia**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

HAUGEN, B. R.; et al. 2015 American thyroid association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. **Thyroid**, v. 26, n. 1, 2016.

HELLEDAY, T.; et al. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, p. 193-204, 2008.

HELLEDAY, T.; ESHTAD, S.; NIK-ZAINAL, S. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, p. 585-598, 2014.

HENDERSON, Y. C.; et al. High Rate of BRAF and RET/PTC Dual Mutations Associated with Recurrent Papillary Thyroid Carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 2, p. 485-491, 2009.

HEY, T.; et al. The XPC-HR23B Complex Displays High Affinity and Specificity for Damaged DNA in a True-Equilibrium Fluorescence Assay. **Biochemistry**, v. 41, n. 21, p. 6583-6587, 2002.

HEYER, W.; EHMSSEN, K.; LIU, J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. **Annu. Rev. Genet**, v. 44, p. 113-139, 2010.

HO, T.; et al. Association of XRCC1 polymorphisms and risk of differentiated thyroid carcinoma: a case control analysis, **Thyroid**, v.19, p.129-135, 2009.

HOWLADER, N.; et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2013. Bethesda: National Cancer Institute, 2016. Disponível em: <http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013>. Acesso em 19 de setembro de 2016.

HSIEH, P.; YAMANE, K. DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. **Mech Ageing Dev**, v. 129, n. 7-8, p. 391–407, 2008.

HUANG, F. W.; et al. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. **Science**, v. 339, n. 6122, p. 957-959, 2013.

HUSSAIN, M. R. R. BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, p. 359-373, 2015.

HUYCK, T.; AGULNIK, M. Molecular therapies in thyroid cancer. **Pharmaceuticals**, v. 4, n. 1, p. 91-100, 2011.

INCA: Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de Câncer no Brasil, 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>>. Acesso em 12 de agosto de 2016.

ITO, Y.; et al. Prognostic factors for recurrence of papillary thyroid carcinoma in the lymph nodes, lung, and bone: analysis of 5,768 patients with average 10-year follow-up. **World Journal of Surgery**, v. 36, n. 6, p. 1274-1278, 2012.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071-1078, 2009.

JACOBS, A. L.; SCHÄR, P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. **Chromosoma**, v. 121, p. 1–20, 2012.

JEMAL, A.; et al. Cancer statistics, 2010. **CA Cancer J Clin**, v. 60, n. 5, p. 277-300, 2010.

JIRICNY, J. The multifaceted mismatch-repair system. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v, 7, n. 5, p. 335-46, 2008.

KABAT, G. C.; et al. Menstrual and reproductive factors, exogenous hormone use, and risk of thyroid carcinoma in postmenopausal women. **Cancer Causes and Control**, v. 23, n. 12, p. 2031-2040, 2012.

KAINA, B.; et al. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. **DNA Repair (Amst)**, v. 6, n. 8, p. 1079-1099, 2007.

KARGER, S.; et al. Distinct pattern of oxidative DNA damage and DNA repair in follicular thyroid tumours. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 48, p.193-202, 2012.

KILLELA, P. J.; et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. **PNAS**, v. 110, n. 15, p. 6021-6026, 2013.

KIM, W. G.; et al. Change of serum antithyroglobulin antibody levels is useful for prediction of clinical recurrence in thyroglobulin-negative patients with differentiated thyroid carcinoma. **Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. 12, p. 4683-4689, 2008.

KIM, T. H.; et al. The association of the BRAFV600E mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer. **Cancer**, v. 118, n. 7, p. 1764-73, 2012.

KIM, H. J.; et al. Multifocality, but not bilaterality, is a predictor of disease recurrence/persistence of papillary thyroid carcinoma. **World Journal of Surgery**, v. 37, n. 2, p. 376-84, 2013.

KIM, S. J.; et al. Risk factors for recurrence after therapeutic lateral neck dissection for primary papillary thyroid cancer. **Ann Surg Oncol**, v. 21, n. 6, p. 1884-1890, 2014.

KINSELLA, T. J. Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers. **Clin Cancer Res**, v. 15; v. 6, p. 1853-1859, 2009.

KREJCI, L.; et al. Homologous recombination and its regulation. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 13, p. 5795-5818, 2012.

KROKAN, H. E.; BJØRAS, M. Base excision repair. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 2013.

KUSHCHAYEVA, Y.; et al. Comparison of clinical characteristics at diagnosis and during follow-up in 118 patients with Hurthle cell or follicular thyroid cancer. **American Journal of Surgery**, v. 195, n. 4, p. 457-462, 2008.

LA VECCHIA, C.; et al. Thyroid cancer mortality and incidence: A global overview. **Int. J. Cancer**, v. 136, n. 9, p. 2187-2195, 2014.

LANG, B. H.; et al. Staging systems for papillary thyroid carcinoma. **Annals of Surgery**, v. 245, n. 3, p. 366-378, 2007.

LEBOULLEUX, S.; et al. Prognostic factors for persistent or recurrent disease of papillary thyroid carcinoma with neck lymph node metastases and/or tumor extension beyond the thyroid capsule at initial diagnosis **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 10, p. 5723-5729, 2005.

LEE, C. Y.; et al. Predictive factors for extrathyroidal extension of papillary thyroid carcinoma based on preoperative sonography. **J Ultrasound Med**, v. 33, p. 231-238, 2014.

- LEGAKIS, I.; SYRIGOS, K. Recent advances in molecular diagnosis of thyroid cancer. **Journal of Thyroid Research**, v. 2011, n. 384213, 2011.
- LEHMANN, A. R. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. **Biochimie**, v. 85, p. 1101–1111, 2003.
- LEUX, C.; et al. Family history of malignant and benign thyroid diseases and risk of thyroid cancer: a population-based case–control study in New Caledonia. **Cancer Causes Control**, v. 23, p. 745-755, 2012.
- LEVY-LAHAD, E.; FRIEDMAN, E. Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **British Journal of Cancer**, v. 96, p. 11-15, 2007.
- LI, G. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell Research**, v. 18, p. 85-98, 2008.
- LIEBER, M. R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the non homologous DNA end joining pathway. **Annu Rev Biochem**, v. 79, p. 181-211, 2010.
- LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**, v. 362, p. 709-715, 1993.
- LITTLE, J. B. Radiation carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 397-404, 2000.
- LIU, C.; CHEN, T.; LIU, Z. Associations between BRAFV600E and prognostic factors and poor outcomes in papillary thyroid carcinoma: a meta-analysis. **World J Surg Oncol**, v.14, n. 241, 2016.
- LIU, R.; XING, M. TERT promoter mutations in thyroid Cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 23, n. 3, p. R143-155, 2016.
- LIVOLSI, V. Papillary thyroid carcinoma: an update. **Modern Pathology**, v. 24, p. S1-S9, 2011.
- LLOYD, R. V.; BUEHLER, D.; KHANAFSHAR, E. Papillary thyroid carcinoma variants. **Head and Neck Pathol**, v. 5, p. 51-56, 2011.
- LORD, C. J; ASHWORTH, A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 287-294, 2012.
- MACHENS, A.; HOLZHAUSEN, H.; DRALLE, H. The prognostic value of primary tumor size in papillary and follicular thyroid carcinoma. **Cancer**, v. 103, n. 11, p. 2269-2273, 2005.
- MAYNARD, S.; et al. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. **Carcinogenesis**, v.30, n. 1, p.2–10, 2009.

MAZZAFERRI, E. L.; JHIANG S. M. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. **Am J Med**, v. 97, n. 5, p. 418-428, 1994.

MCHEMRY, C. R.; PHITAYAKORN, R. Follicular adenoma and carcinoma of the thyroid gland. **Oncologist**, v. 16, n. 5, p. 585-593, 2011.

MEINDL, A.; et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. **Nature Genetics**, v. 42, n. 5, 2010.

MELIS, J. P. M.; STEEG, H.; LUIJTEN, M. Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, p. 2409-2419, 2013.

MERCER, K. E.; PRITCHARD, C. A. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1653, p. 25-40, 2003.

MICHELI, A.; et al. The advantage of women in cancer survival: An analysis of EUROCORE-4 data. **European Journal of Cancer**, v. 45, p. 1017-1027, 2009.

MOSHOUS, D.; et al. Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immunodeficiency. **Cell**, v. 105, p. 177-186, 2011.

MOTOI, N.; et al. Role of RAS mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin. **Pathol. Res. Pract.**, v. 96: p. 1-7, 2000.

MOYZIS, R. K.; et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 85, p. 6622-6626, 1988.

MUSHOLT, T. J.; et al. Prognostic significance of RET and NTRK1 rearrangements in sporadic papillary thyroid carcinoma. **Surgery**, v.128, p. 984-993, 2000.

NAY SL, O'CONNOR TR. Direct Repair in Mammalian Cells. In: Clark Chen. **New Research Directions in DNA Repair**, p. 123-162, 2013.

NGUYEN, Q. T.; et al. Diagnosis and treatment of patients with thyroid cancer. **Am Health Drug Benefits**, v. 8, n. 1, p. 30-40, 2015.

NIKIFOROV, Y. E.; NIKIFOROVA, M. N. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 7, p. 569-580, 2011.

NOSÉ, V. Thyroid cancer of follicular cell origin in inherited tumor syndromes. **Adv Anat Pathol**, v. 17, n. 6, p. 428-36, 2010.

ORTIZ, S.; et al. Extrathyroid spread in papillary carcinoma of the thyroid: Clinicopathological and prognostic study. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 124, p. 261-265, 2001.

PACINI, F.; et al. Serum thyroglobulin in thyroid carcinoma and other thyroid disorders. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 3, n. 283, 1980.

PANNICKE, U.; et al. The Most Frequent DCLRE1C (ARTEMIS) Mutations are Based on Homologous Recombination Events. **Human Mutation**, v. 31, n. 2, p. 197-207, 2010.

PARK, J. Y.; et al. BRAF and RAS mutations in follicular variants of papillary thyroid carcinoma. **Endocr Pathol**, v. 24, n. 2, p. 69-76, 2013.

PATEL, S.; VENKATESH, K. V., EDWARDS, J. S. An integrated mechanistic model for transcription-coupled nucleotide excision repair. **DNA Repair**, v. 3, p. 343-348, 2004.

PELTOMAKI, P.; et al. Mutations predisposing to hereditary non polyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. **Gastroenterology**, v. 113, p. 1146-1158, 1997.

PEÑA-DIAZ, J.; JIRICNY, J. Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 37, n. 5, p. 2006-2014, 2012.

PFEIFFER, P.; GOEDECKE, OBE, G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis**, v. 15, n. 4, p. 289-302, 2000.

POLLOCK, P. M.; MELTZER, P. S. Meltzer Cancer: Lucky draw in the gene raffle. **Nature**, v. 41, 2002.

PRESCOTT, J. D.; ZEIGER, M. A. The RET oncogene in papillary thyroid carcinoma. **Cancer**, v. 121, n. 13, p. 2137-2146, 2015.

PRESTON-MARTIN, S.; et al. Thyroid cancer pooled analysis from 14 case-control studies: what have we learned? **Cancer Causes Control**, v. 14, n. 8, p. 787-789, 2003.

QU, N.; et al. Number of tumor foci predicts prognosis in papillary thyroid cancer. **BMC Cancer**, v. 14, n. 914, 2014.

RABES, H. M.; Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: Biological, phenotypic, and clinical implications. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 1093-1103, 2000.

RADOWSKY J. S.; et al. Impact of degree of extrathyroidal extension of disease on papillary thyroid cancer outcome. **Thyroid**, v. 24, n. 2, p. 241-244, 2014.

RAHIMI, M.; et al. The role of Ile3434Thr XRCC7 gene polymorphism in Differentiated Thyroid Cancer risk in an Iranian population. **Iranian Biomedical Journal**, v. 16, n. 4, p. 218-222, 2012.

REINHARDT, H. C.; SCHUMACHER, B. The p53 network: Cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. **Trends Genet**, v. 28, n. 3, p. 128-136, 2012.

REINHARDT, H. C.; YAFFE, M. B. Phospho-Ser/Thr-binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 9, p. 563-580, 2013.

RENKAWITZ, J.; LADEMANN, C. A.; JENTSCH, S. Mechanisms and principles of homology search during recombination. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2014.

RIVERA, M.; et al. Molecular genotyping of papillary thyroid carcinoma follicular variant according to its histological subtypes (encapsulated vs infiltrative) reveals distinct BRAF and RAS mutation patterns. **Mod Pathol**, v. 23, n. 9, p. 1191-1200, 2010.

ROBERTSON, A. B.; et al. Base excision repair: the long and short of it. **Cell. Mol. Life Sci**, v. 66, p. 981-993, 2009.

RON, E.; et al. Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. **Radiat Res**, v. 141, n. 3, p. 259-277, 1995.

ROSÁRIO, P. W.; et al. Nódulo tireoidiano e câncer diferenciado de tireoide: atualização do consenso brasileiro. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 57, n. 4, p. 240-264, 2013.

ROUXEL, A.; et al. Prognostic factors associated with the survival of patients developing loco-regional recurrences of differentiated thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 11, p. 5362-5368, 2004.

ROSSING M. A., et al. Risk of papillary thyroid cancer in women in relation to smoking and alcohol consumption. **Epidemiology**, v. 11, n. 1, p. 49-54, 2000.

SANTORO, M.; et al. RET Activation and clinicopathologic features in poorly differentiated thyroid tumors. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 1, p. 370-379, 2002.

SANTORO, M.; et al. Minireview: RET: Normal and abnormal functions. **Endocrinology**, v. 145, n. 12, p. 5448-5451, 2004.

SANTOS, L. S.; et al. Polymorphisms in base excision repair genes and thyroid cancer risk. **Oncology Reports**, v. 28, p. 1859-1868, 2012.

SANTOS, J. C.; et al. Correlation of MLH1 and MGMT expression and promoter methylation with genomic instability in patients with thyroid carcinoma. **BMC Cancer**, v. 13, n. 79, 2013.

SARLIS, N. J. Metastatic thyroid cancer unresponsive to conventional therapies: novel management approaches through translational clinical research. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord**, v. 1, n. 2, p. 103-115, 2001.

SCHLUMBERGER, M. J. Diagnostic follow-up of well-differentiated thyroid carcinoma: historical perspective and current status. **J Endocrinol Invest**, v. 22, n. 11 p. 3-7, 1999.

SCHNEIDER, D. F.; CHEN, H. New developments in the diagnosis and treatment of thyroid cancer. **CA Cancer J Clin**, v. 63, n. 6, p. 373-394, 2013.

SCHOENMAKERS, E.; HUYSMANS, C. Allelic Knockout of Novel Splice Variants of Human Recombination Repair Gene RAD51B in t(12;14) Uterine Leiomyomas. **Cancer Research**, v. 59, p. 19-23, 1999.

SHARER, O. D. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, a012609, 2013.

SHARMA, R. A.; DIANOV, G. L. Targeting base excision repair to improve cancer therapies. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, p. 345-374, 2007.

SHERMAN, S. I. Thyroid carcinoma. **Lancet**, v. 361, n. 9356, p. 501-511, 2003.

SHI, R.; et al. The trend of age-group effect on prognosis in differentiated thyroid cancer. **Scientific Reports**, v. 6, n. 27086, 2016.

SHIRAIISHI, A.; SAKUMI, K.; SEKIGUSHI, M. Increased susceptibility to chemotherapeutic alkylating agents of mice deficient in DNA repair methyltransferase. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 10, p. 1879-1883, 2000.

SHIVJI, M. K. K.; et al. Nucleotide Excision Repair DNA Synthesis by DNA Polymerase E in the Presence of PCNA, RFC, and RPA. **Biochemistry**, v. 34, p. 5001-5017, 1995.

SHKARUPA V. M.; et al. Research of DNA repair genes polymorphism XRCC1 and XPD and the risks of thyroid cancer development in persons exposed to ionizing radiation after the Chernobyl disaster. **Probl Radiac Med Radiobiol**, v. 20, p. 552-571, 2015.

SIERRA, M. S.; SOERJOMATARAM, I.; FORMAN, D. Thyroid cancer burden in Central and South America. **Cancer Epidemiology**, v. 44, n. 1, 2016.

SILVA, S. N.; et al. Association of polymorphisms in ERCC2 gene with non-familial thyroid cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n. 10, 2005.

SIRAJ, A. K.; et al. RAD52 polymorphisms contribute to the development of papillary thyroid cancer susceptibility in Middle Eastern population. **J Endocrinol Invest**, v. 31, n. 10, p. 893-899, 2008.

SO, Y. K.; KIM, M. W.; SON, Y. Multifocality and bilaterality of papillary thyroid microcarcinoma. **Clinical and Experimental Otorhinolaryngology**, v. 8, n. 2, p. 174-178, 2015.

SOBIN, L. H.; Gospodarowicz M.; Wittekind, C. H. **TNM classification of malignant tumors**. New York: Wiley-Liss., 2009.

SONODA, Y.; et al. O6-Methylguanine DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression is correlated with progression-free survival in patients with glioblastoma. **Int J Clin Oncol**, v. 15, p. 352-358, 2010.

SPENCER, C. A. Clinical utility of thyroglobulin antibody (TgAB) measurements for patients with differentiated thyroid cancers (DTC). **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 12, n. 3615-3627, 2011.

STRACKER, T. H.; et al. The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together. **DNA Repair**, v. 3, p.845–854, 2004.

STRACKER, T. H.; PETRINI, J. H. J. The MRE11 complex: starting from the ends. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, 2011.

STURGIS, E. M.; et al. Radiation response genotype and risk of differentiated thyroid cancer: a case-control analysis. **Laryngoscope**, v. 115, n. 6, p. 938-945, 2005.

SUZUKI, K.; et al. Radiation signatures in childhood thyroid cancers after the Chernobyl accident: possible roles of radiation in carcinogenesis. **Cancer Sci**, v. 106, n. 2, p. 127-133, 2015.

SYMINGTON, L. S.; GAUTIER, J. Double-Strand Break End Resection and Repair Pathway Choice. **Annu. Rev. Genet**, v. 45, p. 247-271, 2011.

TAKAISHI, M.; et al. Protective role of metallothionein in benzo[a]pyrene-induced DNA damage. **J Toxicol Sci**, v. 34, n. 5, p. 449-458, 2009.

TALLINI, G.; et al. RET/PTC oncogene activation defines a subset of papillary thyroid carcinomas lacking evidence of progression to poorly differentiated or undifferentiated tumor phenotypes. **Clinical Cancer Research**, v. 4, p. 287-294, 1998.

TAVARES, C.; et al. Genetic predictors of thyroid cancer outcome. **European Journal of Endocrinology**, v. 174, p. R117-R126, 2016.

TROVISCO, V.; et al. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. **J Pathol**, v. 202, n. 2, p. 247-251, 2004.

TUYA, P.; et al. Increased risk for nonmedullary thyroid cancer in the first degree relatives of prevalent cases of nonmedullary thyroid cancer: a hospital-based study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 11, p. 5307-5312, 2001.

UCHINO, S.; et al. Familial nonmedullary thyroid carcinoma characterized by multifocality and a high recurrence rate in a large study population. **World J Surg**, v. 26, n. 8, p. 897-902, 2002.

VEIGA, L. H. S.; et al. A pooled analysis of thyroid cancer incidence following radiotherapy for childhood cancer. **Radiat Res**, v. 178, n. 4, p. 365-376, 2012.

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

VERBURG, F. A.; et al. Life expectancy is reduced in differentiated thyroid cancer patients >45 years old with extensive local tumor invasion, lateral lymph node, or distant metastases at diagnosis and normal in all other DTC patients. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 1, p. 172-180, 2013.

VINAGRE, J.; et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. **Nature Communications**, v. 4, n. 2185, 2013.

WADA, N.; et al. Clinical outcomes in older or younger patients with papillary thyroid carcinoma: Impact of lymphadenopathy and patient age. **EJSO**, v. 34, n. 2, p. 202-207, 2008.

WAKASUGI, M.; et al. Damaged DNA-binding Protein DDB Stimulates the Excision of Cyclobutane Pyrimidine Dimers in Vitro in Concert with XPA and Replication Protein A. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 276, p. 15434-15440, 2001.

WARTOFSKY, L. Increasing world incidence of thyroid cancer: Increased detection or higher radiation exposure? **Hormones**, v. 9, n. 2, p. 103-108, 2010.

WARTOFSKY, L.; VAN NOSTRAND, D. Radioiodine treatment of well-differentiated thyroid cancer. **Endocrine**, v. 42, p. 506-513, 2012.

WEBB, R. C.; et al. The utility of serum thyroglobulin measurement at the time of remnant ablation for predicting disease-free status in patients with differentiated thyroid cancer: a meta-analysis involving 3947 patients. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 8, p. 2754-2763, 2012.

WEINHOLD, N.; et al. Genome-wide analysis of non-coding regulatory mutations in cancer. **Nat Genet**, v. 46, v. 11, p. 1160-1165, 2014.

WU, F. F.; et al. Association between the XRCC1 polymorphisms and thyroid cancer risk: a meta-analysis from case-control studies. **PLoS One**, v. 9, n. 9, 2014.

XHAARD, C.; et al. Anthropometric risk factors for differentiated thyroid cancer in young men and women from eastern france: a case-control study. **American journal of epidemiology**, v. 182, n. 3, 2015.

XIE, S. H.; et al. Time trends and age-period-cohort analyses on incidence rates of thyroid cancer in Shanghai and Hong Kong. **BMC Cancer**, v. 14, n. 975, 2014.

XING, M.; et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. **JAMA**, v. 309, n. 14, p. 1493-1501, 2013.

XING, M.; et al. Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. **J Clin Oncol**, v. 33, n. 1, p. 42-50, 2014a.

XING, M.; et al. BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 25, 2014b.

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

XU, L.; et al. Family history of cancer and risk of sporadic differentiated thyroid carcinoma. **Cancer**, v. 118, n.5, p. 1228-1235, 2012.

XU-WELLIVER, M.; et al. Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 5, p. 823-830, 2002.

YAN, L.; et al. Association studies between XRCC1, XRCC2, XRCC3 polymorphisms and differentiated thyroid carcinoma. **Cell Physiol Biochem**, v. 38, p. 1075-1084, 2016.

ZAMORA-ROS R.; et al. Reproductive and menstrual factors and risk of differentiated thyroid carcinoma: the EPIC study. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. 1218-1227, 2015.

ZANE M., et al. Estrogens and stem cells in thyroid cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, n. 124, 2014.

ZHANG, Y.; et al. Do polybrominated diphenyl ethers (PBDES) increase the risk of thyroid cancer? **Biosci Hypotheses**, v. 1, n. 4, v. 195-199, 2008.

ZHAO, L.; et al. Role of TSH in the spontaneous development of asymmetrical thyroid carcinoma in mice with a targeted mutation in a single allele of the thyroid hormone-receptor. **Endocrinology**, v.153, n. 10, p. 5090-5100, 2012.

ZHU, J.; et al. Clinicopathological features of recurrent papillary thyroid cancer. **Diagnostic Pathology**, v. 10, n. 96, 2015.

ZIMMERMANN, M. B.; GALETTI, V. Iodine intake as a risk factor for thyroid cancer: a comprehensive review of animal and human studies. **Thyroid Research**, v. 8, n. 8, 2015.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética da UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão dos genes de reparo de DNA no carcinoma diferenciado da tireoide.

Pesquisador: Erika Laurini de Souza Meyer

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 18231913.1.0000.5335

Instituição Proponente: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 362.887

Data da Relatoria: 15/08/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo transversal, a ser realizado com 40 pacientes portadores de carcinomas diferenciados da tireoide, que serão submetidos à tireoidectomia, para determinar o padrão de expressão de genes envolvidos nos mecanismos de reparo de DNA.

Objetivo da Pesquisa:

Determinar o padrão de expressão de genes envolvidos nos mecanismos de reparo de DNA em pacientes portadores de carcinomas diferenciados da tireoide.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá riscos para o paciente, pois a pesquisa apenas utilizará parte do material removido por indicação cirúrgica pelo médico responsável e como benefícios, poderão surgir dados que subsidiem melhoras futuras na terapia, pela compreensão dos mecanismos envolvidos no curso da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É um estudo relevante e útil na compreensão dos mecanismos envolvidos em carcinomas de tireoide e que poderá, no futuro, contribuir com o desenvolvimento de novas terapias.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados de forma adequada, incluindo o

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)303 -8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 362.887

parecer consubstanciado do Comitê de Ética da Instituição onde será realizada a coleta do material via procedimento cirúrgico, que aprovou a proposta. Entretanto este Comitê, da Instituição Co-participe, chama atenção que o TCLE encontra-se postado na plataforma em versão Word e não pDf como deveria ser.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovamos a proposta, mas atentamos que seria adequado postar a mesma versão do TCLE em pDf.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o Parecer do Colegiado.

PORTO ALEGRE, 16 de Agosto de 2013

Assinador por:

José Geraldo Vernet Taborda
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética da ISCMPA

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão dos genes de reparo de DNA no carcinoma diferenciado da tireoide.

Pesquisador: Erika Laurini de Souza Meyer

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 18231913.1.0000.5335

Instituição Proponente: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 331.061

Data da Relatoria: 02/07/2013

Apresentação do Projeto:

Estudo transversal, a ser realizado com 40 pacientes que serão submetidos à tireoidectomia, para determinar o padrão de expressão de genes envolvidos nos mecanismos de reparo de DNA em pacientes portadores de carcinomas diferenciados da tireoide.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Secundário:

- Quantificar a expressão de genes do reparo do DNA das vias BER, NER e MMR em amostras de carcinoma diferenciado da tireoide e tecido tireoidiano normal circunjacente;
- Avaliar qualitativamente os padrões de expressão de proteínas envolvidas nos processos de resposta a danos no DNA;
- Correlacionar a expressão dos genes de reparo do DNA às características clínicas, laboratoriais e histopatológicas dos pacientes estudados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador declara:

- Riscos: Nenhum. Paciente será submetido à tireoidectomia total por indicação clínica do médico assistente.

Endereço: R. Profª Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: 5132-1485 **Fax:** 5132-1485 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 331.061

- Benefícios: Os resultados da pesquisa não interferirão com a conduta médica de tratamento ou acompanhamento da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Critério de Inclusão: Pacientes de ambos os sexos, maiores de 18 anos, que serão submetidos à tireoidectomia conforme indicação clínica, independente da pesquisa. Serão selecionados os pacientes com punção aspirativa com agulha fina da tireoide (avaliação pré-operatório) suspeita ou diagnóstica de carcinoma de tireoide. O diagnóstico anatomopatológico definitivo de carcinoma de tireoide será realizado através da técnica da hematoxilina-eosina por patologista experiente em neoplasias da tireoide, que desconhecerá os objetivos do presente estudo.

Critério de Exclusão: Serão excluídos os pacientes em que o diagnóstico anatomopatológico definitivo de tireoidite linfocítica crônica, bócio colóide nodular e/ou com dados incompletos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados à PB e estão adequados os seguintes documentos: Folha de rosto, Orçamento, Cronograma, Formulário de inscrição de projeto de pesquisa, Termo de compromisso para utilização de dados dos prontuários, Declaração de confidencialidade do sujeito no estudo, Declaração de autorização da chefia responsável, Declaração de uso e publicação de dados, Declaração de uso e de dados e materiais, Declaração de isenção de ônus à Instituição.

Recomendações:

Não aplicável.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não aplicável.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Após avaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer.

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos

Endereço: R. Profº Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: 5132-1485 **Fax:** 5132-1485 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 331.061

Projetos desenvolvidos na ISCMPA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 - Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

PORTO ALEGRE, 10 de Julho de 2013

Assinador por:
Claudio Teloken
(Coordenador)

Endereço: R. Profª Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: 5132-1485 **Fax:** 5132-1485 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo: Expressão dos genes de reparo do DNA no carcinoma de tireoide

Versão TCLE: 18/06/2013

O tratamento do câncer de tireoide ocorre através da retirada cirúrgica da glândula tireoide (tireoidectomia), com ou sem dose de iodo radioativo após a cirurgia. Apesar de vários estudos já terem determinado o perfil dos tumores mais agressivos, que exigirão um tratamento e acompanhamento mais rigorosos; ainda faltam estudos consistentes que avaliem o DNA das células tumorais, especialmente dos genes de reparo do DNA.

Sendo assim, você está sendo convidado a participar de uma pesquisa intitulada **“Expressão dos genes de reparo do DNA no carcinoma diferenciado de tireoide”**. O objetivo desse estudo é analisar a expressão de genes envolvidos com o reparo do DNA em tumores da tireoide. Para isto, será necessário ter acesso ao material anatomopatológico que será removido durante a sua cirurgia a ser realizada na Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Este material será analisado por técnicas de biologia molecular e histologia, e não trará consequências para o seu diagnóstico, tratamento ou prognóstico, uma vez que não muda as decisões já estabelecidas pelos seus médicos assistentes.

Esta pesquisa consiste em fazer uma análise molecular de genes que fazem o reparo do DNA na busca por mutações que possam estar envolvidas com o processo de geração e evolução do câncer na tireoide. Compreender estes mecanismos poderá ser uma forma de obter diagnósticos e tratamentos mais precisos e mais eficazes aos portadores desta doença. Portanto, ajudará a termos um melhor entendimento da doença.

Nenhum dano está relacionado a essa pesquisa, pois a necessidade de tireoidectomia será indicada por seu médico assistente e os resultados não interferirão na conduta médica. A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

Você será esclarecido sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Sua participação é voluntária. Você é livre para recusar-se a participar,

retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios, especialmente em relação ao seu atendimento no hospital.

Você será contatado apenas no momento do convite à participação nesta pesquisa. Caso aceite participar, pediremos a sua assinatura ao final deste termo, no qual solicitamos a sua autorização para a coleta de parte do material do tumor que será removido, bem como para termos acessos aos seus exames realizados neste hospital. Portanto, a assinatura deste termo assegurará que poderemos coletar seu material biológico (parte do tumor que será retirado na cirurgia) e levá-lo ao Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre para iniciarmos a pesquisa.

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do exame clínico, laboratorial e da pesquisa permanecerão confidenciais. Os dados serão utilizados apenas pela equipe do estudo e autoridades regulatórias da área da saúde. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada por nós e outra será enviada a você.

Eu, _____ fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. Os pesquisadores que entraram em contato comigo certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, poderei entrar em contato com a Dra. Erika Laurini de Souza Meyer (51.9725-0218), investigadora principal e/ou o Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, sob coordenação do Dr. Claudio Telöken (51. 3214-8571).

Ao assinar abaixo, você confirma que leu as afirmações contidas neste termo de consentimento, que foram explicados os procedimentos do estudo, que teve a oportunidade de fazer perguntas, que está satisfeito com as explicações fornecidas e que decidiu participar voluntariamente deste estudo.

Uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido será entregue a você e outra cópia será arquivada pelo investigador principal.

Nome sujeito de pesquisa (letra de forma):

Assinatura do sujeito de pesquisa

Data: _____

Nome do pesquisador (letra de forma):

Assinatura do pesquisador

Data: _____

ANEXO D - Normas do periódico “Molecular and Cellular Endocrinology”



MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0303-7207

DESCRIPTION

Molecular and Cellular Endocrinology was established in 1974 to meet the demand for integrated publication on all aspects related to the genetic and biochemical effects, synthesis and secretions of **extracellular signals** (hormones, neurotransmitters, etc.) and to the understanding of **cellular regulatory mechanisms** involved in **hormonal control**.

The journal is fulfilling this aim by publishing full-length original research papers, rapid papers, reviews, invited Special Issues, and book reviews.

The scope encompasses all subjects related to **genetic**, epigenetic, **biochemical**, and **molecular** aspects of **endocrine research** and **cell regulation**. These include: (1) mechanisms of action of extracellular signals (hormones, neurotransmitters, etc.), (2) interaction of these factors with receptors, (3) generation, action and role of intracellular signals such as cyclic nucleotides and calcium, (4) hormone-regulated gene expression, (5) impact of gene structure on endocrine functions, (6) structure and physicochemical properties of hormones, hormone receptors and other hormone-binding components, (7) synthesis, secretion, metabolism and inactivation of hormones, neurotransmitters, etc. (8) hormonal control of differentiation, (9) related control mechanisms in non-mammalian systems, (10) methodological and theoretical aspects related to hormonal control processes, (11) clinical and translational studies as far as they throw new light on basic research in this field, (12) control of intermediary metabolism at the cellular level, (13) ultrastructural aspects related to hormone secretion and action, (14) comparative aspects of endocrinology only if they elucidate novel hormonal mechanisms.

AUDIENCE

Workers in endocrinology, biochemistry and pharmacology

IMPACT FACTOR

2015: 3.859 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
 Current Contents/Life Sciences
 MEDLINE®
 Informaticus
 EMBASE
 Reference Update
 Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors

I.T. Huhtaniemi, Inst. of Reproductive and Developmental Biology, Imperial College London, Du Cane Road, W12 0NN, London, UK, Fax: 0207 594 2184
R.J. Rodgers, Robinson Research Institute, School of Paediatrics and Reproductive Health, University of Adelaide, Adelaide, 5005, Australia, Fax: 61 8 8313 4099
C.M. Klinge, Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, University of Louisville, HSC-A Bldg, Room 616, Louisville, KY 40292, USA, Fax: 502-852-3659

Editorial Board

R Bathgate, Melbourne, Victoria, Australia
D. Belsham, Toronto, Ontario, Canada
N Binart, Paris, France
C. Carlberg, Kuopio, Finland
C. Chen, Brisbane, Queensland, Australia
Y. Chen, Shanghai, China
J.A. Cidlowski, North Carolina, USA
F. Claessens, Leuven, Belgium
B.A. Cooke, London, UK
B. Demeneix, Paris cedex 5, France
D.M. Findlay, Adelaide, South Australia, Australia
P. Fowler, Aberdeen, UK
J.W. Funder, Clayton, Victoria, Australia
D. Grammatopoulos, Warwick, England, UK
B. Groner, Frankfurt, Germany
N.A. Hanley, Manchester, UK
O. Hansson, Malmö, Sweden
R. Harris, Augusta, Georgia, USA
L. Hunyady, Budapest, Hungary
J. C. Jonas, Brussels, Belgium
D. Kennaway, Adelaide, South Australia, Australia
S. Kimura, Bethesda, Maryland, USA
J. Kohrle, Berlin, Germany
E. Lalli, Valbonne, France
E.W.F. Lam, London, England, UK
V. Laudet, Banyuls-sur-Mer, France
R. Laybutt, Sydney, New South Wales, Australia
K. Liu, Umeå, Sweden
M. Maggiolini, Cosenza, Italy
M. Matzuk, Houston, Texas, USA
I.J. McEwan, Foresterhill, Scotland, UK
P.L. Mellon, La Jolla, California, USA
Z. Naor, Tel Aviv, Israel
S. Nef, Geneva, Switzerland
R. Nogueiras, Santiago de Compostela, Spain
A.W. Norman, Riverside, California, USA
R. Peeters, Rotterdam, Netherlands
T.M. Penning, Philadelphia, Pennsylvania, USA
W.E. Rainey, Ann Arbor, Michigan, USA
C.T. Roberts, Adelaide, South Australia, Australia
W.J. Roesler, Saskatoon, Canada
M. Santoro, Napoli, Italy
H. Sasano, Sendai, Japan
C. Shaha, New Delhi, India

M. Simoni, Modena, Italy
M.K. Skinner, Pullman, Washington, USA
L. Smith, Edinburgh, Scotland, UK
M. Tena-Sempere, Córdoba, Spain
J. Toppari, Turku, Finland
D. Vanderschueren, Leuven, Belgium
J.A. Visser, Rotterdam, Netherlands
G.F. Wagner, London, Ontario, Canada
A. Walker, Riverside, California, USA
D.B. Wilson, St. Louis, Missouri, USA
T.K. Woodruff, Chicago, Illinois, USA
L. Yin, Ann Arbor, Michigan, USA

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information.](#)

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.

- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2600**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should be no more than 150 words.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Illustration services

[Elsevier's WebShop](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/molecular-and-cellular-endocrinology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr, W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

RESEARCH DATA

Data in Brief

Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary or additional raw data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Authors are encouraged to submit their Data in Brief article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the new, open access journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). [More information and a full list of supported databases](#).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words

and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>