

## EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPONENTES DO SISTEMA PURINÉRGICO EM PACIENTES COM CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREOIDE

ANDRESSA RISSOTTO MACHADO<sup>1</sup>, SIMONE LUCIANA TRIQUEZ<sup>2</sup>, SARAH F.  
V. O. MACIEL<sup>3</sup>

### 1 Introdução

O câncer de tireoide (CT) é a neoplasia endócrina mais comum nos carcinomas de cabeça e pescoço. O projeto Globocan da Organização Mundial da Saúde (OMS), verificou que o CT estava em nono lugar em incidência global em 2020 (SUNG *et al.*, 2021). Quanto aos seus subtipos, deve-se verificar primeiramente o tipo celular inicial da neoplasia, podendo ser células epiteliais foliculares ou células C parafoliculares. A primeira originando os subtipos papilar, folicular, oncocítico e anaplásico, e a segunda dando origem ao subtipo medular. Dentre eles, o carcinoma papilífero de tireoide (CPT) é o mais comum, com uma incidência de 80-90% dos casos, porém com bom prognóstico. Os procedimentos para investigação de CT incluem exames de imagem e a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) realizada em nódulos suspeitos. Após a confirmação da neoplasia, os tratamentos atuais incluem a tireoidectomia parcial ou total, juntamente com a retirada dos gânglios linfáticos adjacentes afetados, se necessário (INCA, 2023).

Os componentes do sistema purinérgico podem servir como base para serem investigados durante o diagnóstico. Ele está envolvido nas respostas celulares imunes, na produção de mediadores inflamatórios, secreção de fatores de crescimento, migração celular e apoptose celular, principalmente o Trifosfato de Adenosina (ATP) e as purinas que estão envolvidos nas vias de modulação e fisiopatologia do câncer (CAVALHEIRO, 2019; IDZKO, 2014). Os nucleotídeos ATP, adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e o nucleosídeo adenosina (ADO) fazem parte desse processo como importantes sinalizadores, além das enzimas ectonucleotidases (CD39 e CD73), que hidrolisam os nucleotídeos, e os

<sup>1</sup>Acadêmica de Enfermagem, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus Chapecó*, contato: andressa.machado@estudante.uffs.edu.br

<sup>2</sup>Acadêmica do Mestrado em Ciências Biomédicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus Chapecó*, contato: simone.triquez@gmail.com

<sup>3</sup>Doutora em genética e professora, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus Chapecó*, contato: sarah.maciell@uffs.edu.br

Grupo de Pesquisa em Oncologia

receptores P1 e P2, que respondem a estes. O ATP é considerado um importante mecanismo de interação entre hospedeiro e tumor (DI VIRGÍLIO, 2012). O presente trabalho se justifica ao apresentar novas evidências de biomarcadores do sistema purinérgico envolvidos em alterações da tireoide, assim, contribuindo para a implementação de métodos diagnósticos que possibilitem mais precisão e terapias individualizadas.

## 2 Objetivos

Avaliar a expressão gênica de componentes do sistema purinérgico em pacientes investigados para CT e em indivíduos sem a doença.

## 3 Metodologia

Estudo transversal de análise quantitativa, com um total de 13 participantes organizados em dois grupos: grupo controle (GC, n=8) e grupo de pacientes investigados para CT (CT, n=5). Os participantes estavam em processo de investigação para CT, atendidos em uma clínica no município de Chapecó-SC. Todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), sob o parecer do CEP número 5.916.906. Foram incluídos participantes maiores de 18 anos, de ambos os sexos, que passaram por consulta médica com endocrinologista e foram submetidos a procedimento cirúrgico para realização de biópsia da tireoide por PAAF. Foram excluídos pacientes com outros tipos de câncer, simultâneo ou anterior, gestantes e pessoas com doenças crônicas não transmissíveis. O GC foi selecionado através de busca ativa aleatória e contato prévio, sendo pareados por idade (três anos a mais ou a menos) e sexo com o grupo de pacientes, e sem diagnóstico passado ou atual de câncer.

A PAAF na tireoide foi realizada por profissional médico especialista, que faz parte da equipe de pesquisa. A coleta de 30 ml de sangue periférico foi realizada por enfermeira, em tubos Vacutainer® (BD Biosciences). As amostras sanguíneas foram processadas para obtenção de células polimorfonucleares (PBMCs). A expressão dos genes alvos (CD39, CD73 e P2X7) foi avaliada pela técnica de RT-qPCR. A extração de RNA foi realizada com o reagente Trizol, de acordo com as especificações do fabricante. O RNA isolado foi tratado com a enzima DNase. As concentrações e pureza dos RNAs foram determinadas com o espectrofotômetro "Nanodrop®" (Thermo Scientific). A retrotranscrição de até 2 ug de RNA para síntese de cDNA foi realizada com o kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription" (Applied Biosystems), conforme as especificações do fabricante. Foram preparadas soluções

de uso do cDNA a 20 ng/ul.

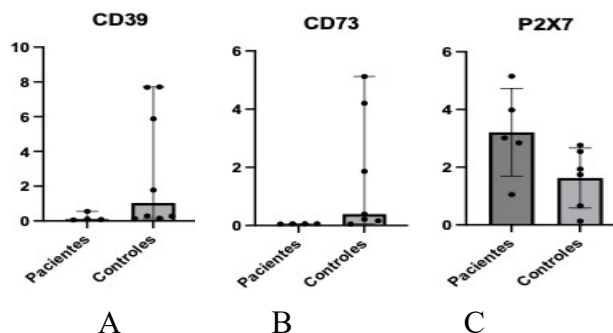
As reações de RT-qPCR foram realizadas no termociclador QIAquant 96 5 plex (Qiagen), com o protocolo "Sybr Green" (Applied Biosystems). A análise da expressão gênica por quantificação relativa foi realizada pelo método do Ct comparativo. Em 10 µl de volume de reação, foram adicionados 2 µl de cDNA (40 ng), 20 uM dos primers forward e reverse e 5 µl de "Sybr Green". Após a análise das temperaturas de dissociação, foi comparada a expressão dos genes alvos entre as amostras dos dois grupos. O gene da actina B (ACTB) foi utilizado como referência, e todas as reações ocorreram em triplicatas.

Optou-se por utilizar apenas as PBMCs para as análises de expressão gênica, pois estas mostraram-se mais significativas. Os dados foram submetidos à análise de distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Para avaliar as diferenças de expressão entre os grupos, foram utilizados os testes de Mann-Whitney (variáveis não paramétricas, mediana e faixa de variação) ou teste T de Student (variáveis paramétricas, média e desvio padrão). Foram considerados significativos os resultados que apresentaram valor de  $P < 0,05$ . As análises foram realizadas no software Graphpad Prism 8.0.

#### 4 Resultados e Discussão

Ao observar o perfil dos participantes da pesquisa, houve prevelância do sexo feminino no grupo CT, com idade média de 60 anos +/- 36-83 anos, o que corrobora com dados recentes do INCA (2022), que mostra que o CT acomete cerca de três vezes mais mulheres do que homens, sendo que a faixa de variação de idade é de 30-60 anos de idade (MSD, 2024).

**Gráfico 1:** Expressão relativa dos genes CD39, CD73 e P2X7 em PBMCs.



Fonte: O autor, 2024

Nota: Os dados dos Gráficos 1A e 1B são apresentados como mediana e IC 95%. O gene CD39 foi menos expresso nos pacientes (n=4) em relação aos controles (n=8) ( $p=0,0485$ ),

assim como o gene CD73 ( $p=0,0424$ ). Os dados do Gráfico C são apresentados como média e desvio padrão. Não houve diferença na expressão do gene P2X7 nos dois grupos ( $p=0,0708$ ).

O Gráfico 1A mostra que o gene CD39 foi menos expresso no grupo CT do que no grupo GC ( $p=0,0485$ ). O estudo realizado por Fang et al. (2024) corrobora tais achados ao demonstrar que em casos de desenvolvimento e tratamento em pacientes com CT, há a redução de 5 imunofenótipos, dentre eles a expressão de CD39. Dessa forma, há indícios de que esse gene pode ser utilizado como um bom biomarcador em processos investigatórios de recorrência ao apresentar aumento de sua expressão. O Gráfico 1B mostra que o gene CD73 foi menos expresso no grupo CT do que no grupo GC ( $p=0,0424$ ). No estudo realizado por Monteiro et al. (2021) foi demonstrado que a expressão de CD73 está ligada ao tipo de neoplasia presente na tireoide, ou seja, a expressão de modo leve esteve presente em tireoide normal, adenoma de células oncocíticas e em adenomas foliculares. Já a expressão intensa foi vista apenas em casos de CPT. O Gráfico 1C mostra que o gene P2X7 não teve diferença de expressão entre os grupos CT e GC ( $p=0,0708$ ). O resultado é consoante a uma pesquisa realizada por Kwon et al. (2014), onde as maiores taxas de expressão do receptor P2X7 foram observados se a doença de Hashimoto estivesse ausente e com a presença de invasão linfonodal, extensão extratireoidiana e metástases. Dessa forma, o fato da diferença entre os grupos não ser significativa é justificada pelo número amostral pequeno e por serem participantes ainda em processo investigativo de neoplasias na glândula tireoide, os quais podem não apresentar complicações que levariam a um aumento expressivo da expressão do receptor P2X7.

## 5 Conclusão

Foi possível esclarecer o envolvimento da expressão gênica do receptor P2X7 e das enzimas CD39 e CD73, no processo de alterações de tireoide. As expressões dos genes CD39 e CD73 foram maiores no grupo CT, com alto potencial para investigação de casos de recorrência da neoplasia e especificidade do subtipo, respectivamente. Já as análises do receptor P2X7 mostraram potencial em casos com mais fatores de progressão tumoral (extensão extratireoidiana e invasão linfonodal). O presente estudo, apesar de seu tamanho amostral limitado, oferece contribuições para o avanço do conhecimento na área de biomarcadores relacionados ao sistema purinérgico em pacientes em processo de diagnóstico para CT. A pesquisa demonstra o potencial dessas vias como ferramentas promissoras na



identificação precoce.

**Palavras-chave:** Expressão gênica; sistema purinérgico; carcinoma papilífero de tireoide.

### Referências Bibliográficas

- BRAUNSTEIN, G. D. **Cânceres da tireoide.** Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/distúrbios-endócrinos-e-metabólicos/distúrbios-da-tireoide/cânceres-da-tireoide>>. Acesso em: 31 jul. 2024.
- Câncer de tireoide.** Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/tireoide>>. Acesso em: 31 jul. 2024.
- CAVALHEIRO, P. B. **Câncer De Tireóide: Avaliação Da Atividade De Enzimas Do Sistema Purinérgico, Butirilcolinesterase e Perfil Oxidativo.** P. 127, 2019.
- CHEN, Z. et al. Immune profiling identifies CD8+ T-cell subset signatures as prognostic markers for recurrence in papillary thyroid cancer. **Frontiers in immunology**, v. 13, 2022.
- CRNČIĆ, Tatjana Bogović. Risk Factors for Thyroid Cancer: what do we know so far?. **Acta Clínica Croatica**, Croácia, v. 56, n. 2, p. 66-72, ago. 2020. Disponível em: <<http://actaclinica.eu/>>. Acesso em: 22 out. 2022.
- FANG, X. et al. Causal role of immune cells in thyroid cancer: a bidirectional Mendelian randomization study. **Frontiers in immunology**, v. 15, 2024.
- IDZKO, M.; FERRARI, D.; ELTZSCHIG, H. K. **Nucleotide signaling during inflammation.** **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 310-317, 2014.
- KWON, J. H. et al. P2X7receptor expression in coexistence of papillary thyroid carcinoma with hashimoto's thyroiditis. **The Korean journal of pathology**, v. 48, n. 1, p. 30, 2014.
- LE, Ying; LU, Donghui; XUE, Meng. Purinergic signaling in thyroid disease. **Purinergic Signalling**, p. 13-19, 26 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11302-022-09858-2>>.
- LE, Ying; XUE, Meng; LU, Donghui. Purinergic signaling in thyroid disease. **Dordrecht, The Netherlands: Springer**, Netherlands, v. 1, n. 1, p. 1-5, mar. 2022. Quarterly. Disponível em: <<https://link.springer.com/journal/11302>>. Acesso em: 22 out. 2022.
- MAIA, Ana Luiza *et al.* Diagnóstico, tratamento e seguimento do carcinoma medular de tireoide: recomendações do departamento de tireoide da sociedade brasileira de endocrinologia e metabologia. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 7, p. 667-700, out. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0004-2730000003427>>.
- NEVES JUNIOR, Murilo Pedreira *et al.* FOXP3 expression in papillary thyroid carcinoma with and without Hashimoto's thyroiditis. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.L.], v. 49, n. 4, p. 283-287, ago. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s1676-24442013000400010>>.
- NGUYEN Quang T. et al. Diagnosis and treatment of patients with thyroid cancer. **Am Health Drug Benefits**. 2015 Feb;8(1):30-40.
- ROBBINS & COTRAN. **Bases Patológicas das Doenças.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209- 249, 2021. Wiley. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3322/caac.21660>>.

**Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2023-0517**

**Financiamento:** Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)