



MARJORY ALANA MARCELLO

**ESTUDO MOLECULAR DA ADIPONECTINA, GRELINA, LEPTINA E
RESISTINA: ESTABELECENDO AS LIGAÇÕES ENTRE A OBESIDADE E O
CÂNCER DE TIREOIDE**

CAMPINAS

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

MARJORY ALANA MARCELLO

**ESTUDO MOLECULAR DA ADIPONECTINA, GRELINA, LEPTINA E
RESISTINA: ESTABELECENDO AS LIGAÇÕES ENTRE A OBESIDADE E O
CÂNCER DE TIREOIDE**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Clínica Médica Área de Concentração em Clínica Médica.

ORIENTADOR: PROFA. DRA. LAURA STERIAN WARD

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
MARJORY ALANA MARCELLO, E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. LAURA STERIAN WARD.

CAMPINAS

2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M331e Marcello, Marjory Alana, 1986-
Estudo molecular da adiponectina, grelina, leptina e resistina : estabelecendo as ligações entre a obesidade e o câncer de tireoide / Marjory Alana Marcello. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Laura Sterian Ward.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Glândula tireoide. 2. Neoplasias. I. Ward, Laura Sterian, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Molecular profile of adiponectin, ghrelin, leptin and resistin : establishing the links between obesity and thyroid cancer

Palavras-chave em inglês:

Thyroid gland

Neoplasms

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

Laura Sterian Ward [Orientador]

Ivan Felizardo Contrera Toro

André Almeida Schenka

Rita de Cassia Ferreira

Gláucia Maria Ferreira da Silva Mazeto

Data de defesa: 05-03-2015

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

FOLHA DE APROVAÇÃO

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARJORY ALANA MARCELLO

ORIENTADOR(A): PROF(A). DR(A). LAURA STERIAN WARD

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). LAURA STERIAN WARD

2. PROF(A). DR(A). IVAN FELIZARDO CONTRERA TORO

3. PROF(A). DR(A). ANDRÉ ALMEIDA SCHENKA

4. PROF(A). DR(A). RITA DE CASSIA FERREIRA

5. PROF(A). DR(A). GLÁUCIA MARIA FERREIRA DA SILVA MAZETO

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 05 de março de 2015

ABSTRACT

The incidence of obesity and of differentiated thyroid cancer (DTC) has increased exponentially over the world and there are strong indications that these two conditions are combined. Several studies have shown that adipokines such as adiponectin, resistin, leptin and ghrelin may be the link between these diseases. The objective of this investigation was to study the molecular profile of adipokines: adiponectin, leptin, resistin and ghrelin and its relationship with the anthropometric features of patients with various types of thyroid nodules in order to investigate the link between obesity and neoplasms and identify possible markers of diagnosis, evolution and prognosis for DTC. A group of patients with DTC, patients with benign thyroid nodules and healthy control subjects were interviewed about their eating habits and routine, and went through a complete anthropometric assessment. The serum concentrations of adiponectin, leptin, resistin, and ghrelin were measured by ELISA. Patients were genotyped for 21 SNPs in genes encoding adipokines and their receptors using Taqman SNP Genotyping technique. In addition, surgical specimens were investigated for mRNA of these adipokines. We demonstrated that being overweight increases the risk of developing CDT almost 4 times and this risk may increase when there is excess intake of calories associated with excessive consumption of carbohydrates and proteins. Serum concentrations of adipokines were excellent markers of nodules malignancy diagnosis, with a 100% accuracy using leptin and resistin. The genetic inheritance of polymorphisms rs7799039 in LEP rs1137101 and rs2232165 in LEPR in GHRS increased the risk of developing CDT 4, 11 and 22 times, respectively. In addition, SNPs heritage in LEP (rs7799039,

rs2167270), ADIPOQ - rs12629945, ADIPOR1 - rs2232853 and rs1342387, ADIPOR2 - rs1058322 and GHSR - rs2232165 altered serum concentrations of leptin, adiponectin and ghrelin. Also, we showed that although the thyroid cell is not the main producer of adipokines, adiponectin, leptin, and ghrelin resitina are produced by thyroid câncer cells, findng mRNA for all cytokines in the tissues analyzed, suggesting that they play an important role in tumorigenesis or thyroid tumor proliferation. We conclude that individuals with thyroid nodules, especially individuals with DTC have different anthropometric and molecular adipokine profiles that increases the susceptibility to DTC as well as genetic changes and / or expression of adiponectin, leptin, resistin and ghrelin. We suggest that it is possible to draw a CDT carrier Individual profile for body constitution, eating habits and molecular profile of adiponectin, leptin, resistin and ghrelin may identify individuals at risk for DTC, and are a potential link between obesity, inflammation, and DTC.

RESUMO

A incidência da obesidade, bem como do câncer diferenciado de tireoide (CDT), tem aumentado exponencialmente em todo o mundo e existem sólidos indícios de que essas duas condições se associam. Diversos estudos demonstram que adipocinas como adiponectina, leptina e resistina e também a grelina podem ser o elo entre essas doenças. O objetivo deste trabalho foi de verificar os perfis antropométrico e molecular das adipocinas: adiponectina, leptina, resistina e grelina de pacientes com diversos tipos de nódulos tireoidianos e compará-los a indivíduos saudáveis, buscando encontrar o elo entre a obesidade e o CDT, além de identificar possíveis marcadores de diagnóstico, evolução e prognóstico para o CDT. Estudamos pacientes com CDT, pacientes com nódulos tireoidianos benignos e indivíduos controle saudáveis. Todos foram entrevistados quanto a seus hábitos alimentares e rotina, além de passarem por avaliação antropométrica completa. Para investigar o perfil molecular da adiponectina, leptina, resistina e grelina, investigamos as concentrações séricas dessas citocinas através da técnica de ELISA, genotipamos os pacientes para 21 SNPs nos genes que codificam as adipocinas e também seus receptores através da técnica Taqman SNP Genotyping, analisamos ainda, espécimes cirúrgicos dos pacientes quanto a produção de RNAm dessas adipocinas. Demonstramos que o excesso de peso aumenta o risco de de CDT em quase 4 vezes e esse risco pode aumentar ainda mais com a ingestão excessiva de calorias, associada ao consumo excessivo de carboidratos e proteínas. As concentrações séricas das adipocinas podem ser excelentes marcadores de diagnóstico entre nódulos tireoidianos malignos e benignos, sendo

que a acurácia do teste utilizando a leptina e resistina chegou a 100%. A herança genética dos polimorfismos rs7799039 em *LEP*, rs1137101 em *LEPR* e rs2232165 em *GHSR* aumentou o risco de CDT em 4, 11 e 22 duas vezes, respectivamente. Além disso, a herança de SNPs em *LEP* (rs7799039, rs2167270), *ADIPOQ* - rs12629945, *ADIPOR1* – rs2232853 e rs1342387, *ADIPOR2* - rs1058322 e *GHSR* - rs2232165 alterou as concentrações séricas de leptina, adiponectina e grelina. Demonstramos, ainda, que embora a célula tireoidiana não seja a principal produtora de adipocinas, a adiponectina e seus receptores, o receptor da leptina, e a grelina e seu receptor são produzidos por células tumorais tireoidianas, uma vez que encontramos RNAm para todas essas citocinas nos tecidos analisados, sugerindo que essas adipocinas desempenham um papel importante nesses tecidos. Concluimos que indivíduos portadores de nódulos tireoidianos, especialmente os indivíduos portadores de CDT possuem um perfil antropométrico e molecular (em relação às adipocinas) diferenciado, sendo que aqueles que estão mais fora do peso considerado adequado estão mais suscetíveis ao CDT, assim como aqueles que apresentam alterações genéticas e/ou de expressão da adiponectina, leptina, resistina e grelina. Sugerimos que é possível traçar um perfil do indivíduo portador de CDT em relação a sua constituição física, seus hábitos alimentares e também o seu perfil molecular a adiponectina, leptina, resistina e grelina, que foram identificadas como boas candidatas a marcadores moleculares para o CDT, além de serem potenciais links entre a obesidade, inflamação e CDT.

SUMÁRIO

1.Introdução	01
1.1 Obesidade, IMC e o Câncer de Tireoide.....	01
1.1.1 Dados epidemiológicos.....	01
1.1.2 Associação entre obesidade e CDT: estudos observacionais..	05
1.2 Mecanismos envolvidos na associação entre a obesidade e CDT.....	10
1.2.1 Inflamação.....	11
1.2.2 Adipocinas.....	16
2. Objetivos.....	28
3. Casuística e Métodos.....	30
3.1. Casuística.....	30
3.1.1 Obtenção de dados antropométricos e clinicopatológicos da casuística.....	33
3.2. Enzyme Linked ImunoAssay (ELISA).....	33
3.2.1. Protocolo Geral ELISA.....	34
3.3.Estudo dos polimorfismos nos genes das adipocinas e seus receptores: Taqman SNP Genotyping.....	35
3.3.1. Extração de DNA de leucócitos.....	36
3.3.2. Genotipagem dos SNPs selecionados por Taqman SNP Genotyping.....	37
3.4. Análise da expressão do RNAm das adipocinas e seus receptores.....	38

3.4.1. Extração de RNA de tecido tireoidiano.....	39
3.4.2. Síntese de cDNA.....	40
3.4.3. PCR quantitativa (qPCR) em tempo real.....	41
3.5. Metodologia Estatística.....	42
4. Resultados.....	44
4.1. Excesso de peso e CDT.....	44
4.2 Dieta e CDT.....	46
4.3 Análises séricas – ELISA.....	49
4.4 Análise do perfil genético da ADIPOQ, ADIPOR 1, ADIPOR 2, LEP, LEPR, RETN, GHRL e GHSR	56
4.4.1. Genótipos e suscetibilidade ao CDT.....	56
4.4.2. Análise dos genótipos com as dosagens séricas obtidas.....	59
4.5 Expressão gênica por qPCR das adipocinas e seus receptores.....	64
5. Discussão	66
6. Conclusões.....	78
7. Referências Bibliográficas	81
8. Anexos	108

Dedico esta tese:

Aos meus pais, **Elza (in memorian)** e **Jose Dirlei**, os maiores incentivadores de meus estudos, aqueles que apoiaram minhas escolhas e enxergaram muito além do que eu podia ver. Os melhores pais do mundo!

À vocês, não apenas esta tese, mas meu amor e gratidão eternos.

Às minhas irmãs, **Marusha** e **Marlise**, os pedaços do meu coração que batem fora do meu peito, minhas grandes incentivadoras e amigas. A melhor parte de mim.

Meu amor por vocês não tem tamanho!

À minha orientadora e segunda mãe, **Dra. Laura Ward**, por sempre ter acreditado em mim, nestes oito anos que passamos juntas. Por ser mais que uma orientadora de tese, uma orientadora de vida.

Eu a admiro muito.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

*“There should be no boundary to human endeavour. However bad life may seem,
while there is life, there's hope.”*

(Stephen Hawkin)

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”

(Walter S. Landor)

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pois sem Ele, nada jamais estaria aqui.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Laura Sterian Ward**, pesquisadora excelente e ser humano fantástico! Nem mil linhas de agradecimento poderiam de fato lhe agradecer por tudo aquilo que me ensinou, pelas oportunidades que me deu, pelos exemplos diários, pelo carinho que me dedicou. Digo de coração: muito obrigada! Desejo que um dia eu possa ser para meus alunos aquilo que a senhora representa para mim.

À minha mãe, **Elza Maria Schiavone Marcello** (*in memoriam*), mulher admirável e melhor mãe do mundo. Você é a minha inspiração não apenas enquanto mãe, profissional ou mulher, mas enquanto ser humano. Sem você, minha mãe, eu jamais poderia ter ido tão longe! Onde estiver, saiba que te amo muito e que sinto sua falta todos os meus dias.

Ao meu pai, **José Dirlei Marcello**, meu herói! Por ter me ensinado a sonhar longe, a ver além. Por todas as vezes em que titubeei e que me disse: “vai, filha, eu estou aqui ‘pra’ te apoiar”. Por todos os exemplos que me deu de integridade, honestidade, luta, caráter. Por sua dedicação exemplar a mim e às minhas irmãs. Por sua luta e vontade de viver, por nós e para nós. Obrigada por ser meu porto seguro! Eu o amo profundamente! Obrigada também à **Marlene Gomes**, sua companheira, por ter cuidado de meu pai durante estes anos, me dando a certeza de que eu poderia seguir em frente, pois ele estava bem acompanhado.

Às minhas irmãs **Marusha Loraine Marcello** e **Marlise Ticiane Marcello**, por serem a melhor parte de mim. Obrigada por toda a compreensão, por todo o incentivo, por toda a amizade. Por me darem exemplos todos os dias de que é preciso ir à luta e que independentemente de qualquer coisa, a vida continua. Por terem se tornado essas mulheres fantásticas que são, e que sempre estiveram ao meu lado, mesmo quando distantes. Vocês são meus maiores orgulhos, minhas eternas “irmãzinhas”. Eu amo vocês!

Ao meu noivo, **Everton Henrique Calimerio de Oliveira**, aquele que compreendeu ausências, estresses, choros, decepções. E que respondeu a isso tudo com colo, beijos, abraços e incentivos. Agradeço por todas as vezes em que cuidou de mim. Em que pacientemente me ouviu e me acalmou em minhas angústias, em que me declarou amor, em que lembrou de como eu era capaz, em que foi calma quando fui tormenta. Por ter me dado a oportunidade não apenas de construir sonhos, mas por sonhá-los comigo, me dizendo que me apoiaria e me seguiria no que quer que fosse. Por ser muito mais que noivo, namorado, amigo, amante. Por ser companheiro. Sou muito grata por ter você em minha vida! Te amo muito!

À **Daniele Bussioli Alves Correa, Filipe Dourado Sucupira, Juliana Higa e Luisa Lazarini Rubio**, amigos que são como irmãos! Não saberia agradecer adequadamente por todas as vezes em que foram meus ombros amigos e me disseram que tudo ia dar certo. Por todas as cervejas acompanhadas de bons papos e também de lamentos que tomamos e também por terem compreendido todas as que deixei de tomar para que pudesse concluir este trabalho. Por todas as vezes em que estiveram ali, mesmo quando não pedi. Encontrá-los ao longo de nossa caminhada foi um dos meus maiores presentes. Obrigada por serem quem são!

Aos amigos e colegas que passaram pelo **Laboratório GEMOCA** nos quatro anos de execução deste trabalho: **Aline Carolina De Nadai, Angélica Gomes da Rocha, Camila Ayume Amano Cavallari, Carolina Fernandes Reis, Caroline Torricelli, Elaine Cristina Morari, Fernando de Assis Batista, Helvia Nascimento, Jacqueline Fatima Martins de Almeida, Karina Colombero Peres, Lais Amaral, Lucas Leite Cunha, Mariana Bonjorno Martins, Murilo Meneghetti, Natassia Elena Bufalo, Priscila Pereira Costa Araújo, Raquel Bueno Barbieri, Renata Pastana Piai, Rita de Cassia Ferreira, Ulieme Cardoso, Willian Tsumura**, meu muito obrigada por todas as vezes em que me estenderam as mãos. Pelas infinitas “ajudinhas” na bancada, pelos momentos de descontração, pelos ensinamentos, pela paciência, pelo carinho. Um agradecimento especial à **Jacqueline**, por ter me ajudado muito com o extenso trabalho de bancada que esta

tese propiciou, por ter compartilhado comigo toda a preocupação e os perrengues das genotipagens, pelas conversas despretensiosas, para distração; à **Natassia**, querida, por ter me ajudado tanto na finalização desta tese, por ter me acalmado e me mostrado soluções que eu nem conseguia ver; e ao **Lucas**, menino brilhante, bioestatístico sem igual, meu fiel amigo e grande incentivador, que nunca me deixou abater por todas as adversidades no caminho.

À **Profa Dra Elaine Cristina Morari**, por ter sido a primeira a me estender a mão em minha trajetória no GEMOCA. Por ter acreditado desde o princípio em mim, aquela menina de 21 anos tão sonhadora, por ter me mostrado meu potencial, compartilhado comigo seu conhecimento, por ter me dado todas as oportunidades que poderia para meu desenvolvimento. E, acima de tudo, agradeço por ter me oferecido sua amizade, seu carinho, sua dedicação. Por ter compartilhado comigo sua família, seus amigos e, recentemente, me dado um sobrinho de coração. Infelizmente a distância não me permite ouvir sua voz todos os dias gritando meu nome, mas eu a carrego em meu coração todos os dias. Obrigada por tudo, minha amiga!

À **Mariana Bonjorno Martins** e ao **Fernando de Assis Batista**, sem os quais uma boa parte destes quatro anos não teria a menor graça! Vocês chegaram não apenas para somar ao Laboratório GEMOCA, mas para multiplicar em minha vida, tanto do ponto de vista profissional quanto do pessoal. Sou grata a Deus por ter me dado a oportunidade de conhecê-los, de tê-los como meus colegas de trabalho e, principalmente, por termos nos tornado amigos. Agradeço imensamente por tudo aquilo que já compartilhamos e também por tudo o que sei que ainda iremos compartilhar, vocês são muito valiosos em minha vida! Estiveram presentes em tantos bons (e também nos maus) momentos que nem sei como seria minha vida sem vocês... Tenho muito orgulho de tê-los como amigos e, mais ainda, de poder acompanhar e contribuir com o desenvolvimento científico de vocês! Meninos de ouro, me dão muito orgulho!

Aos meus amigos de infância, adolescência e vida adulta: **Ben Hur Miglioransa, Elton Kawasima, Guilherme Manzi e Matheus Masone**. Por nunca me permitirem esquecer a minha real essência. Por sempre estarem ao meu lado,

me fazendo me sentir amparada. Por serem quem são e terem colaborado para que eu me tornasse o que eu sou. Minha vida é melhor desde quando nos encontramos!

A todos os meus **alunos e ex-alunos**, por terem me tornado uma pessoa melhor. Por terem feito todos os meus anos de pós graduação mais leves e engraçados, por me terem feito acreditar cada vez mais que não há problemas intransponíveis, por terem feito com que eu nunca me esquecesse de que há um mundo real lá fora e há pessoas maravilhosas nele! Obrigada!

À toda a equipe do **Hospital de Câncer de Barretos**, realmente o hospital do amor e um exemplo de instituição. Em especial, Ao **Prof. Dr. André Lopes Carvalho**, por seu apoio, paciência e sabedoria. Sem nossa parceria este trabalho jamais teria sido executado, muito obrigada!

À **Dra Ligia Vera Montalli da Assumpção** e à **Dra Elba C. S. S. Etchebehere**, por permitirem meu acesso aos pacientes da UNICAMP e aos dados relativos a eles, por terem sido tão solícitas quando pedi ajuda, por terem me encorajado a prosseguir em minhas pesquisas sempre.

A todos do **Laboratório Limed**, especialmente ao **Dr Bruno Geloneze**, **Profa Dra Ana Carolina Junqueira Vasquez** e ao querido amigo **Msc. Antonio Ramos Calixto**, que contribuíram imensamente para o meu interesse pelos fatores moleculares associados à obesidade, me fornecendo conhecimentos essenciais para que essa tese se estruturasse; além, é claro, de toda a ajuda metodológica que me ofereceram. MUITÍSSIMO obrigada pela ajuda e carinho.

A todos os **pacientes e voluntários** que, doando um pouco de si, tiveram o desprendimento e a generosidade de possivelmente ajudarem não a si mesmos, mas a outros.

Ao **CNPq**, pois sem o apoio financeiro e bolsa, este trabalho não poderia ter sido desenvolvido.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma.....	3
Figura 2: Alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas da obesidade.....	15
Figura 3. Representação das vias moleculares com as quais a adiponectina interage, destacando-se as vias de AKT, mTOR e AMPK, todas já bem conhecidas por terem influência na carcinogênese tireoidiana.....	19
Figura 4. Principais vias moleculares com as quais a grelina interage e sobre as quais pode exercer seus efeitos, destacando-se as vias de PI3K/AKT e ERK, que são muito conhecidas por seus efeitos na carcinogênese tireoidiana.....	22
Figura 5. Representação esquemática mostrando com quais vias celulares/moleculares a leptina interage e exerce atividades, com destaque para RAS, RAF, STAT3, PI3K e MAPK, todos conhecidos por seus importantes efeitos nas células tireoidianas, especialmente naquelas em que estão passando por transformação neoplásica.....	25
Figura 6. Esquema demonstrando as mais diversas células e moléculas sobre as quais a resistina atua, exercendo suas funções. Destacamos aqui as moléculas do sistema imune, as quais exercem regulação sobre a resistina, mas que também são reguladas por ela.....	27

Figura 7. Box plot com as concentrações de cada uma das adipocinas em pacientes com CDT comparando-as com as concentrações encontradas em portadores de nódulos benignos.....	51
Figura 8. Distribuição dos genótipos entre controles e pacientes com CDT. Polimorfismos <i>LEP</i> rs7799039.....	57
Figura 9: Distribuição dos genótipos entre controles e pacientes com CDT. Polimorfismo <i>LEPR</i> rs1137101.....	57
Figura 10: Distribuição dos genótipos entre controles e pacientes com CDT. Polimorfismo <i>GHSR</i> rs2232165.....	58
Figura 11: Diferenças na expressão de leptina em indivíduos portadores de diferentes genótipos de <i>LEP</i> rs7799039 e <i>LEP</i> rs2167270.....	60
Figura 12: Diferenças na expressão de adiponectina em indivíduos portadores de diferentes genótipos de <i>ADIPOQ</i> rs12629945.....	61
Figura 13: Diferenças na expressão de adiponectina em indivíduos portadores de diferentes genótipos de <i>ADIPOR1</i> rs2232853 e <i>ADIPOR1</i> rs1342387.....	62
Figura 14: Diferenças na expressão de adiponectina em indivíduos portadores de diferentes genótipos de <i>ADIPOR2</i> rs1058322.....	62
Figura 15: Diferenças na expressão de grelina em indivíduos portadores de diferentes genótipos de <i>GHSR</i> rs2232165	63
Figura 16: Curva de amplificação do gene <i>GHRL</i> , que codifica a grelina e do controle endógeno <i>GAPDH</i>	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas dos indivíduos incluídos neste estudo.....	45
Tabela 2. Distribuição da ingestão calórica nos grupos de CDTs e controles, considerando suas necessidades individuais, de acordo com as recomendações da OMS. As comparações foram ajustadas para etilismo e IMC.....	47
Tabela 3. Porcentagens da contribuição energética de macronutrientes da dieta, de acordo com as recomendações da OMS, em pacientes com CDT e em controles. As comparações foram ajustadas para etilismo e IMC.....	48
Tabela 4: Valores obtidos pelas curvas ROC da comparação entre malignos vs benignos.....	50
Tabela 5: Comparações de diferentes tipos histopathologicos de acordo com a expressão média de adiponectina, leptina, resistina e grelina.....	53
Tabela 6: Características clínicas de pacientes com CDT de acordo com a expressão de adiponectina, leptina, resistina e grelina.....	54

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – OBESIDADE, IMC E O CÂNCER DE TIREOIDE

1.1.1 – Dados epidemiológicos

A Organização Mundial de Saúde (OMS) utiliza o índice de massa corporal (IMC), uma medida do peso em relação à altura (kg/m^2) para indicar a gordura corporal, e recomenda uma média de IMC na faixa de 21-24 kg/m^2 para a manutenção de boa saúde geral. A indicação da OMS é de que o IMC esteja na faixa 18,5-24,9 kg/m^2 , uma vez que um grande número de estudos já demonstraram que há um risco aumentado de comorbidades para IMCs variando de 25,0-29,9 kg/m^2 , e um risco moderado a alto de comorbidades para indivíduos com IMC maior que 30 kg/m^2 (1). A OMS estima que, atualmente, 65% da população mundial vive em países onde o excesso de peso e obesidade causam mais doenças e mortes do que a desnutrição (1). A prevalência mundial da obesidade quase dobrou entre 1980 e 2008 (2), e, embora estudos mais recentes venham mostrando uma tendência de estabilização nas taxas crescentes de obesidade (3, 4), as taxas de sobrepeso e obesidade ainda permanecem muito elevadas na população (4). Ainda segundo a OMS, mais de 50% da população da América, Mediterrâneo Oriental e Europa estavam acima do peso em 2008 (4).

A obesidade e o excesso de peso têm sido reconhecidos como importantes fatores para o desenvolvimento de várias doenças, dentre elas a hipertensão,

hipercolesterolemia, diabetes, resistência à insulina e diferentes tipos de câncer. De maneira similar ao que ocorre com a obesidade, o CDT vem crescendo significativamente nas últimas décadas (5-9). Este aumento deve-se principalmente ao aumento na incidência dos carcinomas diferenciados da tireoide (CDTs), e mais especificamente dos carcinomas papilíferos da tireoide (CPTs) (10).

Estimativas da Sociedade Americana de Câncer para o ano de 2013 mostraram que o câncer de tireoide foi o 5º tipo mais frequente de câncer entre as mulheres (11). Estes dados também foram válidos para o Brasil no mesmo período, no qual o câncer de tireoide ocupou o 4º tipo de câncer mais frequente na população feminina (12). Para o ano de 2014, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimava que registraríamos cerca de 580 mil casos novos de câncer, sendo 1150 casos novos de câncer de tireoide para o sexo masculino (o décimo terceiro mais frequente nos homens na região Sul e Nordeste, e nas regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste, o décimo quarto). Para o sexo feminino estimava-se 8050 novos casos de câncer de tireoide, sendo o quinto colocado na classificação nacional, na Região Sul o quarto, na região Sudeste o sexto, e na região Centro-Oeste o nono câncer mais frequente (Figura 1) (13).

Localização primária	casos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Figura 1: Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma. Modificado de INCA, 2014 (13).

O câncer de tireoide apresenta diferentes tipos histológicos. A maioria dos carcinomas é de CPTs, seguida dos carcinomas foliculares (CFT). Estes dois tipos são derivados das células foliculares e são agrupados como carcinomas diferenciados da tireoide (CDT). Os demais tipos são considerados mais raros e agressivos, sendo que os Indiferenciados representam aproximadamente 1% dos carcinomas tireoidianos, enquanto que os medulares, que são derivados das células parafoliculares, produtoras de calcitonina, representam apenas 3% dos carcinomas tireoidianos (14). Os CPTs representam aproximadamente 85% das malignidades epiteliais da tireoide, sendo os grandes responsáveis pelo aumento em incidência dos cânceres de tireoide de forma geral (10). São cânceres indolentes, e a maioria deles não tem uma progressão clínica considerável, que levaria o paciente à morte (15). Isso é evidenciado pelos dados que mostram que, embora a incidência de cânceres da tireoide tenha aumentado significativamente nos últimos anos, as taxas

de mortalidade permaneceram estáveis, sugerindo que boa parte desses tumores anteriormente não diagnosticados possivelmente nunca apresentariam uma evolução clínica (16).

No entanto, as razões pelas quais a incidência do CDT tem aumentado ainda não são bem estabelecidas e permanecem controversas (17). Diversos autores sugerem que este aumento de incidência está relacionado apenas a melhoria nos métodos diagnósticos e ao acesso da população a eles, utilizando como justificativa o fato de que os tumores que mais cresceram em incidência são os tumores pequenos, que no passado não podiam ser percebidos ao principal exame clínico, que era a palpação do pescoço do paciente (7, 18, 19). Porém, outros autores já demonstraram que o aumento da incidência não compreende apenas os tumores menores que 1 cm (com diagnóstico favorecido por melhores exames de imagem), mas compreende também os tumores maiores, o que torna inviável dizer que as mudanças na incidência estariam ocorrendo exclusivamente devido a melhorias no diagnóstico e acesso ao sistema de saúde (20).

Desta forma, é possível hipotetizar que estamos sujeitos a uma crescente exposição a fatores que podem contribuir para este notável aumento de CDTs que vem sendo relatado. Dentre os fatores de risco já bem reconhecidos para o desenvolvimento do CDT, é possível listar a exposição prévia a radiação ionizante, a ingesta de iodo, a história familiar de doenças tireoidianas, os fatores hormonais e reprodutivos e os níveis de TSH alterados. Mais recentemente, o perfil genético, a presença de inflamação na área peritumoral e também o IMC vem sendo incluídos na lista de potenciais fatores de risco para o CDT (9).

1.1.2 - Associação entre a obesidade e o CDT: estudos observacionais

A relação entre o excesso de peso e câncer tem sido investigada há décadas, e os primeiros estudos disponíveis remontam à década de 1940. Em 1987, a década em que o primeiro “boom” da obesidade foi relatado, Albanes revisou uma série de estudos sobre a relação entre vários tipos de câncer e sobrepeso e observou que os indivíduos com elevado peso corporal ou alta ingestão calórica apresentavam maior risco de desenvolver cânceres de mama, cólon, reto, próstata, endométrio, rim, colo de útero, ovário, tireoide, e de vesícula biliar (21). Entretanto, foi somente após o ano 2000 que estudos com maiores coortes e design mais convincentes começaram a aparecer, fornecendo as primeiras evidências sólidas da relação CDT e excesso de peso (22).

Existem dois tipos de estudos observacionais compreendendo a relação entre obesidade e CDT: um primeiro tipo, em que a prevalência de CDT é procurada em pacientes obesos/com sobrepeso; e um segundo tipo, em que os pacientes com CDT são investigados em relação a presença de obesidade. Estas abordagens nos fornecem informações diferentes, e é importante observar que a obesidade pode ser um epifenômeno do CDT, fazendo com que os resultados do segundo tipo de estudo devam ser interpretados com cautela, uma vez que, até o presente momento não há evidências concretas de que o CDT induz alterações metabólicas importantes.

Em 2000, Dal Maso et al, analisaram 12 estudos caso-controle realizados durante a década de 1990, incluindo 2.056 mulheres e 417 homens com CDT, e encontraram uma fraca relação do IMC no diagnóstico com o aumento do risco de

CDT em mulheres (OR = 1.2), mas nenhuma associação foi encontrada para o sexo masculino (23). Apesar de, até então, alguns outros autores terem mostrado associações da ingesta de alimentos com o risco de CDT (24-26), neste primeiro grande estudo, foram considerados apenas os fatores antropométricos, não tendo sido incluídos quaisquer dados sobre os hábitos alimentares ou outros possíveis fatores que poderiam estar relacionados à relação da obesidade com o risco de CDT. No entanto, estes estudos relacionados a fatores que poderiam conectar a obesidade ao câncer, forneceram a base lógica para estudos posteriores. Nos anos 90, houveram poucos estudos que procuravam compreender os mecanismos envolvidos nos cânceres de tireoide relacionados a obesidade.

Durante a próxima década (2001-2010), muitos estudos investigaram a relação entre o excesso de peso e cânceres e, embora uma parte considerável deles não tenha sido projetada especificamente para o CDT, muitos autores apresentaram dados evidenciando a relação entre CDT e obesidade. Estes estudos incluíram coortes maiores e, até o final da década, os mecanismos que ligariam CDTs e sobrepeso/obesidade começaram a aparecer como objetos de investigação (22, 27-29).

Estudos posteriores mostraram associações entre peso, IMC, área de superfície corpórea e/ou sobrepeso/obesidade e CDT, demonstrando que esses parâmetros elevam o risco de desenvolvimento desses tipos de câncer (30-33). No entanto, como já afirmaram Wolin, Carson e Colditz em uma completa revisão sobre a associação de obesidade com os cânceres, até o ano de 2010, ainda haviam poucos estudos conclusivos sobre os mecanismos que ligariam o

sobrepeso/obesidade e os cânceres de tireoide (34), embora alguns autores tenham começado a apontar para vias relacionadas com a insulina como possíveis fatores envolvidos nessa relação (35-39).

Durante a década atual, vários autores têm estudado a relação entre o excesso de peso e o câncer, tentando propor mecanismos envolvidos nesta relação, com base nos avanços feitos pela biologia molecular. Kitahara et al publicaram três grandes análises de estudos de coorte sobre os papéis da obesidade, da quantidade de exercício praticada e da circunferência da cintura no CDT (40, 41). Em todos esses estudos, que incluíram grandes casuísticas, os autores demonstraram que os indivíduos com excesso de peso e obesos apresentaram maior risco de desenvolver cânceres da tireoide (HR= 1,20; 95%CI, 1,04-1,38 e HR= 1,53; 95%CI: 1,31-1,79, respectivamente) quando comparados com indivíduos eutróficos (42). Além disso, indivíduos com IMC ≥ 25 kg/m² que declararam realizar maiores quantidades de atividade física apresentaram um maior risco de CDT (HR = 1,34 IC 95%: 1,09-1,64) (40). Quando estudaram alguns parâmetros antropométricos, Kitahara et al demonstraram que circunferências de cintura aumentadas (>102 cm nos homens e >88 cm nas mulheres) aumentaram o risco de CDT não só nos homens (HR = 1,79; IC 95%: 1,21-2,63) mas também nas mulheres (HR= 1,54; IC95%: 1,05-2,26) (41), sugerindo que a adiposidade central poderia exercer um efeito sobre o equilíbrio hormonal e o metabolismo, aumentando, assim, o risco de CDT.

Em 2012, dois outros estudos com grandes casuísticas demonstraram a associação do excesso de peso com cânceres da tireoide também. Rinaldi et al

estudaram 343.765 mulheres e 146.824 homens, encontrando entre eles uma incidência de 566 cânceres da tireoide. Neste estudo, os autores encontraram uma associação do CDT com o sexo feminino (HR (mais alto vs quintil mais baixo) = 1,41; IC95% = 1,03-1,94), mas não significativa para os homens (43). Zhao et al, em uma meta-análise de cinco estudos, incluindo um total de 8.099.411 indivíduos e 5.154 pacientes com CDT, demonstraram que o excesso de peso estava associado com um risco aumentado de CDT (OR = 1,18; IC95% = 1,11-1,25). Ambos sobrepeso e obesidade foram fatores de risco para o CDT, embora o excesso de peso represente um risco ligeiramente menor do que a obesidade (OR = 1,13; IC 95%: 1,04- 1,22 - para sobrepeso e OR = 1,29; IC95% = 1,18- 1,41 para a obesidade) (44).

Em 2013, Kim et al mostraram que a obesidade não apenas estava associada com um risco aumentado de CDT, mas também podia exercer uma influência sobre a forma como o tumor se desenvolve. Autores relataram que um aumento do IMC estava associado a PTCs >1 cm (OR = 1,31; $p < 0,001$), invasão extra-tireoidiana microscópica (OR= 1,23, $p = 0,006$), e com estadió TNM avançado (II e IV) (OR = 1,30, $p = 0,003$) (45). Neste mesmo ano, Han et al demonstraram que, dentre 15.068 indivíduos (8491 homens e 6577 mulheres) que passaram por exames de check-up de saúde geral, 1427 passaram por biópsia de agulha fina (PAAF) por apresentarem nódulos tireoidianos considerados suspeitos, tendo sido confirmada a presença de malignidade em 267 deles. Os cânceres de tireoide diagnosticados em mulheres estiveram associados a IMCs mais altos, sendo que a cada 5 kg/m² de aumento,

estas mulheres apresentavam 1,63 vezes mais risco de CDT (OR)=1.63, 95% CI 1.24-2.10, $P<0.001$).

No ano de 2014, Kitahara et al demonstraram que a altura e o IMC durante a infância podem afetar o risco de desenvolvimento do CDT, sugerindo duas importantes colocações: 1) a obesidade realmente não seria um epifenômeno, mas sim uma condição que propicia o desenvolvimento e/ou crescimento de tumores tireoidianos; e 2) o controle de fatores de risco como a obesidade, desde a infância, pode ser de grande ganho para a vida adulta, prevenindo o aparecimento do CDT (46). Seguindo este raciocínio, Cham et al compararam o rastreamento de nódulos tireoidianos em obesos, seguindo diferentes guidelines: realização de ultrassom (US) em todos os obesos, US nos obesos que tinham nódulos palpáveis e US em obesos que tinha pelo menos um fator de risco associado (além da obesidade). Os autores sugeriram que, a presença da obesidade associada a fatores de risco como histórico familiar, exposição a radiação, histórico de tireoidite de Hashimoto ou TSH elevado, deve ser um fator indicativo de necessidade de US cervical, para rastreamento de nódulos. Comparando custos para o sistema de saúde, os autores concluíram que este tipo de rastreamento de nódulos pode ser de interesse econômico, poupando exames desnecessários em indivíduos que não necessitariam, além de não deixar que outros indivíduos que jamais seriam diagnosticados fiquem sem diagnóstico (47). Ainda no ano de 2014, outro grupo de autores chineses demonstrou que altos IMCs estavam associados a fatores de agressividade dos tumores, como comprometimento de linfonodos ($p= 0,004$),

invasão linfática ($p= 0,003$) e aparecimento de mais de um tumor (tumores multinodulares) ($p= 0,008$) em pacientes acima de 45 anos de idade (48).

Outros autores têm publicado mais recentemente dados que reforçam a relação entre obesidade e CDT, e alguns destes estudos têm se concentrado em sugerir e compreender as possíveis ligações para esta associação, tais como diabetes e/ou resistência à insulina (49-51), perfil de citocinas (52-54), dieta (55), fatores antropométricos (56) e até mesmo variantes genéticas que poderiam modificar a suscetibilidade aos cânceres de tireoide (57).

1.2 – MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ASSOCIAÇÃO ENTRE A OBESIDADE E CDT

Durante muitos anos, o tecido adiposo foi considerado como um mero depósito de gordura no organismo. Hoje, o tecido adiposo é entendido como uma glândula dinâmica, e a diversidade de moléculas produzidas pelos adipócitos inclui proteínas envolvidas no metabolismo lipídico, na sensibilidade à insulina, no sistema complemento, na hemostasia vascular, na regulação da pressão arterial, na angiogênese, na regulação do balanço energético, assim como na inflamação (58). O tecido adiposo pode ser considerado como um componente do sistema imune, uma vez que expressa receptores de muitas moléculas do sistema imunológico, além de produzir moléculas imunes que podem ser liberadas para a circulação (59, 60). Essas moléculas podem proporcionar condições favoráveis que

dariam suporte a um microambiente imune pró-tumor, o que sugere que a inflamação ligada a obesidade pode ser um dos elos de ligação entre obesidade e câncer.

1.2.1 - Inflamação

Além de adipócitos, o tecido adiposo contém células que são produtoras ativas de moléculas que podem influenciar a resposta imune. Com o objetivo de caracterizar as alterações que ocorrem no tecido adiposo com o aumento da adiposidade, Weisberg et al buscaram traçar um perfil de expressão dos transcritos do tecido adiposo de vários grupos de ratos. Eles descobriram que a expressão de 1304 transcritos se correlacionava significativamente com o IMC e muitos destes transcritos eram característicos de macrófagos. Estes resultados foram confirmados por análises imunoistoquímicas do tecido adiposo, que mostraram que a porcentagem de células que expressavam marcadores de macrófagos era significativamente e positivamente correlacionada tanto com o tamanho dos adipócitos quanto com o IMC, sugerindo uma associação entre a infiltração de macrófagos e a obesidade (61).

Tem sido proposto, ainda, que os linfócitos T pró-inflamatórios estão presentes no tecido adiposo visceral e podem contribuir para a ativação de células inflamatórias locais, antes do aparecimento de macrófagos, sugerindo que estas células podem desempenhar um papel importante na iniciação e perpetuação da inflamação do tecido adiposo (62). Ambos os macrófagos M1 e M2 podem ser

encontrados no tecido adiposo. M1 são macrófagos estimulados por IFN- γ ou lipopolissacarídeos e são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, os macrófagos M2 estão relacionados com a resposta imune humoral e são capazes de produzir citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 (63). Nestas condições, a hipóxia local existente na obesidade pode promover a mudança de M2 para M1 (64). Curiosamente, estes macrófagos são responsáveis por quase toda a expressão de TNF-alfa e de quantidades significativas de iNOS e IL-6 nos tecidos adiposos (61).

O TNF-alfa é uma citocina que medeia a citotoxicidade de tumor, além de um potente indutor de crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) (65). Liu et al demonstraram que a obesidade induzida por dieta produz uma elevação de TNF-alfa no cólon e instiga diversas alterações de componentes importantes da via de sinalização Wnt, que têm uma natureza pró-transformação, sugerindo que a via de Wnt seria o mecanismo pelo qual a obesidade aumenta o risco de câncer colorretal (66). O TNF-alfa tem uma ação anti-proliferativa em uma linhagem celular humana de CPT, através de um mecanismo mediado por receptores (67), e a exposição das linhagens celulares de CPT ao TNF-alfa resultou num aumento da perda da atividade anti-proliferação induzida por TNF-alfa, denominada resistência (68). Provavelmente, a elevada exposição ao TNF-alfa fornecida pela obesidade induz a uma resistência a esta molécula, o que facilitaria a progressão dos tumores da tireoide.

IL-6 é uma citocina pleiotrópica. Ela interfere no crescimento e diferenciação e alguns dados sugerem que a IL-6 pode aumentar o risco de certos tipos de

canceres, como os de mama, do fígado, da próstata, do cólon, e do esôfago (69). No entanto, o papel da IL-6 no CDT ainda é controverso. Usando linhagens celulares humanas derivadas de câncer de tireoide, Couto et al determinaram que a sinalização de IL-6/gp130/JAK é responsável pela ativação de STAT3. A deficiência de STAT3 levou a formação de tumores maiores e com mais capacidade proliferativa, o que sugere que, ao menos nos canceres de tireoide, a STAT3 é paradoxalmente um regulador negativo do crescimento do tumor (70). Uma linhagem celular de carcinoma tireoidiano anaplasico secreta níveis elevados de IL-6 (71). Apesar de ainda serem poucos os estudos que ligam IL-6 diretamente com o CDT, IL-6 pode ser importante para o microambiente inflamatório na carcinogênese do CDT, e este microambiente já tem sido comprovado como fator que influencia o desenvolvimento e progressão do CDT (72, 73).

Nosso grupo demonstrou que a probabilidade de pacientes com câncer diferenciado de tireoide e com história de autoimunidade tireoidiana prévia ou autoanticorpos antitireoidianos ter um pior prognóstico é significativamente menor do que pacientes sem evidência de autoimunidade prévia, sugerindo que a atividade autoimune contra a glândula tireoide pode exercer um papel de proteção em pacientes com câncer diferenciado de tireoide (74). A associação entre Tireoidite Linfocítica Crônica/linfócitos/macrófagos e câncer diferenciado de tireoide permanece controversa e a presença de TLC nos câncer diferenciado de tireoide é reportada em uma ampla frequência, variando de 0,5% a 38% (75-79). Alguns investigadores mostram que a presença de TLC ou ainda linfócitos infiltrantes de tumores quando associada ao câncer diferenciado de tireoide imprime a esses

pacientes um melhor prognóstico e menor agressividade da doença no momento de sua apresentação (80-83). Nosso grupo recentemente estudou o perfil de infiltração de células do sistema imunológico de pacientes com câncer diferenciado de tireoide e de pacientes com lesões benignas da tireoide, demonstrando que os nódulos tireoidianos malignos não apenas tinham maior tendência a exibirem diversos tipos de moléculas do sistema imune, como também a evolução dos tumores podia estar associada ao perfil de moléculas que esses tumores expressavam (84, 85). A infiltração de macrófagos foi mais frequente entre as mulheres e foi associada à sobrevida livre de recidiva. A infiltração de linfócitos T citotóxicos se mostrou um possível marcador de melhor prognóstico. Entretanto, a análise multivariada falhou em mostrar estas duas células como marcadores independentes do prognóstico destes pacientes (84).

Desta forma, temos dois fatores amplamente reportados como sendo relacionados ao CDT (obesidade e inflamação), sendo que ambos possuem uma relação muito íntima entre si, uma vez que as moléculas de ambos podem ser as mesmas, como é o caso das adipocinas, que nada mais são do que citocinas relacionadas à inflamação (dentre outras funções) que são encontradas em níveis diferenciados em indivíduos obesos. Estas adipocinas e também outras citocinas são produzidas no tecido adiposo.

O tecido adiposo, além de contribuir para o armazenamento de energia, regulação hormonal dos sistemas homeostáticos, termogênese e proteção de impacto contra as vísceras, tem uma importante função endócrina, já que secreta uma variedade de proteínas sintetizadas e liberadas pelos adipócitos (Figura 2).

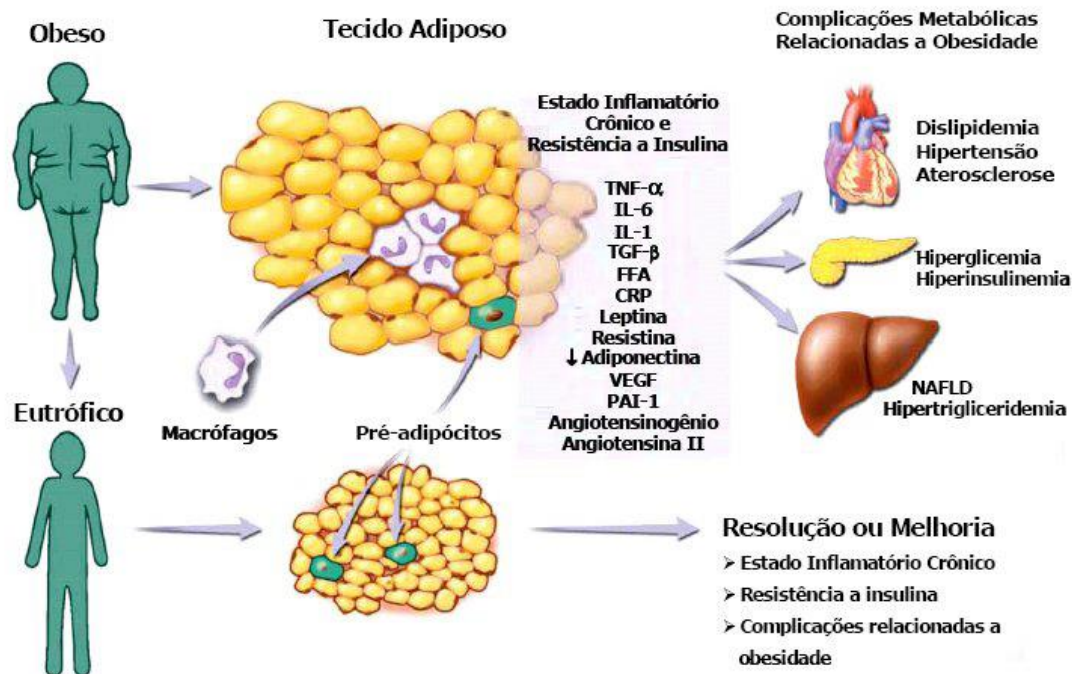


Figura 2: Alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas da obesidade.

Presentes no tecido adiposo de indivíduos obesos, macrófagos, células endoteliais e em menor grau, os adipócitos e outros componentes celulares produzem vários marcadores inflamatórios circulantes entre eles fatores pró e anti-inflamatórios, citocinas, fatores de crescimento e proteases que induzem um estado inflamatório crônico e resistência à insulina. Estas alterações vistas em indivíduos com aumentado IMC têm um efeito sistêmico que incluem complicações metabólicas graves e aumentado risco cardiovascular. Fonte: Santos, 2007 (86).

Estas adipocinas têm diferentes funções, como: regulação de apetite e balanço energético, imunidade, sensibilidade à insulina, angiogênese, inflamação e

resposta de fase aguda, pressão sanguínea e metabolismo de lipídeos (87). Atualmente são muitas as pesquisas envolvendo adipocinas como leptina, adiponectina e resistina, considerando que essas adipocinas possuem relação direta com o tecido adiposo e estão diretamente envolvidas em alterações na resposta imunológica e na resistência insulínica, que podem ser fatores de risco para diversas doenças associadas à obesidade, como o diabetes. Além disso, outra proteína que não é secretada por adipócitos, porém é bastante importante a obesidade, a grelina, tem sido demonstrada como importante na progressão de alguns cânceres.

1.2.2 - Adipocinas

O nosso organismo produz citocinas a fim de responder às características agressivas ou não-próprias a que somos submetidos. Estas moléculas podem influenciar a ativação, crescimento e diferenciação de várias células-alvo diferentes. Adipocinas ou adipocitocinas são os nomes dados ao subconjunto de citocinas produzidas pelo tecido adiposo (73). Elas não estão apenas envolvidas na resposta imune, mas também na regulação do apetite e do balanço energético, na sensibilidade à insulina, na angiogênese, e na regulação da pressão arterial e do metabolismo lipídico (88). A obesidade, por si só, já está relacionada com um estado inflamatório, mas a presença de resistência à insulina pode aumentar esta inflamação, diminuindo a produção de moléculas anti-inflamatórias, tais como a adiponectina, e produzindo adipocinas pró-inflamatórias, tais como leptina e resistina, o que conduz à estimulação ou bloqueio de várias outras moléculas

imunológicas, promovendo, assim, um ambiente ótimo para o crescimento e desenvolvimento tumoral (64). Seguiremos com uma descrição das principais adipocinas incluídas neste estudo. Para fins didáticos, a Grelina foi também agrupada às adipocinas.

Adiponectina

A adiponectina é uma adipocina com potentes propriedades anti-inflamatórias. É produzida exclusivamente pelos adipócitos; e fatores pró-inflamatórios como TNF-alfa, IL-6 e ROS podem exercer um papel regulador em sua expressão (89). Essa adipocina é capaz de melhorar a sensibilidade à insulina, influenciar a proliferação de células, e regular o equilíbrio das moléculas e células com atividades anti-pró-inflamatórias, como: TNF-alfa, IL-10, macrófagos, células T, células NK, visando sempre controlar a inflamação (90-92). Para desenvolver estas funções, a adiponectina se liga a dois receptores diferentes: AdipoR1 e AdipoR2. Estes receptores têm um papel importante na melhoria da sinalização da insulina nas células alvo, através do aumento da atividade da AMPK e PPAR α e PGC- α , também, indiretamente, levando a um reflexo nas vias AKT/mTOR/PI3K e MAPK (Figura 3), já bem conhecidas pela regulação que exercem no processo de proliferação celular (93). Além disso, durante este processo, a adiponectina também influencia o sistema imunológico através da regulação de NF-kB (94). Devido às suas complexas funções anti-proliferativas e de contenção de inflamação, tem-se sugerido que a adiponectina teria propriedades anti-neoplásicas em alguns tipos de cânceres. Nos últimos anos, diversos autores têm demonstrado a associação da

adiponectina com cânceres de: mama, endométrio, próstata, colorretal, fígado, pâncreas e cânceres gástricos, bem como com alguns tipos de cânceres hematológicos, como a leucemia, o linfoma e o mieloma (94). Em 2011, Mitsiades et al demonstraram que as concentrações séricas de adiponectina estavam inversamente correlacionadas com o CDT, sugerindo que esta adipocina exerceria um efeito protetor contra o desenvolvimento desse tipo de câncer. Além disso, os autores demonstraram que tecidos da tireoide expressam AdipoR1 e 2, facilitando a entrada e o funcionamento de adiponectina na tireoide (95), o que sugere que não apenas a adiponectina é expressa em células da tireoide, mas também é funcional nelas. Cheng et al, num outro estudo recente, demonstraram que os receptores de adiponectina podem ser importantes para o CDT. Comparando-se os tecidos de CPTs primários com tecidos metastáticos, os autores relataram que 27% dos tumores primários expressavam AdipoR1 e 47% expressavam AdipoR2. Quando os tecidos eram negativos para ambos os receptores, os tumores estavam significativamente associados com características de agressividade tumoral, como: invasão extra-tireoidiana, multicentricidade, e estádios TNM mais avançados, sugerindo que a expressão de receptores de adiponectina está associada a um prognóstico melhor para os pacientes (53).

A literatura relata, ainda, que pacientes com obesidade e excesso de peso possuem polimorfismos nos genes da adiponectina e de seus receptores que podem modular essa expressão (96-98). Dessa forma, são necessários mais estudos que nos permitam compreender melhor essa existência da adiponectina nos CDT e possíveis formas de sua regulação.

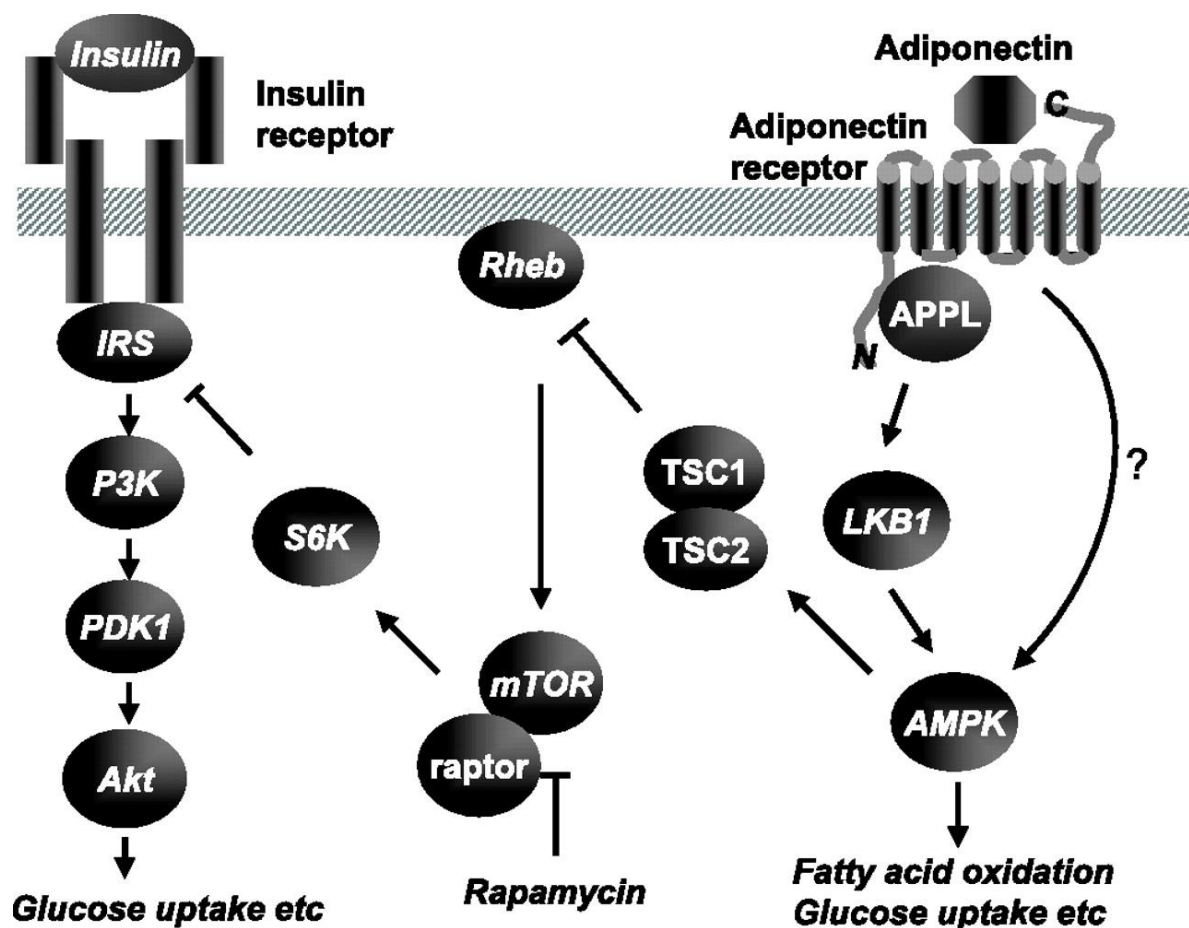


Figura 3. Representação das vias moleculares com as quais a adiponectina interage, destacando-se as vias de AKT, mTOR e AMPK, todas já bem conhecidas por terem influência na carcinogênese tireoidiana. Fonte: “Adiponectin sensitizes insulin signaling by reducing p70 S6 kinase-mediated serine phosphorylation of IRS-1”. Wang et al (99).

Grelina

A grelina é um hormônio gastrointestinal que foi primeiramente isolado da mucosa oxíntica do estômago. Ela é produzida, predominantemente, pelas células Gr do trato gastrointestinal, e também em menores quantidades no sistema nervoso central, rins, placenta e coração (100-102). A grelina é um potente estimulador da liberação de GH nas células somatotróficas da hipófise e do hipotálamo. Além disso, ela possui outras importantes atividades, incluindo a estimulação da secreção lactotrófica e corticotrófica, o controle do gasto energético; o controle da secreção ácida e da motilidade gástrica, a influência sobre a função endócrina pancreática e o metabolismo da glicose e ainda ações cardiovasculares e efeitos anti-proliferativos em células neoplásicas (Figura 4) (100, 103-107). Dentre as ações periféricas deste hormônio, destacam-se a estimulação da secreção ácida e o esvaziamento gástrico em humanos (107).

Os efeitos anti-proliferativos da grelina permitem extrapolar que essa substância pode exercer ações anti-neoplásicas, uma vez que receptores específicos para GHS têm sido encontrados em tecidos tumorais de órgãos que não têm a expressão desses receptores em condições fisiológicas normais (108). A grelina não-acilada, que é a forma que circula em maiores quantidades que a acilada, não é a forma que a literatura aponta como a forma ativa. Porém, esta forma não-acilada, não é biologicamente inativa e cabe à mesma o desempenho de algumas ações não endócrinas, incluindo o efeito cardioprotetor e as atividades anti-proliferativas, por intermédio de sua ligação a diferentes subtipos de receptores GHS (os chamados GHSR) (109).

Na última década, a literatura tem mostrado a associação da grelina com alguns tipos de câncer, como: endometrial, pulmão, colorretal, gástrico, próstata, mama, ovário, renal, testicular e adrenocortical (110-112). Um estudo de 2014 demonstrou que polimorfismos no gene da grelina (GHRL) e no gene que codifica seu receptor (GHSR) podem reduzir ou aumentar o risco de câncer, dependendo do alelo herdado. Neste estudo, Pabalan et al realizaram uma meta-análise de seis estudos, compreendendo um total de 8.430 casos e 14.008 controles, de estudos casos-controle relacionados a cânceres: de mama, esôfago, colorretal e linfoma não-Hodgkin. Dois dos polimorfismos analisados no gene GHRL conferiram proteção em relação ao desenvolvimento de câncer, já um terceiro polimorfismo em GHRL e um polimorfismo em GHSR aumentaram o risco de desenvolvimento de câncer de mama (113). Há ainda estudos relacionando polimorfismos nos genes da grelina e de seu receptor com maior risco para o excesso de peso e para diabetes (114-120), porém, até o presente momento, não há dados relacionados às concentrações séricas da grelina e/ou polimorfismos relacionados a ela e seu receptor com os CDTs.

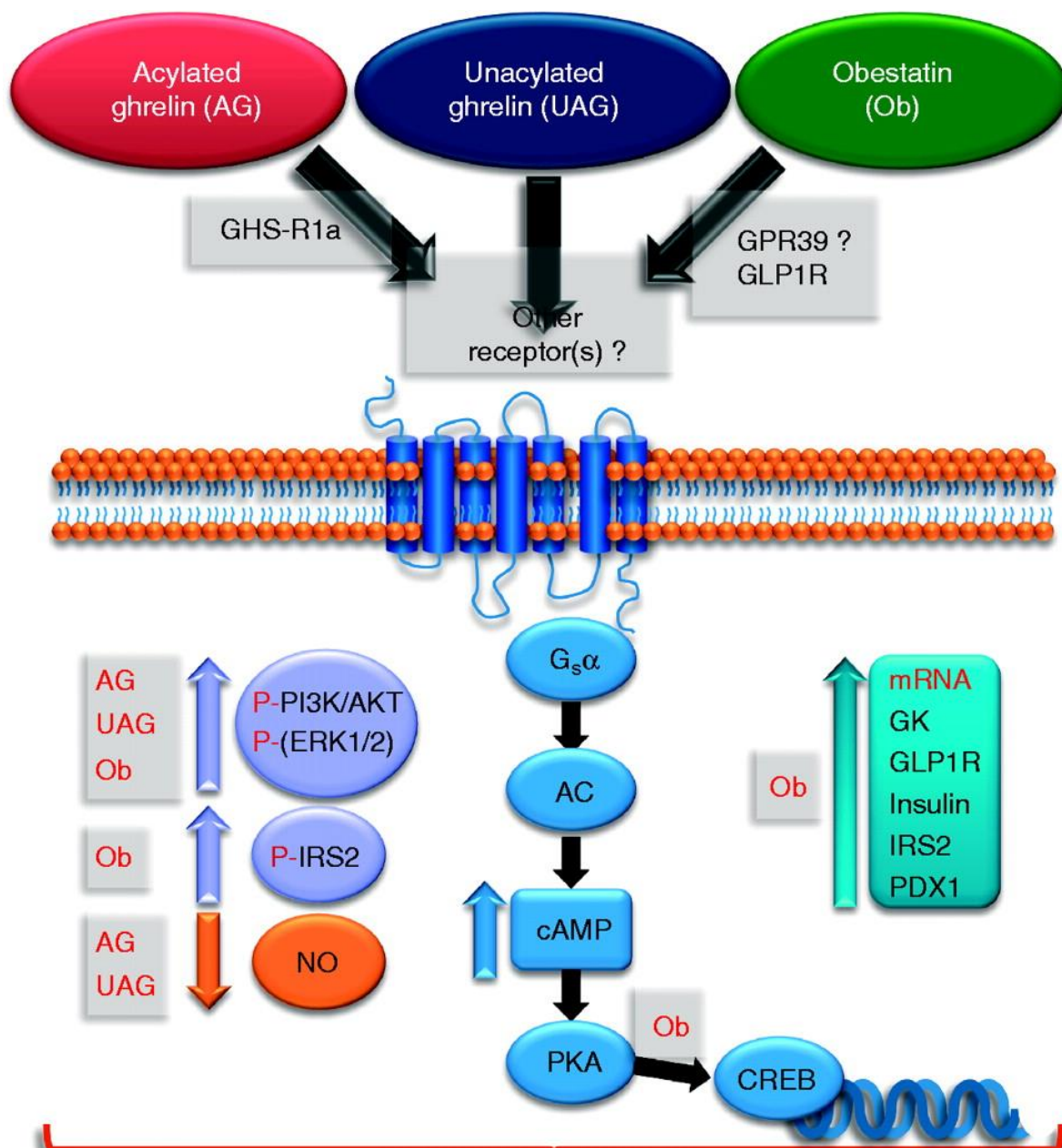


Figura 4. Principais vias moleculares com as quais a grelina interage e sobre as quais pode exercer seus efeitos, destacando-se as vias de PI3K/AKT e ERK, que são muito conhecidas por seus efeitos na carcinogênese tireoidiana. Fonte: “Unraveling the role of the ghrelin gene peptides in the endocrine pancreas”. Granata et al (121).

Leptina

A leptina é outra adipocina predominantemente secretada pelo tecido adiposo, embora também possa ser produzida pelo músculo esquelético, pelo estômago e no plasma (122). A leptina é estruturalmente semelhante a outras citocinas, como IL-2, IL-6, e o fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), uma característica que faz com que a leptina seja capaz de participar de processos celulares e orgânicos semelhantes, como o controle da ingestão de alimentos através da sensação de saciedade; a regulação do gasto de energia; a ativação de monócitos e macrófagos; a estimulação de VEGF e, portanto, da angiogênese; a proliferação celular; e a supressão de citocinas anti-inflamatórias (88). A indução de respostas de leptina e seus efeitos envolve a sua ligação ao receptor b de leptina (ObR ou LEPR), levando à ativação de sinais intracelulares através JAK2, STAT3 e AMPK (88). Estas moléculas, então, regulam várias vias de importância crucial para os cânceres, como a via AKT/mTOR/PI3K e ERK/MAPK, envolvidas no crescimento e sobrevivência celular; COX2, IL-1 e NF- κ B, relacionados com a inflamação; e VEGFs, envolvidos na angiogênese (Figura 5) (123). Assim, a leptina interage com diversos fatores que participam de diversas etapas da carcinogênese, e sua relação com os cânceres de mama, próstata, colorretal, hepatocelular, pâncreas e pulmão, bem como com o CDT, tem consistentemente sido demonstrada pela literatura (124, 125). Quanto aos cânceres de tireoide, e mais especificamente o CDT, a expressão de leptina e de LEPR nesses tumores foi demonstrada pela primeira vez por Cheng et al, que encontraram-nos associados a um alto risco de metástases linfáticas (126). Outros grupos relataram ainda o envolvimento da leptina na apresentação

clínica dos CDTs, e tem sido sugerido que a leptina pode afetar a migração das células da tireoide, colaborando para a configuração de um prognóstico pior e desenvolvimento de metástases (52, 55, 127-129). Recentemente, Rehem et al mostraram que as concentrações séricas de leptina eram mais altas em pacientes com CDT quando comparadas a indivíduos controles e que, pós cirurgia para remoção do tumor, esses pacientes apresentavam uma queda bastante considerada nas concentrações de leptina, chegando a ficar com menos leptina disponível do que os indivíduos controle (130). Os mecanismos pelos quais essas concentrações de leptina se alteram nos pacientes com CDT ainda não são conhecidos.

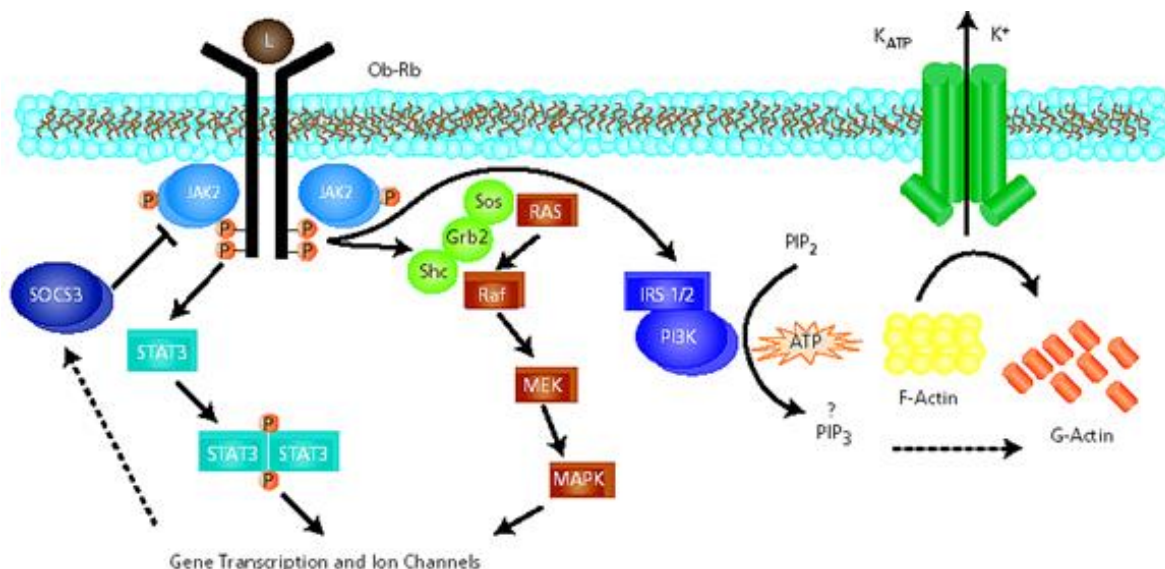


Figura 5. Representação esquemática mostrando com quais vias celulares/moleculares a leptina interage e exerce atividades, com destaque para RAS, RAF, STAT3, PI3K e MAPK, todos conhecidos por seus importantes efeitos nas células tireoidianas, especialmente naquelas em que estão passando por transformação neoplásica. Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/obesity-research/learning-center/effects-of-peptides.html>. Acesso em: 09/01/2015.

Resistina

A resistina é um adipocina produzida por monócitos e macrófagos humanos, bem como por adipócitos (88). Ela possui este nome por ter sido, primeiramente, relacionada à resistência à insulina através da supressão da sinalização mediada por insulina em adipócitos de ratos (131), mas em humanos essa associação nem sempre é verdadeira. Na verdade, em seres humanos, a resistina apresenta

diversas funções em eventos anti-apoptóticos, pró-inflamatórios, pró-angiogênicos e proliferativos (122, 132). As citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF-alfa, e LPS podem induzir a expressão de resistina, mas, inversamente, a resistina estimula a produção de IL-6 e TNF-alfa através da via de sinalização de NF-kB (Figura 6) (133). Além de sua ação sobre as moléculas do sistema imunológico, a resistina também pode ligar-se a RST4, ativando JNK e p38 MAPK, para induzir resistência insulínica (134). Devido à sua capacidade de regular a produção de moléculas do sistema imunológico e de sua regulação indireta sobre a via da MAPK e outros eventos de proliferação, a resistina tem sido investigada em vários cânceres humanos. Sua expressão tem sido associada ao aumento da proliferação do câncer da próstata por estimulação da via AKT/mTOR (135). A resistina também tem sido associada a câncer de mama, do endométrio, colorretal, carcinoma hepatocelular, pancreático e do pulmão (132, 136-140).

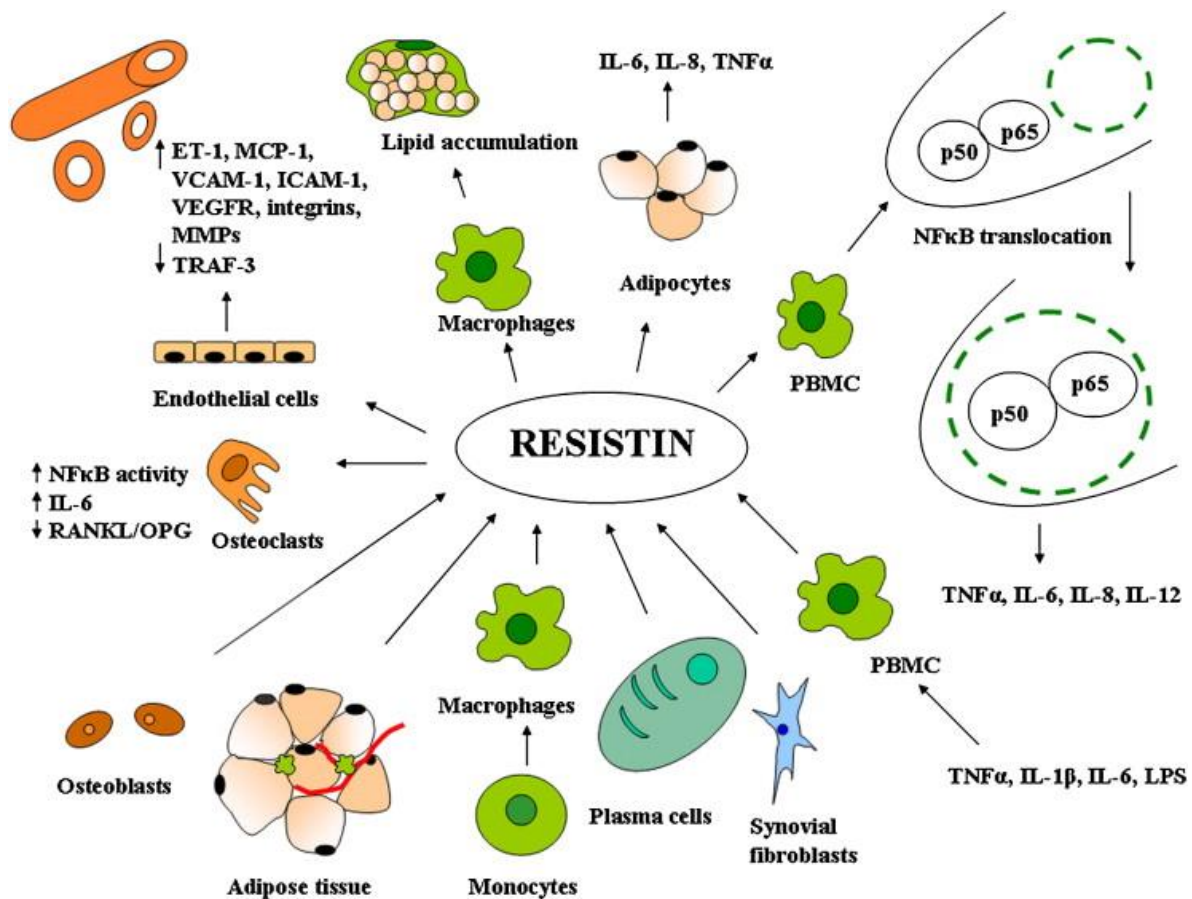


Figura 6. Esquema demonstrando as mais diversas células e moléculas sobre as quais a resistina atua, exercendo suas funções. Destacamos aqui as moléculas do sistema imune, as quais exercem regulação sobre a resistina, mas que também são reguladas por ela. Fonte: “The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies”, Filkova et al (141).

2 - OBJETIVOS

Neste trabalho objetivamos verificar os perfis antropométrico e molecular (das adipocinas: adiponectina, leptina, resistina e grelina) de pacientes com diferentes nódulos tireoidianos e compará-los aos mesmos perfis de indivíduos saudáveis, buscando responder às perguntas:

- 1) Existe correlação entre o excesso de peso (sobrepeso e obesidade) e o risco para o CDT?
- 2) A correlação excesso de peso-CDT influencia alguma característica clinicopatológica dos pacientes?
- 3) A correlação excesso de peso-CDT poderia ser explicada por algum fator nutricional?
- 4) Os pacientes com CDT (obesos e não obesos) possuem concentrações séricas de adiponectina, leptina, resistina e grelina significativamente diferentes de indivíduos com nódulos benignos e controles? Essas concentrações séricas podem ser usadas como marcadores diagnósticos de nódulos tireoidianos malignos e benignos?
- 5) As concentrações séricas das adipocinas se correlacionam com dados anatomopatológicos, clínicos e de evolução dos pacientes com CDT?

- 6) As diferenças nas concentrações das adipocinas estão relacionadas à herança de polimorfismos nos genes que codificam as adipocinas (ADIPOQ, LEP, RETN, GHRL) e também em seus receptores (ADIPOR1, ADIPOR2, LEPR, GHSR)?
- 7) O perfil genético das adipocinas e de seus receptores aumenta o risco do CDT?
- 8) Os genótipos obtidos se correlacionam aos dados anatomopatológicos, clínicos e de evolução dos pacientes com CDT?
- 9) A expressão das adipocinas existe também nos tecidos dos tumores tireoidianos e é produzida por eles?

3 – CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular do Câncer (GEMOCA) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e no Laboratório de Investigação em Metabolismo e Diabetes (Limed) da UNICAMP, com a colaboração do Ambulatório de Câncer de Tireoide do HC/UNICAMP, do Serviço de Medicina Nuclear do Hospital da Clinicas (HC-UNICAMP), do Hemocentro - UNICAMP e do Hospital de Câncer de Barretos (HCB). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética das duas instituições envolvidas: UNICAMP (705/2008) e Hospital de Câncer de Barretos (233/2009).

3.1 - CASUÍSTICA

A população estudada foi composta por 200 casos de CDT, 100 de nódulos benignos e 160 controles. É importante frisar que não foi possível obter material completo de todos os pacientes e, por isso, em algumas sessões desta tese será encontrada uma variação dos N apresentados nesta descrição geral.

Para seleção destes grupos, foram considerados fatores de inclusão:

- Para os casos recém-diagnosticados: possuir nódulo tireoidiano que posteriormente terá anatomopatológico (este dado foi adquirido pós-cirurgia, no prontuário)

- Para os casos vindos do Serviço de Medicina Nuclear: possuir histórico de nódulo tireoidiano com evidências de doença ativa à época da coleta (Tiroglobulina elevada acima de 2mg/ml, indicação de Radioiodoterapia (RIT).

Todos os pacientes seguiram protocolo padrão, já estabelecido nas instituições participantes: em todos os pacientes foi realizada a tireoidectomia total ou subtotal, com ou sem ressecção dos linfonodos cervicais regionais (de acordo com exame físico e ultrasonografias realizados no pré-operatório ou se linfonodos são visualizados no intra-operatório). Após 6 a 8 semanas da cirurgia foi realizada uma pesquisa de corpo inteiro (PCI), para a detecção de restos tireoidianos locais e/ou metástases regionais ou à distância. Cerca de 3 a 8 semanas após a PCI, todos os pacientes recebem uma dose mínima ablativa de radioiodo (RIT) de 100 mCi quando apresentam apenas restos locais. Em seguida, foi iniciada a reposição hormonal com levotiroxina em doses suficientes para a supressão do TSH até concentrações indetectáveis (inferiores a 0,01 mU/l). Caso a Tg apresente elevação da concentração sérica, procede-se uma investigação para a detecção de possíveis recidivas locais ou metástases linfonodais ou à distância, com exame físico, USG e/ou nova PCI. Se a PCI for positiva e/ou, se a tireoglobulina se elevar acima de 5 ng/ml, o paciente é diretamente encaminhado para nova dose terapêutica de radioiodo. Já se a PCI for negativa e a tireoglobulina não se elevar acima de 2 ng/l, os pacientes apenas são seguidos com a realização de exames de sangue de rotina a cada 4 meses e, após 3 anos, a cada 6 meses. No caso de a PCI ter resultado negativo, apesar da elevação da Tg nos valores entre 2 e 5, procede-se também uma investigação para descartar possíveis recidivas locais ou metástases.

De acordo com os resultados, pode-se apenas seguir o paciente e reavaliá-lo após 6-12 meses ou encaminhá-lo à RIT.

O grupo controle contemplou indivíduos sem histórico de câncer e nódulos de tireoide, pareados para sexo, idade, etnia e IMC com o grupo alvo da pesquisa (pacientes com CDT), selecionados da região de Campinas. Foi obtido um histórico pessoal deste grupo, incluindo: fatores demográficos, étnicos, estilo de vida, hábitos alimentares, tabagismo, condições gerais de saúde, histórico de doenças e fatores nutricionais. O pareamento com o grupo de pacientes estudados admitiu pequenas variações: em relação a idade foi admitida uma variação de até 2 anos para mais ou menos em relação ao caso estudado, o IMC tinha que estar na mesma faixa, porém, variações dentro de cada faixa eram aceitas. Os indivíduos controles tiveram sangue coletado a fim de analisar as concentrações séricas das adipocinas e também as genotipagens dos genes que codificam as adipocinas e também seus receptores.

É importante frisar que foram selecionados pacientes com nódulos benignos e CDT de todas as faixas de IMC, que passaram por coletas de sangue, medições antropométricas, e que foram submetidos a entrevista similar à realizada com os indivíduos controle no que dizia respeito a seus hábitos alimentares, qualidade de vida e hábitos de rotina. Além disso, desses pacientes também foi obtido material tireoidiano, para que pudessemos realizar os estudos do perfil genético dos mesmos.

3.1.1 - Obtenção de dados antropométricos e clínico-patológicos da casuística

A obtenção de medidas antropométricas compreendeu os seguintes passos:

a) mensuração de peso: realizada através de uma balança calibrada com divisão de 100g, com os indivíduos vestindo roupas leves e sem sapatos; b) determinação da altura: obtida utilizando estadiômetro conectado à balança com divisão de 1 mm. O indivíduo devia estar sem sapatos, de costas para o estadiômetro. O Índice de Massa Corpórea (IMC) - divisão do peso corporal em quilogramas pelo quadrado da altura em metros (Kg/m^2) – tem sido utilizado para definir clinicamente a obesidade (142) e foi calculado pela divisão do peso, em quilos, pela altura, em metros, ao quadrado. A Organização Mundial da Saúde (143), bem como o *National Institute of Health* (NIH), classificam indivíduos com o IMC entre 18,5-24 Kg/m^2 como Eutróficos, IMC entre 25-29,9 Kg/m^2 como Sobrepeso e aqueles com o IMC maior que 30 Kg/m^2 como Obesos (144). Todos os pacientes possuem pastas de registro nos arquivos dos hospitais e ambulatorios, onde pudemos encontrar os dados patológicos e clínicos de evolução para atualizar os dados.

3.2 - ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Para o estudo das proteínas Adiponectina, Leptina, Resistina e Grelina utilizamos a técnica de ELISA, que se baseia na interação anticorpo-antígeno. Esta interação produz uma fluorescência na presença de um substrato, fazendo com que seja possível que a leitora capte a quantidade de coloração emitida e, assim, consiga “quantificar” a proteína desejada.

As dosagens das adipocinas estudadas foram realizadas no Laboratório Lined no Gastrocentro da UNICAMP, sob coordenação do Prof Dr Bruno Geloneze, que já possui vasta experiência nesta técnica. A concentração plasmática das adipocinas foi determinada através do método ELISA colorimétrico, seguindo as especificações correspondentes aos Kits (R&D System). Todos os reagentes necessários para a realização das dosagens foram deixados em temperatura ambiente antes de usá-los.

3.2.1 - Protocolo Geral ELISA

O protocolo geral ELISA foi muito similar ao utilizado para todas as proteínas: Foi adicionado 100µL das amostras ou padrões no reagente diluente, ou diluente apropriado, por poço, cobrindo com filme e encubando por 2 horas em temperatura ambiente. Após essa etapa a placa foi aspirada e lavada novamente. No próximo passo foi adicionado 100µL de solução substrato em cada poço, encubando a placa por 20 minutos em temperatura ambiente protegida da luz. Posteriormente, adicionou 50µL de solução stop em cada poço e movimentou levemente a placa para garantir a mistura dos reagentes. Foi determinada a densidade ótica de cada poço imediatamente usando o leitor da microplaca.

3.3 - ESTUDO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DAS ADIPOCINAS E SEUS RECEPTORES: *TAQMAN SNP GENOTYPING*

Utilizamos o TaqMan SNP Genotyping (7500 Real Time PCR Systems). Tal técnica tem como base a estabilidade térmica do DNA de dupla fita. Em condições de alta estringência, essa estabilidade é suficiente para distinguir entre pares de sonda – DNA-alvo perfeitos e imperfeitos. A hibridização só acontece se ocorrer pareamento perfeito entre sonda e DNA-alvo. Assim, podem ser construídas sondas específicas para cada alelo (as sondas utilizadas nesta tese estão no quadro abaixo). O ensaio para genotipagem de TaqMan® SNP Genotyping (Applied Biosystems, CA), constitui uma combinação da hibridização e da atividade exonucleásica 5' da DNA polimerase, acoplada à detecção de fluorescência. Para a realização dessa técnica é necessária a extração de DNA do tecido a ser verificado para posterior amplificação deste DNA pela técnica de Taqman SNP Genotyping, mais detalhadas a seguir.

Os polimorfismos escolhidos para este estudo tratavam-se de Polimorfismo de nucleotídeo único ou polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP), que já tinham descrição na literatura de associação com ao menos dois dos fatores (que são fatores potencialmente associados ao CDT): obesidade, IMC, resistência insulínica, inflamação, doenças inflamatórias, doenças autoimunes, câncer. Os SNPS escolhidos seguindo esta descrição estão listados no quadro abaixo, o qual contém as informações do gene-alvo, o número RS do SNP e o número do assay comercial Taqman utilizado para o estudo dos genótipos.

Quadro 1. Genes incluídos no estudo, SNPs selecionados e especificação do assay utilizado para a genotipagem dos SNPs.

Genes	Nº RS	Nº Assay TaqMan
Receptor de Leptina (<i>LEPR</i>)		
	1137101	C_8722581_10
	1137100	C_518168_20
	8179183	C_8722378_10
Leptina (<i>LEP</i>)		
	7799039	C_1328079_10
	2167270	C_15966471_20
Grelina (<i>GHRL</i>)		
	27647	C_3151005_10
	26802	C_3151004_10
	696217	C_3151003_20
	4684677	C_25607748_10
	35683	C_931170_10
Receptor de Grelina (<i>GHSR</i>)		
	2232165	C_15857645_10
	2232169	C_15857624_10
	572169	C_1079489_20
Resistina (<i>RTN</i>)		
	1862513	C_1394112_10
	3745367	C_1394113_10
	3745369	C_11510413_30
Adiponectina (<i>ADIPOQ</i>)		
	3774262	C_27482668_10
	1063539	C_1486290_10
	12629945	C_8288583_10
	1501299	C_7497299_10
Receptor de Adiponectina 1 (<i>ADIPOR1</i>)		
	2232853	C_198957_10
	12733285	C_26186730_10
	1342387	C_37350_10
Receptor de Adiponectina 2 (<i>ADIPOR2</i>)		
	767870	C_2295608_10
	1058322	C_7561787_10
	1044471	C_7561799_10
	11061946	C_31556151_10

3.3.1 - Extração de DNA de leucócitos

A extração do DNA de sangue periférico foi iniciada pela lise de hemácias, utilizando tampão de lise de hemácias e posterior lise de leucócitos com respectivo tampão de lise de leucócitos e SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) seguindo-se incubação a 37°C durante 30 minutos. Seguiu-se a extração com protocolo de fenol-clorofórmio adaptado pelo nosso grupo há anos. Os produtos de extração obtidos pelos procedimentos de extração foram avaliados e quantificados com o auxílio de espectrofotometria.

3.3.2 Genotipagem dos SNPs selecionados por Taqman SNP Genotyping

Para a verificação da presença ou ausência dos polimorfismos, utilizou-se o TaqMan® SNP *Genotyping* (7500 *Real Time PCR Systems*). A *probe* e os *primers* foram adquiridos pela TaqMan® SNP *Genotyping* (Applied Biosystems, CA). O volume utilizado na solução foi de 25µl, contendo 20ng de DNA da amostra, 12,5µl de Taqman universal PCR *Master Mix* (concentração final 1X), 0,625µl do ensaio (sonda e *primers*) para a concentração de 40x (concentração final de 1x) e 8,875µl de água milli-Q. Os seguintes ciclos foram utilizados na PCR: a fase inicial de desnaturação foi de dez minutos à 95°C, seguida por 50 ciclos de 92°C por 15 segundos, 60°C por 90 segundos. O software utilizado para a análise foi “*Sequence Detection Software*”, versão 1.3 (Applied Biosystems, CA).

3.4 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNAm DAS ADIPOCINAS E SEUS RECEPTORES

Para que se faça a análise da expressão do RNAm, é necessária a extração do RNA do tecido de interesse, seguida de síntese de cDNA e, então, as PCR quantitativas (qPCR) a fim de determinar as quantidades de RNAm que estão sendo sintetizadas naquele tecido. Estes passos são melhor explicados a seguir.

As reações de qPCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems), que é constituído por um par de primers e uma sonda marcada com um fluoróforo. Desta maneira a expressão gênica é calculada através da quantidade de fluorescência emitida em cada reação. Os genes GAPDH e β -actina foram testados e o GAPDH foi selecionado o melhor controle endógeno da reação.

Para estudo dos genes e seus receptores, utilizamos os assays constantes no quadro 3, já inventoriados pela empresa Applied Biosystems.

Quadro 3. Genes e os assays comerciais utilizados para estudo do RNAm destes genes.

Genes	Nº Assay TaqMan expression
Receptor de Leptina	Hs00174497_m1
Leptina	Hs00174877_m1
Grelina	Hs01074053_m1
Receptor de Grelina Resistina	Hs00269780_s1 Hs00220767_m1
Adiponectina	Hs00605917_m1
Receptor de Adiponectina 1	Hs01114951_m1
Receptor de Adiponectina 2	Hs00226105_m1

3.4.1 – Extração de RNA de tecido tireoidiano

Foi feita extração de RNA total do tecido tireoidiano, segundo método do reagente Trizol (Invitrogen Corporation, CA, USA).

3.4.2 – Síntese do cDNA

O cDNA foi obtido através do kit SuperScript First-Strand – Synthesis System for RT-PCR, seguindo as orientações do fabricante, e sendo a concentração final do cDNA de 3,0 µg. Este cDNA foi diluído segundo a concentração necessária para a amplificação eficiente de cada gene, sendo esta eficiência verificada segundo método descrito abaixo.

3.4.3 – PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A sonda do *GAPDH* está marcada com o fluoróforo FAM, assim como os *primers* para os genes-alvo estão marcado com o fluoróforo FAM, sendo que no software utilizado marcamos no equipamento qual é o gene alvo e qual o controle.

Antes de se iniciarem os experimentos de quantificação relativa da expressão de qualquer gene, realizamos a validação do sistema gene alvo com os controles endógenos. As eficiências de amplificação dos genes devem estar próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o controle endógeno possa ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse.

Validação da eficiência dos genes de interesse

A validação consistiu na amplificação, tanto com os *primers* dos genes de interesse quanto com o do controle endógeno, dos cDNAs de triplicatas de concentrações diferentes (diluições seriadas) de um “pool” de tecidos tireoidianos.

Em seguida, foi construída uma curva padrão a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct [*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (*Threshold*), o qual é definido arbitrariamente]. Nessa curva, foram obtidos os valores da inclinação (*slope*) da curva e da confiabilidade das réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência do um sistema foi calculada através da fórmula: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Para a placa de validação do gene, foram feitas triplicatas de uma amostra de cDNA em 7 concentrações diferentes (diluições seriadas de 2x).

Após o cálculo das eficiências de amplificação de cada gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual tem por finalidade definir qual é a amplitude de concentrações para as quais o sistema é eficiente.

Quantificação relativa dos genes das adipocinas

Para a quantificação relativa dos genes em estudo, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata a partir de: 6,25µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 2x, 0,625µL da solução de *primers* e sonda, 1,625µL de água e 4,0µL de cDNA (na concentração adequada indicada pela validação), sendo que no controle negativo, foi adicionado 4,0 µl de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems, Foster

City, CA, USA). No programa InStat foram realizados os testes estatísticos *two-way* ANOVA com replicação (análise de variância) e Kruskal-Wallis para verificar se havia diferença significativa na expressão do gene de interesse.

3.5- Metodologia Estatística

A análise estatística foi realizada através do *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) ® software, versão 13.0.

Para a construção do gráfico de eficiência das PCRs quantitativas, foram utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias dos Cts dos controles endógenos e as médias dos Cts do gene de interesse para cada concentração no eixo Y. A seguir, obteve-se uma linha de tendência para estes valores, a qual possui uma equação de reta na qual é possível verificar o valor da inclinação desta reta. Para que um sistema seja considerado eficiente, o valor da inclinação deve ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno). Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estavam mais próximos à linha de tendência foram considerados validados (o sistema tem 100% de eficiência nestas concentrações).

A sobrevida livre de recorrência foi calculada utilizando-se curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, com análise de log-rank. Já a análise não paramétrica foi realizada utilizando o Teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado. Um

modelo de regressão logística multivariada foi aplicado usando as características clínicas e anatomopatológicas como variáveis dependentes e as variáveis estudadas relativas às adipocinas como variáveis explanatórias. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar medidas contínuas entre dois grupos cuja variável não apresentava distribuição normal; Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar três ou mais grupos cujas variáveis não apresentaram distribuição normal. Teste T ou teste ANOVA foram utilizados para variáveis que apresentavam distribuição normal, comparando dois ou três ou mais grupos, respectivamente.

4 - RESULTADOS

4.1 - EXCESSO DE PESO E CDT

Para verificar a relação do excesso de peso (sobrepeso e obesidade) com o CDT, estudamos 115 pacientes e 103 controles. As principais características referentes a estes grupos podem ser observadas na Tabela 1. Observamos que o excesso de peso foi mais frequente em pacientes com CDT (59,14%) do que no grupo controle (29,13%), aumentando consideravelmente o risco de CDT (OR = 3,787; IC95% = 1,115-6,814; $p < 0,0001$). Quando realizamos a análise estatística de acordo com o gênero, foi evidenciado que o aumento do risco de CDT associado ao excesso de peso foi significativo nas mulheres (OR = 1,925; IC95% = 1,110-3,338; $p = 0,0259$), mas não em homens ($p = 0,3498$).

Tabela 1. Características clínicas dos indivíduos incluídos neste estudo.

	CDT		CONTROLES		Valor
	N	%	N	%	de p
IMC					
Eutróficos	47	40,87	73	70,87	<0,0001
Sobrepeso	32	27,83	20	19,42	
Obesos	36	31,30	10	9,71	
Idade					
<45 anos	88	76,52	86	83,50	0,2003
≥45 anos	27	23,48	17	16,50	
Genero					
Masculino	24	20,87	31	69,90	0,1173
Feminino	91	79,13	72	30,10	
Etnia					
Branços	108	93,91	99	96,12	0,4581
Não-brancos	7	6,09	4	3,88	
Tabagismo					
Fumantes	46	40,00	37	35,92	0,5359
Nunca fumaram	69	60,00	66	64,08	
Etilismo					
Sim	15	13,04	32	31,07	0,0012
Não	100	86,96	71	68,93	
Atividade Física					
Sim	89	77,39	72	69,90	0,2091
Não	26	22,61	31	30,10	

4.2 - DIETA E CDT

Além do padrão alimentar clássico brasileiro, baseado principalmente no tradicional arroz e feijão, nossa população consumiu um padrão misto de alimentação, incluindo pelo menos 10 grupos de alimentos, dentre eles: carnes; aves e ovos; raízes tuberosas (principalmente batatas, mas também de inhame, batata-doce, beterraba); frutas; cocos; pães; produtos doces industrializados; bolos e biscoitos; bebidas doces (refrigerantes, sucos e outros); farinhas (trigo, mandioca e farinha de milho); óleos; manteiga e margarina (145). Os indivíduos com excesso de peso (sobrepeso e obesidade) consumiam carboidratos, proteínas e gorduras em excesso quando comparados a indivíduos eutróficos.

A Tabela 2 mostra o perfil da população estudada no que diz respeito a ingestão calórica. O consumo excessivo de calorias foi mais frequente em pacientes com CDT (70,43%) do que nos controles (25,24%). Os pacientes que consumiam uma quantidade excessiva de calorias apresentaram um risco quase seis vezes maior de desenvolver CDT (OR = 5,890; 95% CI = 3,124-11,103; $p < 0,0001$).

Tabela 2. Distribuição da ingestão calórica nos grupos de CDTs e controles, considerando suas necessidades individuais, de acordo com as recomendações da OMS. As comparações foram ajustadas para etilismo e IMC.

Ingestão calórica	CDT		Controles		Valor de p	OR	95%CI
	N	%	N	%			
Insuficiente(<90%)	1	0,87	15	14,56	0,0283 [#]	10,194	1,279-81,233
Adequada (90-110%)	33	28,7	62	60,19	<0,0001 [*]	5,890	3,124-11,103
Excessiva (>110%)	81	70,43	26	25,24	<0,0001 ⁺	60,038	7,460-483,182

*= **A x E** - Adequada *versus* Excessiva; += **E x I** - Excessiva *versus* Insuficiente; #=**A x I** - Adequada *versus* Insuficiente

A Tabela 3 resume o perfil alimentar de pacientes com CDT comparados com os indivíduos-controle. Identificamos que o consumo acima do recomendado pela OMS, tanto de proteínas quanto de carboidratos, esteve associado com a suscetibilidade ao CDT (OR = 4,601; IC95% = 1,634-12,954; p = 0,0039 e OR = 4,905; IC95% = 2,593-9,278; p <0,0001, respectivamente), enquanto o consumo de lipídios não pareceu ser um fator de risco para CDT (p = 0,8491). Não encontramos associação entre a ingestão de carboidratos refinados e mais complexos com o risco para CDT (p = 0,7223). A ingestão de fibras foi considerada inadequada em ambos os grupos estudados, e também não influenciou o risco de CDT (p = 0,5932), assim como a atividade física (p = 0,2531), que foi insuficiente em ambos os grupos: 74% dos casos e 72% dos controles afirmaram não praticar qualquer tipo de atividade física regularmente.

Tabela 3. Porcentagens da contribuição energética de macronutrientes da dieta, de acordo com as recomendações da OMS, em pacientes com CDT e em controles. As comparações foram ajustadas para etilismo e IMC.

Porcentagem da contribuição energética de macronutrientes	CDT		Controles		Valor de p	OR	95%CI
	N	%	N	%			
Carboidratos							
Adequada (<55%)	36	31,30	57	55,34	0,0783 [#]	2,632	0,896-7,731
Excessiva (55% - 75%)	74	64,35	25	24,27	<,0001 [*]	4,905	2,593-9,278
Insuficiente (>75%)	5	4,35	21	20,39	<,0001 ⁺	12,910	4,308-38,690
Lipídios							
Adequada (<15%)	76	66,09	63	61,17	0,0280[#]	3,885	1,158-13,028
Excessiva (15% - 30%)	35	30,43	29	28,16	0,8491 [*]	0,942	0,511-1,737
Insuficiente (>30%)	4	3,48	11	10,68	0,0440⁺	3,661	1,036-12,937
Proteínas							
Adequada (<10%)	87	75,65	83	80,58	0,0085[#]	4,733	1,487-15,067
Excessiva (10% - 15%)	24	20,87	5	4,85	0,0039[*]	4,601	1,634-12,954
Insuficiente (>15%)	4	3,48	15	14,56	<,0001 ⁺	21,777	4,887-97,044
Consumo de fibras							
Adequada (20 – 30g)	44	38,26	44	42,72	0,5932 [#]	1,164	0,667-2,028
Insuficiente (<20g)	71	61,74	59	57,28			

*= **A x E** - Adequado *versus* Excessivo; += **E x I** - Excessivo *versus* Insuficiente; #= **A x I** - Adequado *versus* Insuficiente

Estes resultados, referentes à relação do excesso de peso e obesidade com o CDT foram publicados no artigo: “Obesity and excess protein and carbohydrate consumption are risk factors for thyroid cancer”, no periódico Nutrition and Cancer (Fator de Impacto em 2013 = 2,635), em novembro de 2012 (146). A primeira página desta publicação pode ser encontrada nos anexos desta tese

4.3 - ANÁLISES SÉRICAS - ELISA

Foram analisadas as concentrações circulantes de adiponectina, leptina, resistina e grelina em 74 pacientes com câncer diferenciado da tireoide (CDT) (10 homens e 64 mulheres, 40.21 ± 13.24 anos de idade), sendo: 42 Carcinomas Papilíferos de forma Clássica (CPTC), 25 Carcinomas Papilíferos Variante folicular (CPTVF), 7 Carcinomas Foliculares (CFT) , cuidadosamente pareados com 55 pacientes com nódulos benignos (6 homens e 49 mulheres, 49.43 ± 14.55 anos de idade), sendo: 49 bócios e 6 Adenomas Foliculares (AF). As concentrações séricas de adiponectina, leptina, resistina e grelina distinguiram lesões benignas de nódulos malignos com 76%, 100%, 100% e 96% de acurácia, respectivamente; além de apresentarem outros excelentes parâmetros como teste diagnóstico, como alta especificidade, Valor Preditivo Positivo (VPP) e Valor Preditivo Negativo (VPN) (Tabela 4).

Tabela 4. Valores obtidos pelas curvas ROC da comparação entre malignos vs benignos

	Adiponectina	Leptina	Resistina	Grelina
Cutoff	3,27	7,24	7,21	114,33
Area sob a curva (AUC)	0,7622	1,000	1,000	0,950
Intervalo de Confiança 95%	0,525 a 0,713	0,968 a 1,000	0,967 a 1,000	0,893 a 0,982
P	0,0342	0,000	0,000	0,0001
Sensibilidade	89%	100%	100%	93%
Especificidade	53%	100%	100%	100%
VPP	76%	100%	100%	100%
VPN	73%	100%	100%	89%
Acurácia	76%	100%	100%	96%

As concentrações séricas de resistina foram maiores nos nódulos malignos do que nas lesões benignas ($p < 0.0001$). Também foram encontradas concentrações de leptina mais altas em pacientes com CDT do que nos pacientes com nódulos benignos ($p < 0.0001$). Já as concentrações de adiponectina e grelina foram significativamente menores em CDT quando comparadas com pacientes que apresentaram lesões benignas ($p < 0.0001$) (Figura 7).

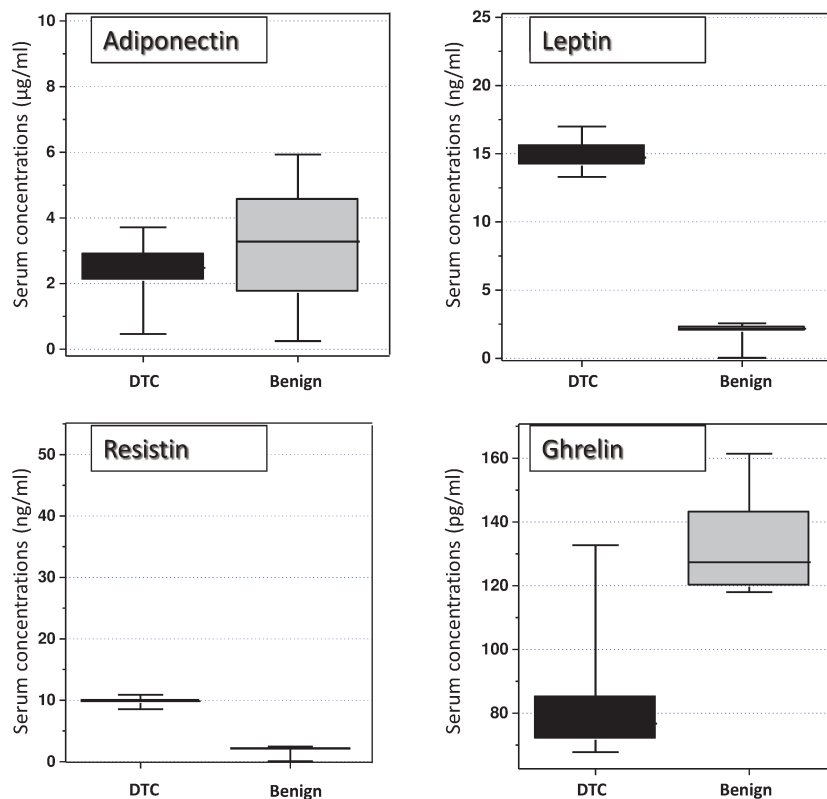


Figura 7. Box plot com as concentrações de cada uma das adipocinas em pacientes com CDT comparando-as com as concentrações encontradas em portadores de nódulos benignos.

As medias de expressão dessas adipocinas foram úteis, ainda, na diferenciação dos subtipos de tumores malignos e benignos, auxiliando na identificação de lesões de padrão folicular, os grandes desafios para os patologistas atualmente, como é possível visualizarmos na Tabela 5.

Em relação às concentrações das adipocinas e sua possível relação com características de agressividade tumoral, tumores mais invasivos apresentaram

menores níveis de adiponectina ($2.19 \pm 0.79 \mu\text{g/ml}$) quando comparado com tumores que não tiveram invasão de tecidos extratireoidianos ($2.76 \pm 0.68 \mu\text{g/ml}$; $p=0.002$). Não foram observadas outras associações entre características clínico patológicas e as citocinas (Tabela 6).

Tabela 5. Comparações de diferentes tipos histopatológicos de acordo com a expressão média de adiponectina, leptina, resistina e grelina

Grupos analisados	Adiponectina	P-value	Leptina	P-value	Resitina	P-value	Grelina	P-value
Malignos vs benignos	2.42±0.86 vs 3.05±1.78	<0.001	9.89±0.63 vs 1.92±0.69	<0.001	14.78±1.63 vs 1.89±0.72	<0.001	85.19±25.07 vs 174.02±18.74	<0.001
CPTC vs bócio	2.37±0.51 vs 2.73±1.63	N.S.	9.69±0.89 vs 1.88±0.73	<0.001	14.68±2.22 vs 1.80±0.75	<0.001	88.85±22.44 vs 132.61±20.07	<0.01
CPTC vs AF	2.37±0.51 vs 4.66±1.74	N.S.	9.69±0.89 vs 2.11±0.47	<0.01	14.68±2.22 vs 2.33±0.30	N.S.	88.85±22.44 vs 141.06±7.16	<0.01
CPTC vs CFT	2.37±0.51 vs 3.08±0.62	N.S.	9.69±0.89 vs 9.49±0.50	N.S.	14.68±2.22 vs 14.94±1.02	N.S.	88.85±22.44 vs 78.72±14.38	N.S.
CPTVF vs CPTC	2.15±0.88 vs 2.37±0.51	N.S.	10.02±0.57 vs 9.69±0.89	N.S.	14.42±2.06 vs 14.68±2.22	N.S.	86.41±22.55 vs 88.85±22.44	N.S.
CPTVF vs bócio	2.15±0.88 vs 2.73±1.63	N.S.	10.02±0.57 vs 1.88±0.73	<0.001	14.42±2.06 vs 1.80±0.75	<0.001	86.41±22.55 vs 132.61±20.07	<0.001
CPTVF vs AF	2.15±0.88 vs 4.66±1.74	<0.05	10.02±0.57 vs 2.11±0.47	<0.001	14.42±2.06 vs 2.33±0.30	N.S.	86.41±22.55 vs 141.06±7.16	<0.001
CPTVF vs CFT	2.15±0.88 vs 3.08±0.62	N.S.	10.02±0.57 vs 9.49±0.50	N.S.	14.42±2.06 vs 14.94±1.02	N.S.	86.41±22.55 vs 78.72±14.38	N.S.
CFT vs AF	3.08±0.62 vs 4.66±1.74	N.S.	9.49±0.50 vs 2.11±0.47	<0.001	14.94±1.02 vs 2.33±0.30	N.S.	78.72±14.38 vs 141.06±7.16	<0.001

Tabela 6. Características clínicas de pacientes com CDT de acordo com a expressão de adiponectina, leptina, resistina e grelina.

Características clínico patológicas (N)	Adiponectina	p	Leptina	p	Resistina	p	Grelina	P-value
Idade ao diagnóstico (67)								
≤ 45	2.30±0.81	0.07	9.81±0.58	N.S.	14.80±1.50	N.S.	82.85±22.03	N.S.
>45	2.74±0.96		10.07±0.80		14.68±2.20		92.61±33.67	
Sexo (67)								
Masculino	2.45±0.84	N.S.	9.88±0.60	N.S.	14.70±1.67	N.S.	82.10±17.03	N.S.
Feminino	2.17±0.92		9.90±0.80		15.24±1.27		101.89±49.63	
Tabagismo (65)								
Fumante	2.25±0.96	N.S.	9.98±0.76	N.S.	15.07±1.05	N.S.	76.37±6.97	N.S.
Nunca fumou	2.50±0.81		9.82±0.58		14.59±1.82		88.78±29.42	
Tamanho tumoral (60)								
< 2cm	2.49±0.91		9.99±0.58		14.52±2.10		82.71±18.14	
2 – 4cm	2.25±0.79	N.S.	9.73±0.77	N.S.	15.01±1.18	N.S.	84.12±26.03	N.S.
> 4cm	2.76±0.64		9.95±0.38		14.93±1.04		87.35±21.35	
Invasão extratireoidiana (45)								
Sim	2.19±0.79	0.02	9.94±0.70	N.S.	14.89±1.65	N.S.	87.09±30.77	N.S.
Não	2.76±0.68		9.87±0.62		14.98±1.42		79.90±11.59	
Cápsula (35)								
Sim	2.54±0.72	N.S.	9.80±0.76	N.S.	14.29±1.43	N.S.	75.84±6.56	N.S.

	Não	2.36±0.90		9.96±0.57		14.92±1.51		90.51±34.17	
Multifocalidade (58)									
	Sim	2.31±0.98	N.S.	9.82±0.67	N.S.	14.40±2.03	N.S.	84.44±25.57	N.S.
	Não	2.69±0.61		9.88±0.65		14.91±1.04		85.95±27.76	
Metastases ao diagnostic (67)									
	Presente	2.27±0.64	N.S.	9.86±0.83	N.S.	14.96±1.22	N.S.	97.98±42.86	N.S.
	Ausente	2.49±0.87		9.89±0.58		14.74±1.74		82.10±17.09	
Tireoidite (40)									
	Presente	2.68±0.97	0.06	9.96±0.64	N.S.	14.73±0.88	0.08	86.47±28.50	N.S.
	Ausente	2.25±0.77		9.84±0.39		14.59±2.71		93.14±34.19	
Evolução (67)									
	Livre de doença	2.45±0.78	N.S.	9.88±0.61	N.S.	14.81±1.74	N.S.	85.51±26.35	N.S.
	Recorrência	2.18±1.26		9.89±0.82		14.62±0.90		83.82±18.82	

4.4 - ANÁLISE DO PERFIL GENOTÍPICO DE *ADIPOQ*, *ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *LEP*, *LEPR*, *RTN*, *GHRL*, *GHSR*

4.4.1 Genótipos e suscetibilidade ao CDT

Dos 21 polimorfismos estudados, apenas 3 aumentaram o risco para o CDT: *GHSR* rs2232165, *LEP* rs7799039 e *LEPR* rs1137101. O genótipo GG de *LEP* rs7799039 foi ligeiramente maior entre os controles (51,5%) do que entre os casos (38,1%; Qui-quadrado=4,895; p=0,087). A análise de regressão logística múltipla ajustada para sexo, idade, etnia, tabagismo e IMC mostrou que o genótipo AG de *LEP* rs7799039 foi um risco independente para o CDT (OR=11,689; p=0,0183; IC95%= 1,516-90,119). Da mesma forma, os genótipos AG e GG do gene *LEPR* rs1137101 representaram riscos independentes para o CDT (respectivamente OR=3,747; p=0,027; IC95%= 1,161-12,092 e OR=5,437; p=0,013; IC95%= 1,426-20,729, respectivamente). As distribuições dos genótipos de *LEP* rs7799039 e *LEPR* rs1137101 podem ser visualizadas nas Figuras 8 e 9.

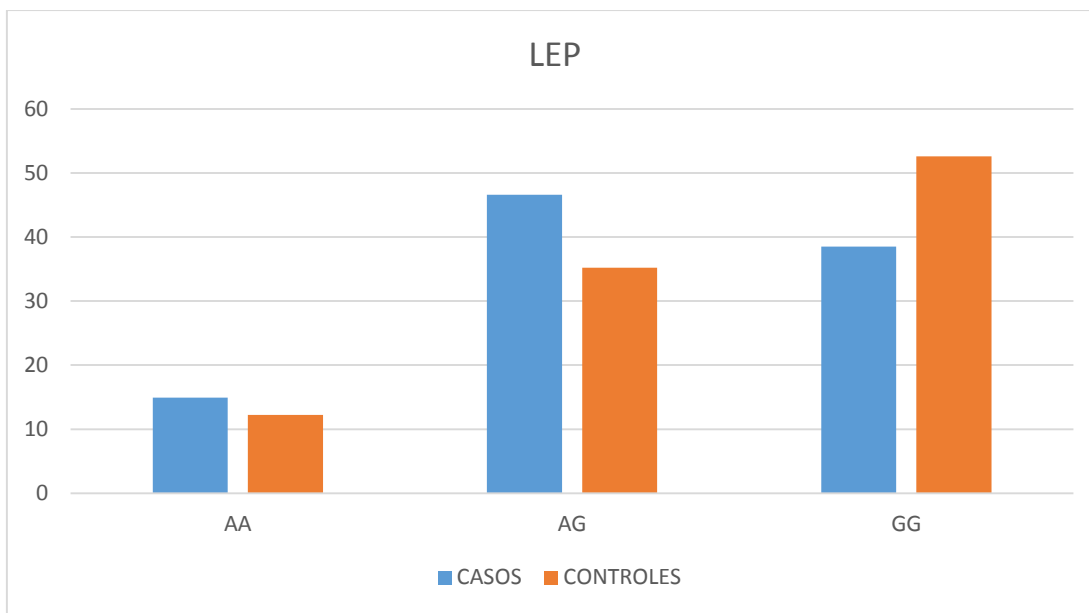


Figura 8: Distribuição dos genótipos entre controles e pacientes com CDT. Polimorfismos LEP *rs7799039*.

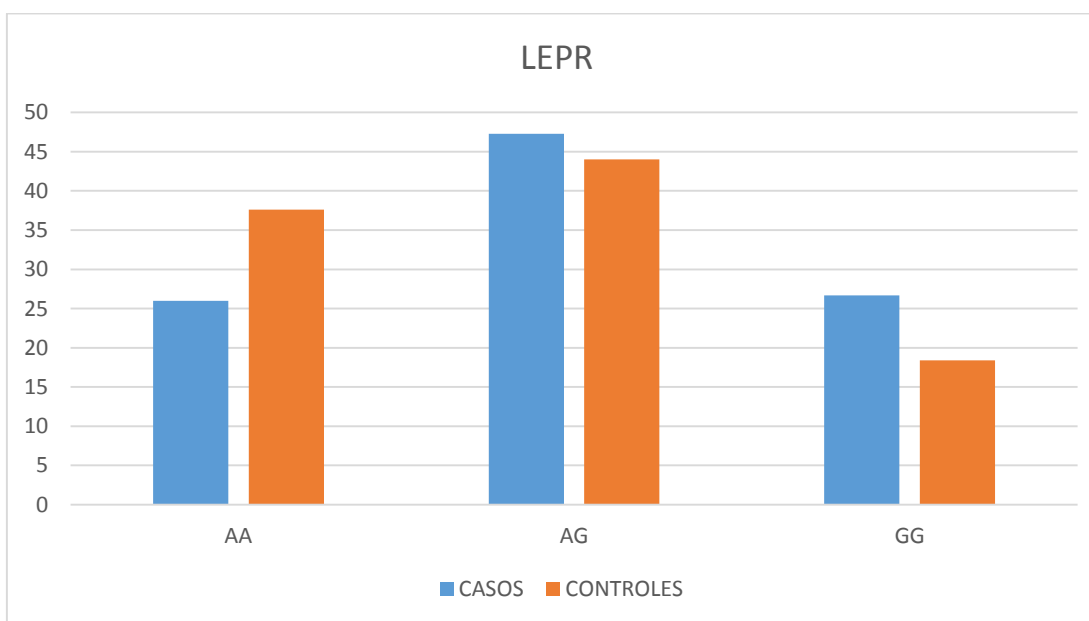


Figura 9: Distribuição dos genótipos entre controles e pacientes com CDT. Polimorfismo LEPR *rs1137101*

Já em relação ao polimorfismo de *GHSR* rs2232165, o genótipo GA aumentou o risco para o CDT em 22 vezes (IC 95% 2-204, $p=0,006$). A distribuição dos genótipos para esse polimorfismo pode ser visualizada na Figura 10.

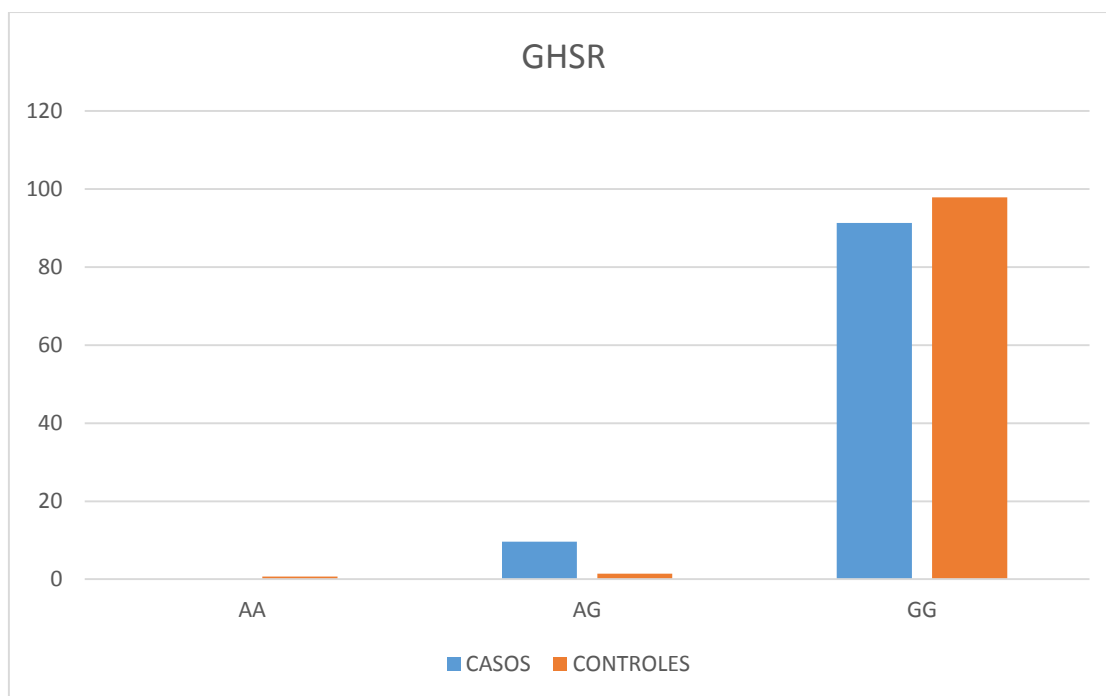


Figura 10: Distribuição dos genótipos entre controles e pacientes com CDT. Polimorfismo *GHSR* rs2232165

Não encontramos associação entre os genótipos estudados e o gênero dos indivíduos estudados. Ainda, não encontramos associação entre os genótipos e a etnia dos indivíduos. O genótipo AA do gene *LEPR* rs1137100 foi mais frequente entre os pacientes com carcinoma folicular (93,8%) do que entre os pacientes com carcinoma papilífero (60,2%; Qui-quadrado=8,219; $p=0,016$). Não observamos associação entre os genótipos e presença de multifocalidade, invasão, cápsula e

tireoidite concomitante. O genótipo GG de *LEP* rs 2167270 foi mais frequente entre pacientes diagnosticados com estadio menos avançado (I e II; 46,2%) do que entre pacientes diagnosticados com estadio mais avançado (III e IV; 22,7%; Qui-quadrado=6,311; $p=0,043$).

A análise de sobrevida não mostrou associação entre tempo livre de doença e gênero, etnia, tabagismo, multifocalidade, invasão, cápsula e tireoidite. Nenhum dos genes estudados apresentou associação com tempo livre de doença.

4.4.2 Análise dos genótipos com as dosagens séricas obtidas

Diversos genótipos dos polimorfismos dos genes que codificam as adipocinas ou seus receptores se correlacionaram a diferenças nas médias de expressão sérica das adipocinas. Para fins didáticos, separamos as adipocinas em tópicos, para que os resultados fiquem mais claros.

Quando comparamos as médias de expressão dos três genótipos de *LEP* rs7799039, o genótipo AG foi mais expresso ($10,075 \pm 0,6058$ ng/mL) que o genótipo AA ($9,229 \pm 0,986$ ng/mL; $p=0,012$).

Os três genótipos de *LEP* rs2167270 (AA x AG x GG) também apresentaram diferenças significativas entre médias ($p=0,018$), sendo que o pós-teste mostrou que as diferenças de expressão se deveram a comparação do genótipo AG

(10,057±0,5921 ng/mL) com GG (9,52±0,7961 ng/mL; $p<0,05$). Os valores de expressão e as significâncias podem ser mais facilmente visualizados na Figura 11.

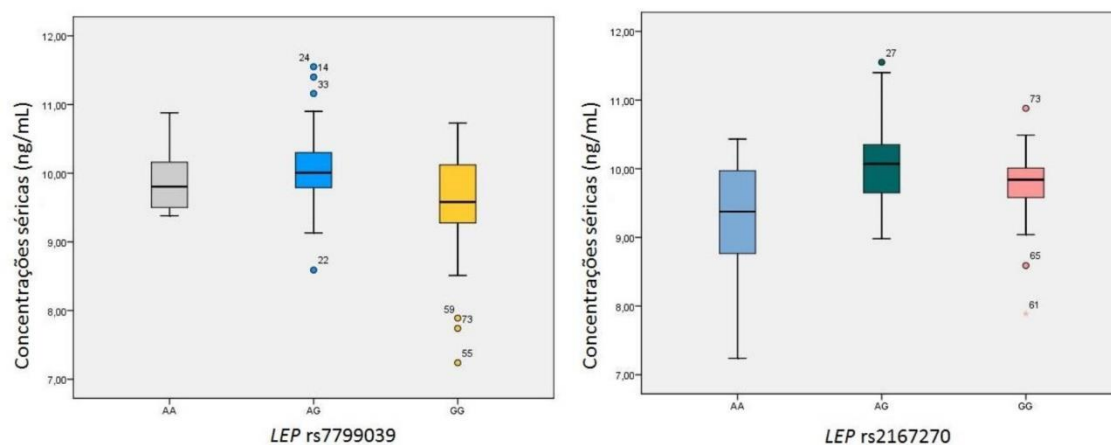


Figura 11. Diferenças na expressão de leptina em indivíduos portadores de diferentes genótipos de *LEP* rs7799039 e *LEP* rs2167270

As concentrações séricas de adiponectina foram afetadas por polimorfismos no gene que codifica a adiponectina (*ADIPOQ*) e também nos genes que codificam seus dois receptores (*ADIPOR1* e *ADIPOR2*).

A herança do genótipo GA de *ADIPOQ* rs12629945 ocasionou expressão significativamente mais baixa (1,685±0,374 µg/mL) do que a herança do genótipo GG (2,508±0,816 µg/mL; $p<0,05$).

Já para *ADIPOR1*, a herança do genótipo AA do rs2232853 fazia com que os pacientes apresentassem concentrações significativamente reduzidas (1,5234±1,072 µg/mL) quando comparados aos indivíduos de genótipo AG

($2,458 \pm 0,838 \mu\text{g/mL}$) e GG ($2,5758 \pm 0,7558 \mu\text{g/mL}$) ($p=0,0414$). Essa diferença se devia principalmente à notável diferença entre os indivíduos AA vs GG. Além disso, outro polimorfismo nesse mesmo gene (rs1342387) também alterou as concentrações séricas de adiponectina. Indivíduos com genótipo CC ($2,2117 \pm 0,99 \mu\text{g/mL}$) tiveram expressão significativamente diminuída em relação a portadores do genótipo CT ($2,75 \pm 0,6225 \mu\text{g/mL}$; $p=0,0201$).

Indivíduos que herdavam o genótipo CT de *ADIPOR2* rs1058322 igualmente apresentavam menores concentrações de adiponectina sérica ($2,25 \pm 0,9609 \mu\text{g/mL}$) quando comparados aos indivíduos de genótipo CC ($2,663 \pm 0,5238 \mu\text{g/mL}$; $p=0,0201$). Todas as variações nas concentrações séricas de adiponectina de acordo com os genótipos herdados para *ADIPOQ*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* podem ser melhor visualizadas nas figuras 12, 13 e 14.

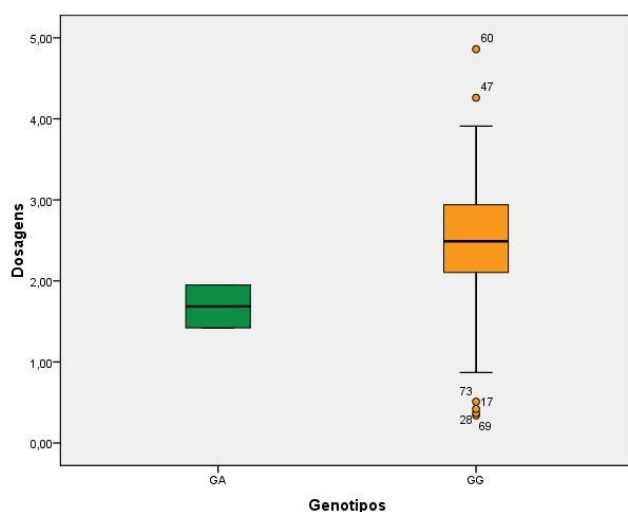


Figura 12. Diferenças na expressão de adiponectina em indivíduos portadores de diferentes genótipos de *ADIPOQ* rs12629945

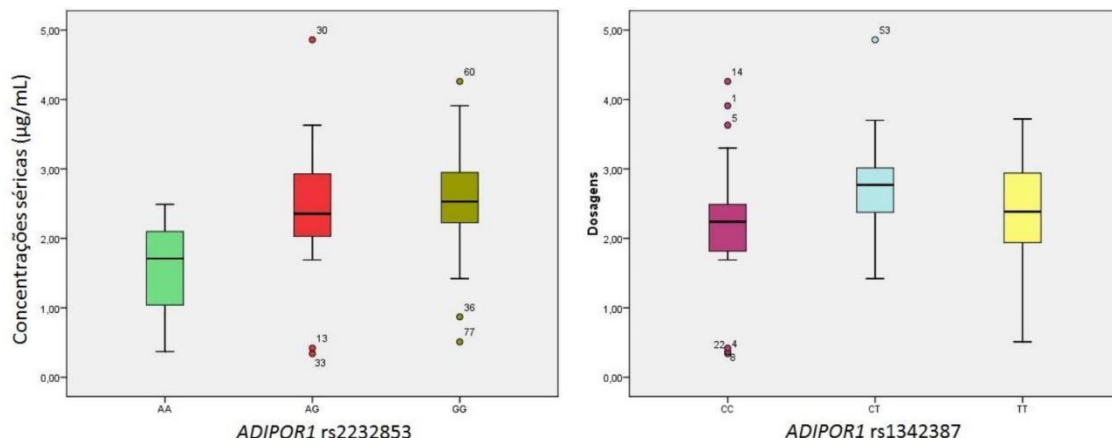


Figura 13. Diferenças na expressão de adiponectina em indivíduos portadores de diferentes genótipos de *ADIPOR1* rs2232853 e *ADIPOR1* rs1342387

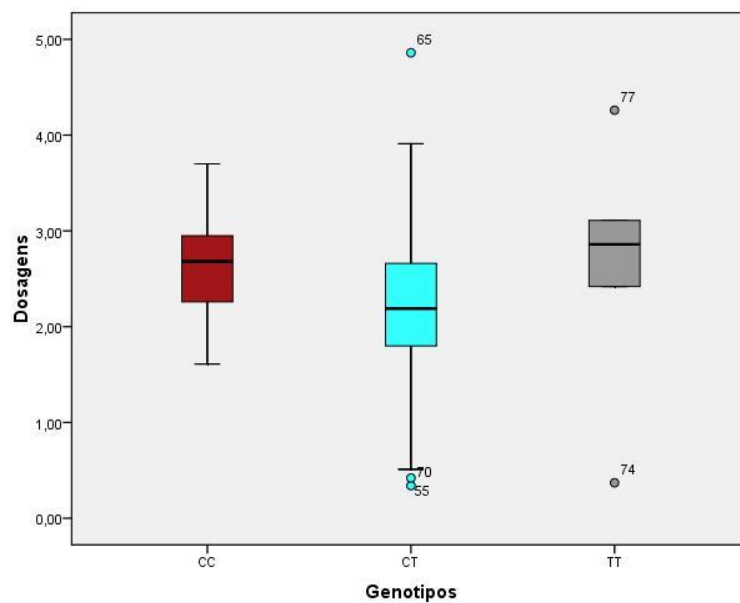


Figura 14. Diferenças na expressão de adiponectina em indivíduos portadores de diferentes genótipos de *ADIPOR2* rs1058322

A exemplo do que aconteceu com a adiponectina, a expressão de grelina foi influenciada por polimorfismos no gene que codifica o receptor dessa proteína (*GHSR*). Quando comparamos as médias de expressão dos genótipos GG e GA de *GHSR* rs2232165, o genótipo GA foi mais expresso ($107,11 \pm 41,414$ pg/mL) que o genótipo GG ($81,86 \pm 20,331$ pg/mL; $p=0,0263$). Os valores de expressão e a significância podem ser melhor visualizados na Figura 15.

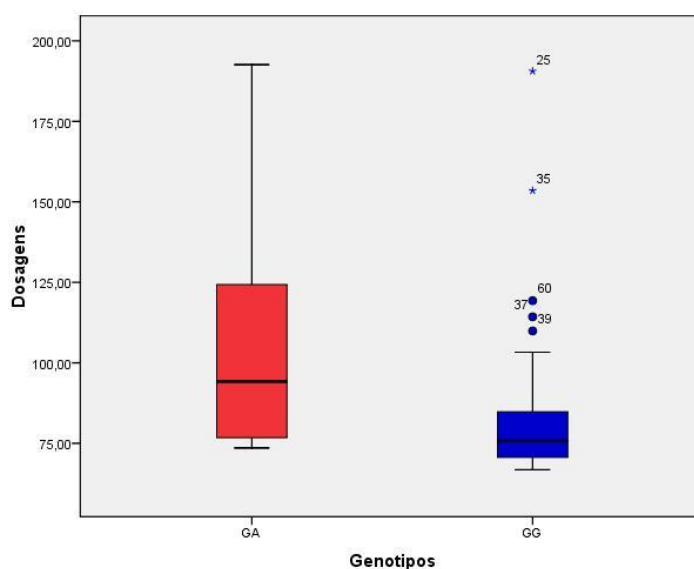


Figura 15. Diferenças na expressão de grelina em indivíduos portadores de diferentes genótipos de *GHSR* rs2232165

Nenhum dos polimorfismos investigados para o gene *RTN* se associou a diferenças nas concentrações séricas dessa adipocina.

4.5 EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR DAS ADIPOCINAS E SEUS RECEPTORES EM TECIDOS TIREOIDIANOS

As qPCR dos tecidos tireoidianos obtidos nos mostraram que a glândula tireoide não só está relacionada com as adipocinas que estão circulantes, mas também possuímos evidências de que a glândula, quando em processo de tumorigenese/evolução tumoral, pode produzir RNAm de algumas dessas adipocinas. Encontramos expressão de ADIPOQ, ADIPOR1, ADIPOR2, GHRL, GHRSR e LEPR. Os valores de expressão encontrados variaram largamente, não sendo possível realizar análise estatística desses dados com variáveis clínico-patológicas, devido ao desvio padrão muito grande apresentado. Na Figura 16 podemos observar que encontramos RNAm de *GHRL* no tecido tireoidiano.

Não foi encontrada nenhuma expressão de LEP e RETN. Estes dois genes não apresentaram nenhum tipo de amplificação, para nenhum dos casos estudados, e nem mesmo para o tecido normal.

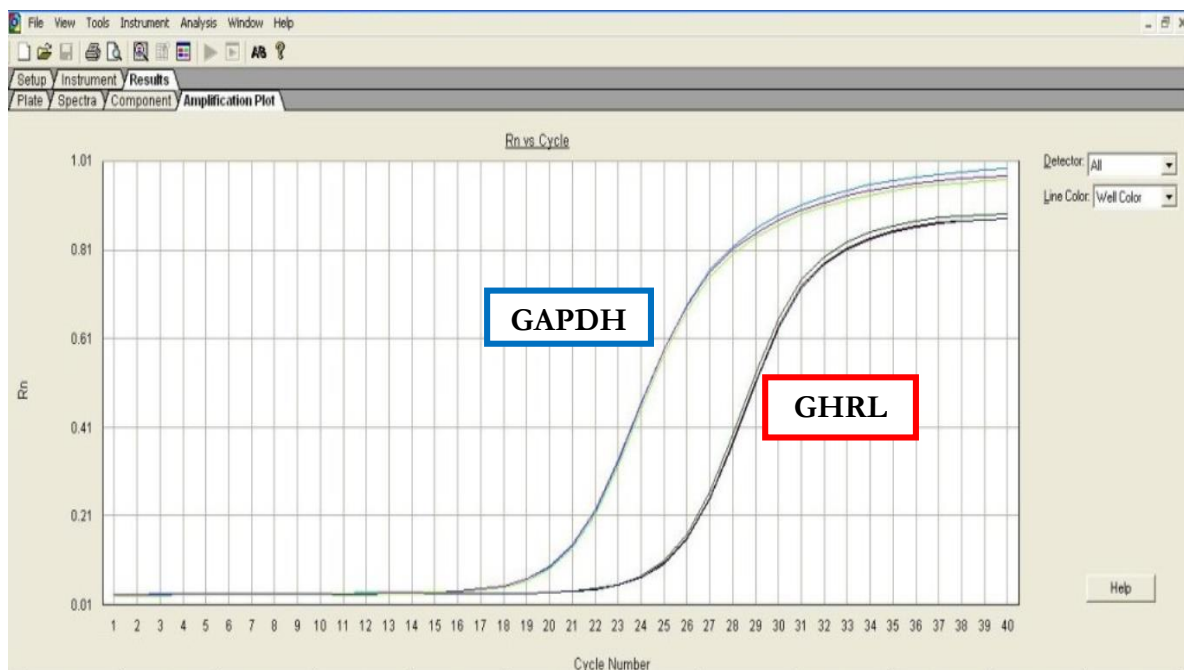


Figura 16. Curva de amplificação do gene GHRL, que codifica a grelina e do controle endógeno GAPDH.

5 - DISCUSSÃO

Neste trabalho, demonstramos que os indivíduos que estão acima do peso (sobrepeso ou obesos) possuem um risco consideravelmente maior para o CDT. Esta associação foi evidente em mulheres, mas desapareceu na população masculina. Nossos dados estão em consonância com a literatura, que tem demonstrado, nas últimas décadas, que o excesso de peso é um fator de risco importante para o CDT.

Desde o ano 2000, muitos estudos vêm sendo publicados demonstrando a correlação obesidade-CDT. Dal Maso et al, encontraram um risco maior para o desenvolvimento de CDT em mulheres obesas, numa meta-análise que incluiu 2473 indivíduos e 12 estudos caso-controle (23). Muitos estudos demonstraram a relação obesidade-CDT demonstrando que principalmente as mulheres com excesso de peso ou obesidade têm maior risco de desenvolvimento dessa doença (27-29). Em 2004, Samanic et al investigaram uma grande coorte de homens veteranos de guerra norte-americanos com diagnóstico de obesidade (3.668.486 brancos; 832.214 negros) e os riscos que esta obesidade poderia representar para o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer ao longo de quase 30 anos. O principal objetivo dos autores foi identificar diferenças no risco de câncer entre indivíduos obesos brancos e negros, e os autores relataram que os tanto os brancos quanto os negros apresentavam maior risco de desenvolver CDT (RR = 1,4; IC95% = 1,09- 1,81 e RR = 1,92; 95% CI = 1,09-3,4, respectivamente) (27). Em outro

estudo, Boru et al analisaram uma coorte italiana de 1.333 pacientes obesos com recomendação para a realização de cirurgia bariátrica. Quarenta e três (3,2%) destes pacientes apresentaram diferentes tipos de câncer antes, durante ou após o tratamento da obesidade. O CDT foi o segundo mais frequente, atingindo 8 (18,60%) dos 43 pacientes com tumores malignos, sugerindo que indivíduos com obesidade severa estão em maior risco de desenvolvimento de carcinomas da tireoide (28). Em 2006, Engeland et al analisaram um grande grupo de pessoas (2.000.947) por uma média de 23 anos. Durante este tempo, foram diagnosticados 3.046 casos de CDT e 1.415 deles ocorreram em indivíduos com sobrepeso ou obesos. O risco de CDT aumentou moderadamente, tanto em mulheres (RR = 1,02; IC 95% = 1,01-1,03) quanto em homens (RR = 1,03; IC 95%: 1,00-1,05). Os autores verificaram que as mulheres obesas possuíam maior risco de desenvolver CPT (RR = 1,19; IC 95% = 1,01-1,41) ou CFT (RR = 1,63; IC 95% = 1,24-2,15), mas menor risco de desenvolvimento de carcinoma medular da tireoide (RR = 0,35; IC 95% = 0,16-0,79), demonstrando, pela primeira vez, que a associação da obesidade com os cânceres de tireoide era mais forte para os CDTs. Homens não apresentaram maior risco de CDTs, provavelmente porque o número de casos masculinos incluídos foi limitado (29). De fato, diversos estudos têm relatado essas diferenças entre homens e mulheres obesos e o risco de CDT, permitindo a especulação de que há efeitos hormonais envolvidos nessa relação ou então que a insuficiência de casos do sexo masculino analisados pode influenciar a análise estatística desses casos (22).

No fim da primeira década dos anos 2000, iniciaram-se estudos que procuravam responder quais seriam as causas e/ou mecanismos envolvidos na relação obesidade e CDT. Os primeiros estudos investigaram parâmetros antropométricos, encontrando correlações entre superfície corpórea, peso, altura e sobrepeso/obesidade com o CDT (30-33). Neste estudo, demonstramos que a ingesta alimentar pode ser um dos fatores que aumenta o risco para o CDT, sendo que a ingestão aumentada de calorias, principalmente proveniente de carboidratos e proteínas seriam os maiores responsáveis por esse aumento de risco (146). Em uma avaliação cuidadosa dos hábitos alimentares de uma parcela da população do Estado de SP, uma população essencialmente urbana, cujo padrão dietético é semelhante ao existente na maioria dos países americanos ou americanizados, demonstramos que, embora os indivíduos com sobrepeso e obesidade apresentassem excesso de consumo de carboidratos, proteínas e gorduras em comparação a indivíduos eutróficos, apenas o excesso de carboidratos e proteínas estavam relacionadas ao risco CDT. Nossos dados relacionados a ingestão de quantidades superiores a recomendação da OMS de carboidratos e o risco de CDT corroboram alguns estudos europeus (147, 148). A dieta básica da nossa população, que consiste principalmente em arroz, feijão e farinha, é bastante pobre em nutrientes (145, 149). Os mecanismos por trás dessa associação de carboidratos-CDT não são totalmente compreendidos, mas poderíamos supor que o mesmo que é sugerido para os cânceres de mama, próstata, cólon e pâncreas (34, 150-153) poderia acontecer para CDT, ou seja, a resistência insulínica poderia ser o fator

relacionado a um risco aumentado para CDT entre os indivíduos que consomem grandes quantidades de carboidrato.

Nos últimos anos, Rezzonico et al demonstraram que os pacientes com nódulos de tireoide eram mais propensos a apresentar resistência insulínica quando comparados com os controles (35, 154). Os mesmos autores sugeriram que essa associação é ainda mais forte em pacientes com CDT, quando comparados com controles (36). Estes resultados podem complementar as nossas descobertas, uma vez que a ingesta dietética excessiva de carboidratos/açúcares poderia estar correlacionada a resistência insulínica. É importante lembrar, ainda, que a via PI3K/Akt, fortemente relacionada ao desenvolvimento e progressão do CDT nos últimos anos (155-157), pode comprometer o alvo da insulina, sugerindo que o consumo dietético, o perfil genotípico e o bioquímico poderiam todos interagir e levar a um aumento do risco para CDT.

Demonstramos, ainda, neste trabalho, que indivíduos que consomem quantidades de proteínas superiores às recomendadas pela OMS (158-160) possuem maior risco de desenvolvimento do CDT. Diversos autores estudaram a relação de fontes proteicas da dieta com o CDT. Truong et al não encontraram nenhuma relação entre o consumo de peixes de água salgada, conservas de peixe ou frutos do mar e o risco de CDT (161). Analisando 13 estudos, Bosseti et al (162), também não demonstraram qualquer associação entre o CDT e o consumo de peixes ou mariscos. Uma série de fatores pode explicar as inconsistências entre estudos relacionados ao consumo de proteínas, incluindo as diferenças na ingesta de iodo local. Nossa população, especialmente na região sul/sudeste do país, onde

este estudo foi realizado, consome mais proteínas das carnes vermelha e branca do que de peixes (145, 149), e, infelizmente, ainda não existem investigações sobre o consumo de carne vermelha e sua possível relação com CDT para que possamos comparar nossos resultados. Embora as evidências da relação da ingestão excessiva de proteínas com o CDT ainda sejam escassas, a literatura tem sugerido que ela pode afetar outros tipos de câncer, como os de mama, próstata e cólon. Os mecanismos envolvidos nessa relação ainda não são muito bem compreendidos, mas alguns autores sugerem que o alto teor de nitrosamina de alguns produtos da carne processada podem aumentar o risco para o desenvolvimento de câncer (163), enquanto outros sugerem que a relação entre proteína animal e o risco de câncer pode estar ligado ao efeito da regulação da atividade de IGF-1, que é conhecido por ser um fator promotor de crescimento dos cânceres. A proteína animal, e em particular, aquela encontrada nos derivados do leite, pode elevar as concentrações circulantes de IGF-I (164). Este fator tem sido associado com um risco aumentado de câncer de mama, da próstata, carcinoma colorretal e também, possivelmente, ao câncer de bexiga (165-168). IGF-1 também poderia ser uma explicação para o fato de apenas os carboidratos e as proteínas terem aparecido como fatores de risco para CDT em nosso estudo, excluindo a ingestão de lipídios.

Nossos dados mostraram que tanto pacientes quanto controles não praticavam atividade física regularmente. A população brasileira, em geral, não pratica atividade física regular, sendo este um fator que contribui para o ganho de peso ao longo dos anos, em paralelo com o aumento da prevalência do CDT observado em nossa população (149). Na década corrente, muitos autores iniciaram

estudos procurando possíveis mecanismos causais da relação obesidade-CDT, investigando fatores como a prática de exercício físico e circunferência da cintura (40, 42), sendo que quanto mais a circunferência abdominal aumentava, maior o risco de desenvolvimento de CDT, sugerindo que a adiposidade central poderia desempenhar um papel no balanço de hormônios e metabolismo, predispondo ao câncer.

Seguindo o raciocínio de que o CDT está associado ao excesso de peso em nosso estudo e que esta associação poderia estar relacionada ao consumo aumentado de carboidratos e proteínas, além das evidências já apresentadas pela literatura que ligavam o CDT a inflamação e a obesidade central, investigamos neste estudo fatores que poderiam estar relacionados a todos estes fatores: as adipocinas, as quais demonstramos que o perfil molecular pode estar relacionado aos tipos histológicos de tumores tireoidianos, sendo principalmente a leptina e a resistina excelentes marcadores séricos para diferenciar lesões tireoidianas benignas de lesões malignas. Este é o primeiro estudo, de nosso conhecimento, demonstrando que a adiponectina, a leptina, a resistina e a grelina séricas podem ser úteis no diagnóstico diferencial de neoplasia maligna da tireoide. Além disso, os perfis séricos dessas adipocinas foram úteis na caracterização de lesões de padrão folicular, que representam um desafio em citologia diagnóstica. Estes resultados estão de acordo com a literatura recente, que tem mostrado que os pacientes com outros cânceres, como o carcinoma colorretal (169), os cânceres do pulmão (170), do esôfago (171), da mama (172), e da próstata (173), podem ter diferentes

concentrações séricas de adipocinas, quando comparados com pacientes que apresentam nódulos benignos e controles.

As adipocinas produzidas pelo tecido adiposo possuem bioatividades que podem favorecer o processo de tumorigenese, e já foi demonstrado que elas desempenham um papel crítico na regulação da inflamação e da sensibilidade à insulina (174). Assim, elas podem representar a ligação entre a inflamação, a obesidade e o câncer. A grelina encontra-se amplamente relacionada com a obesidade, e suas ações fisiológicas vão bem além metabolismo humano (175). Dados experimentais sugerem que a grelina é expressa em linfócitos T humanos e em monócitos e atua através do receptor de hormônio de crescimento GHSR para inibir a expressão de das citocinas pró-inflamatórias IL-1B, IL-6 e TNF-alfa (176), também provavelmente ligando obesidade-câncer-inflamação. O link entre a inflamação e o câncer tem sido explorado pelo nosso grupo nos últimos anos e há evidências significativas de que o perfil molecular dos indivíduos é modificado ou correlaciona-se com um processo inflamatório (85). Desta forma, é importante conhecer o perfil molecular dos indivíduos com CDT e associa-lo, também, a seu perfil antropométrico e inflamatório, buscando compreender os fatores que modificam a apresentação e evolução dos CDTs. Embora não tenhamos encontrado que as concentrações séricas modificam de forma significativa os CDTs, a dosagem da concentração sérica dessas proteínas pode representar uma nova abordagem alternativa para o diagnóstico e manejo dos nódulos tireoidianos, especialmente para casos em que a PAAF não pode dar um diagnóstico definitivo, evitando cirurgias e intervenções mais agressivas e desnecessárias.

Uma vez que as concentrações séricas das adipocinas apresentaram-se alteradas entre os indivíduos com CDT, buscamos explicações genéticas que pudessem estar relacionadas a tal fato, como o perfil genotípico dos genes que codificam as adipocinas e seus receptores. Demonstramos, neste estudo, que o perfil genotípico de *LEP*, *LEPR* e *GHSR* podem aumentar o risco de CDT.

Já é bem conhecido que a leptina, por exemplo, é um componente importante de diversos processos da célula tireoidiana, dentre eles a regulação da expressão de TSH (177) e o desenvolvimento da autoimunidade (178, 179) e que as concentrações séricas de leptina podem estar relacionadas a presença de Resistência insulínica no hipotireoidismo (180). Entretanto, este é o primeiro estudo que investiga a ocorrência de modificações genéticas em *LEP* e *LEPR* no CDT, buscando ligar esses eventos ao câncer. Demonstramos pela primeira vez que polimorfismos em *LEP* (rs7799039) e *LEPR* (rs1137101) podem estar relacionados a um aumento na suscetibilidade ao CDT. O SNP rs7799039 no gene *LEP* já foi associado a aumento de IMC, sobrepeso e até mesmo a variações nas concentrações séricas de leptina (181-183). Uma meta-análise que incluiu 5 estudos relacionados a este SNP e o risco para o carcinoma colorretal e 3 estudos deste mesmo SNP relacionados ao câncer de próstata concluiu que a herança desta alteração em *LEP* pode aumentar o risco para o câncer de próstata, mas não para o carcinoma colorretal (184). Outros estudos mostraram, ainda, que este SNP não estaria ligado ao desenvolvimento de cânceres de mama (185).

Ainda em relação ao perfil de risco para o CDT, demonstramos que o polimorfismo *GHSR* rs2232165 aumenta o risco para o CDT. Embora este

polimorfismo já tenha sido associado ao alcoolismo e à obesidade (186, 187), ainda não há relatos da relação deste polimorfismo em específico com outros cânceres, sendo o nosso, até o presente momento, o primeiro a descrever essa relação. O perfil de grelina sérica e/ou seu perfil genotípico para outros polimorfismos já foram relacionados a cânceres de pulmão, próstata e colorretal (113, 188, 189).

Além da relação do perfil genotípico de ADIPOQ, ADIPOR1, ADIPOR2, GHRL, GHSR, LEP, LEPR e RETN e o risco para o CDT, demonstramos neste trabalho que as concentrações séricas de leptina variam de acordo com a herança de genótipos específicos. Hoffstedt e colaboradores mostraram que indivíduos com o genótipo AA do rs7799039 de LEP apresentavam maiores concentrações séricas de leptina do que os indivíduos com os genótipos AG ou GG (190). Nossos dados confirmaram que variações nas concentrações de leptina podem ocorrer de acordo com o genótipo herdado, porém, com variações menores. Uma vez que este SNP está localizado na região promotora, este polimorfismo pode afetar a expressão genica a nível transcricional, levando a maior ou menor produção de leptina. Esses achados podem ajudar, ainda, a explicar o fato de que não houve correlação em nosso estudo com IMC, permitindo hipotetizar que a herança genética pode desempenhar um papel mais importante do que os efeitos que a obesidade exerce sobre a secreção dessa adipocina.

Quanto ao SNP rs1137101 em LEPR, que demonstramos que aumenta o risco para o CDT, a literatura tem mostrado que a herança de variantes do gene LEPR está relacionada a IMCs maiores, resistência insulínica e ao índice HOMA-IR (utilizado para estimar a resistência insulínica), síndrome metabólica, aumento de

massa gorda e de adipócitos, aumento da circunferência da cintura, obesidade, desenvolvimento de diabetes tipo 2 e concentrações séricas de leptina (191-204). Vários destes fatores já foram, inclusive, relacionados ao CDT. Este polimorfismo já foi associado aos cânceres de mama, próstata e pulmão, além da síndrome de ovário policístico (205-211).

Demonstramos, ainda, que o SNP rs 2167270 de LEP está correlacionado a modificações nas quantidades de leptina circulante. Friedlander e colaboradores correlacionaram os genótipos deste SNP com aumento de massa corpórea e de circunferência da cintura (212), e Jiang e colaboradores demonstraram que este SNP estava associado a IMC acima do considerado ideal (181). O genótipo AA do rs2167270 já foi associado, também, a diminuição do risco de desenvolvimento de carcinoma colorretal (213). Embora variações no gene LEP possam alterar a quantidade de leptina produzida, nenhuma correlação entre este SNP e o risco para CDT foi encontrada em nosso estudo.

O polimorfismo em GHSR rs2232165, além de ter aumentado em vinte vezes o risco para o CDT, também modificou as quantidades séricas de grelina encontradas nos pacientes com CDT. Indivíduos que herdaram o genótipo GG de GHSR rs2232165 produziam quantidades consideravelmente menores do que aqueles que herdavam os genótipos GA ou AA. Esta é a primeira vez, ao nosso conhecimento, que se descreve a relação deste polimorfismo com as concentrações séricas da grelina. Em 2014, Hedayatzadeh-Omran et al descreveram que há uma relação entre a herança de genótipos de GHRL (Leu72Met) e as quantidades séricas de grelina liberada, tendo sido demonstrada uma relação inversa entre a

frequência do genótipo CC deste gene e as quantidades de grelina sérica (214). Os estudos correlacionando polimorfismos nos genes GHRL e GHSR ainda são muito escarços, sendo o nosso estudo um dos primeiros a demonstrar esta relação genótipo-concentração sérica.

Polimorfismos nos genes que codificam os receptores de adiponectina também se mostraram importantes modificadores das concentrações séricas de adiponectina nos pacientes com CDT. Os polimorfismos em ADIPOR1 rs2232853 e rs1342387 e o polimorfismo rs1058322 em ADIPOR2 modificaram significativamente as concentrações séricas de adiponectina de seus portadores. O polimorfismo ADIPOR1 rs1342387 já foi descrito como modificador do risco de desenvolvimento de diversos cânceres, como o carcinoma colorretal e o câncer de próstata (215, 216), porém, nenhum destes estudos menciona este SNP como um fator modificador das quantidades de adiponectina sérica circulantes. Da mesma forma, o SNP rs2232853 já foi descrito como tendo um papel em cânceres de próstata e em pacientes diabéticos, porém, não há, até o momento, nenhum artigo descrevendo que este SNP poderia estar relacionado às quantidades de adiponectina circulantes no organismo, sendo o nosso estudo o primeiro a demonstrar tal relação.

Quanto ao SNP ADIPOR2 rs1058322, Siitonen et al demonstraram que sua está relacionada ao desenvolvimento de doença cardiovascular em indivíduos com intolerância a glicose, e, ainda mais interessantemente, demonstraram que a herança deste polimorfismo pode estar relacionada ao desenvolvimento de Diabetes Tipo 2 nesses pacientes que já apresentam intolerância à glicose (217).

Mas, embora a expressão desse receptor já tenha sido demonstrada como fator importante em cânceres de pâncreas, próstata e esôfago (218-220), são muito escassos os estudos do perfil genotípico de ADIPOR2, sendo que o único estudo que demonstra que variações genotípicas em rs1058322 podem ser importantes por alterarem o risco de desenvolvimento do diabetes.

As variações genéticas encontradas neste estudo, bem como as variações de concentrações séricas de adiponectina, leptina, resistina e grelina não acontecem apenas no organismo como um todo. Evidenciamos, neste estudo, que as células tireoidianas produzem RNAm de adiponectina e seus receptores, do receptor de leptina e da grelina e seu receptor. Estes dados são importantes por reafirmarem que estas adipocinas devem ter um papel importante ou na transformação maligna da célula tireoidiana, ou na progressão tumoral e composição do microambiente tumoral, uma vez que a própria célula tireoidiana, que não é a principal produtora destas adipocinas, passa a dar comandos para que se produza RNAm dessas adipocinas dentro das células foliculares tireoidianas, permitindo hipotetizar que estas adipocinas possuam não apenas um papel sistêmico nos pacientes com CDT, mas que tenham também um papel local, relacionado à célula tireoidiana. Estudos futuros poderão comprovar esta hipótese.

6 - CONCLUSÕES

Concluimos que indivíduos portadores de nódulos tireoidianos, especialmente os indivíduos portadores de CDT possuem um perfil antropométrico e molecular (em relação às adipocinas) diferenciado, sendo que aqueles que estão mais fora do peso considerado adequado estão mais suscetíveis ao CDT, assim como aqueles que apresentam alterações genéticas e/ou de expressão da adiponectina, leptina, resistina e grelina.

Demonstramos que existe um aumento do risco de CDT, decorrente do excesso de peso (sobrepeso e obesidade) e que esse risco, além de estar ligado ao IMC dos indivíduos, pode estar ligado à qualidade alimentar dos mesmos, especialmente quando há excesso de consumo de carboidratos e proteínas.

Os pacientes com CDT (obesos e não obesos) possuem concentrações séricas de adiponectina e grelina significativamente menores que os indivíduos controles. Entretanto, apresentam maiores concentrações de leptina, resistina quando comparados a esses indivíduos. Essas diferenças nas concentrações séricas das referidas adipocinas mostraram-se capazes de identificar nódulos tireoidianos benignos de malignos com excelente acurácia, revelando potenciais marcadores séricos de diagnóstico para o CDT.

Embora as concentrações séricas de adiponectina, leptina, resistina e grelina tenham se mostrado muito interessantes do ponto de vista diagnóstico, elas não se

correlacionaram a características clinicopatológicas dos tumores estudados, não se provando bons marcadores de prognóstico e seguimento.

Alguns dos polimorfismos estudados mostraram-se relacionados a maiores/menores concentrações séricas das adipocinas. No caso da leptina, a herança de variantes em *LEP* (rs7799039, rs2167270) ocasionou diferenças nas concentrações séricas de leptina dos pacientes. Já no caso da adiponectina, tanto polimorfismos no gene que codifica a adiponectina (*ADIPOQ* rs12629945) quanto em seus receptores (*ADIPOR1* – rs2232853 e rs1342387 e *ADIPOR2* - rs1058322), que fazem com que ela fique funcional, parecem estar ligados às concentrações encontrada para essas adipocinas. Da mesma forma, a grelina foi influenciada por polimorfismos no gene que codifica seu receptor: herdar os SNPS rs2232165 ou rs2232169 em *GHSR* alterou significativamente as concentrações séricas de grelina mensuradas neste trabalho. Já polimorfismos no gene que codifica a resistina (*RETN*) não alteraram as concentrações séricas dessa adipocina.

A herança dos polimorfismos rs7799039 em *LEP*, rs1137101 em *LEPR* e rs2232165 em *GHSR* aumenta o risco de CDT, tendo estes sido considerados fatores de risco independentes para o CDT por análise estatística multivariada. Estes achado sugerem que os genes *LEP*, *LEPR* e *GHSR* podem fazer parte de um perfil de suscetibilidade ao CDT.

Entretanto, nenhum dos polimorfismo acima mencionados se correlacionou significativamente com características clinicopatológicas e nem de evolução dos pacientes com CDT, não caracterizando bons marcadores para este fim.

Nossos dados indicaram, ainda, que ao contrário do que a literatura tem sugerido até o presente momento, as adipocinas estão sendo produzidas pelas próprias células tireoidianas, uma vez que encontramos RNAm dessas adipocinas. Embora este não seja o principal tecido que sintetiza adiponectina, leptina, resistina e grelina, as quantidades que foram encontradas de RNAm e de proteína não podem ser desprezadas e devem ser melhor investigadas.

Em síntese, este trabalho sugere que é possível traçar um perfil do indivíduo portador de CDT em relação a sua constituição física, seus hábitos alimentares e também o perfil molecular destes indivíduos para a adiponectina, leptina, resistina e grelina, sugerindo, assim, que estas citocinas são boas candidatas a marcadores moleculares para o CDT, além de serem potenciais links entre a obesidade, inflamação e CDT.

7 – REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. WHO. Global Health Risks. Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva: 2009.
2. Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. JAMA. 2006 Apr 5;295(13):1549-55. PubMed PMID: 16595758. Epub 2006/04/06. eng.
3. Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of Obesity and Trends in the Distribution of Body Mass Index Among US Adults, 1999-2010. Jama-J Am Med Assoc. 2012 Feb 1;307(5):491-7. PubMed PMID: ISI:000299728000030. English.
4. Perez Rodrigo C. Current mapping of obesity. Nutr Hosp. 2013 Sep;28 Suppl 5:21-31. PubMed PMID: 24010741. Epub 2013/10/22. eng.
5. Wang Y, Wang W. Increasing Incidence of Thyroid Cancer in Shanghai, China, 1983-2007. Asia Pac J Public Health. 2012 Mar 16. PubMed PMID: 22345304. Epub 2012/02/22. Eng.
6. Jung CK, Lubin JH, Brenner AV, Little MP, Sigurdson AJ, Nikiforov YE. The Increase in Papillary Thyroid Cancer Incidence in the US during the Last Four Decades Is Accompanied by a High and Stable Frequency of BRAF Mutations and a Sharp Increase in NRAS Mutations. Modern Pathol. 2012 Feb;25:146a-a. PubMed PMID: ISI:000299986900603. English.
7. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. JAMA. 2006 May 10;295(18):2164-7. PubMed PMID: 16684987. Epub 2006/05/11. eng.
8. Chen AY, Jemal A, Ward EM. Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988-2005. Cancer. 2009 Aug 15;115(16):3801-7. PubMed PMID: 19598221. Epub 2009/07/15. eng.
9. Agate L, Lorusso L, Elisei R. New and old knowledge on differentiated thyroid cancer epidemiology and risk factors. J Endocrinol Invest. 2012;35(6 Suppl):3-9. PubMed PMID: 23014067. Epub 2012/10/04. eng.

10. Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *J Cancer Epidemiol*. 2013;2013:965212. PubMed PMID: 23737785. Pubmed Central PMCID: 3664492. Epub 2013/06/06. eng.
11. Sociedade Americana de Câncer 2013.
12. INCA. Estimativa de Câncer para o ano de 2012. 2012.
13. INCA. Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. 2014.
14. Kilfoy BA, Devesa SS, Ward MH, Zhang Y, Rosenberg PS, Holford TR, et al. Gender is an age-specific effect modifier for papillary cancers of the thyroid gland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Apr;18(4):1092-100. PubMed PMID: 19293311. Pubmed Central PMCID: 2667567. Epub 2009/03/19. eng.
15. Brito JP, Morris JC, Montori VM. TOO MUCH MEDICINE Thyroid cancer: zealous imaging has increased detection and treatment of low risk tumours. *Bmj-Brit Med J*. 2013 Aug 27;347. PubMed PMID: ISI:000323880100006. English.
16. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *Jama-J Am Med Assoc*. 2006 May 10;295(18):2164-7. PubMed PMID: ISI:000237391300026. English.
17. Ward LS, Graf H. [Thyroid cancer: increased occurrence of the disease or simply in its detection?]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008 Dec;52(9):1515-6. PubMed PMID: 19197463. Epub 2009/02/07. Cancer da tiroide: aumento na ocorrência da doença ou simplesmente na sua detecção? por.
18. Grodski S, Brown T, Sidhu S, Gill A, Robinson B, Learoyd D, et al. Increasing incidence of thyroid cancer is due to increased pathologic detection. *Surgery*. 2008 Dec;144(6):1038-43. PubMed PMID: ISI:000261581600054. English.
19. Sprague BL, Andersen SW, Trentham-Dietz A. Thyroid cancer incidence and socioeconomic indicators of health care access. *Cancer Cause Control*. 2008 Aug;19(6):585-93. PubMed PMID: ISI:000257327300005. English.
20. Enewold L, Zhu K, Ron E, Marrogi AJ, Stojadinovic A, Peoples GE, et al. Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009

Mar;18(3):784-91. PubMed PMID: 19240234. Pubmed Central PMCID: 2676561. Epub 2009/02/26. eng.

21. Albanes D. Caloric intake, body weight, and cancer: a review. *Nutr Cancer*. 1987;9(4):199-217. PubMed PMID: 3299283. Epub 1987/01/01. eng.

22. Pappa T, Alevizaki M. Obesity and Thyroid Cancer: A Clinical Update. *Thyroid*. 2013 Sep 25. PubMed PMID: 23879222. Epub 2013/07/25. Eng.

23. Dal Maso L, La Vecchia C, Franceschi S, Preston-Martin S, Ron E, Levi F, et al. A pooled analysis of thyroid cancer studies. V. Anthropometric factors. *Cancer Causes Control*. 2000 Feb;11(2):137-44. PubMed PMID: 10710197. Epub 2000/03/10. eng.

24. Franceschi S, Talamini R, Fassina A, Bidoli E. Diet and epithelial cancer of the thyroid gland. *Tumori*. 1990 Aug 31;76(4):331-8. PubMed PMID: 2205027. Epub 1990/08/31. eng.

25. Franceschi S, Levi F, Negri E, Fassina A, La Vecchia C. Diet and thyroid cancer: a pooled analysis of four European case-control studies. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1991 May 30;48(3):395-8. PubMed PMID: 2040535. Epub 1991/05/30. eng.

26. Shah SH. Imbalance diet: a risk factor for thyroid cancer. *J Pak Med Assoc*. 1999 Jun;49(6):130. PubMed PMID: 10599190. Epub 1999/12/22. eng.

27. Samanic C, Gridley G, Chow WH, Lubin J, Hoover RN, Fraumeni JF, Jr. Obesity and cancer risk among white and black United States veterans. *Cancer Causes Control*. 2004 Feb;15(1):35-43. PubMed PMID: 14970733. Epub 2004/02/19. eng.

28. Boru C, Silecchia G, Pecchia A, Iacobellis G, Greco F, Rizzello M, et al. Prevalence of cancer in Italian obese patients referred for bariatric surgery. *Obes Surg*. 2005 Sep;15(8):1171-6. PubMed PMID: 16197792. Epub 2005/10/04. eng.

29. Engeland A, Tretli S, Akslen LA, Bjorge T. Body size and thyroid cancer in two million Norwegian men and women. *Br J Cancer*. 2006 Aug 7;95(3):366-70. PubMed PMID: 16832414. Pubmed Central PMCID: 2360634. Epub 2006/07/13. eng.

30. Mijovic T, How J, Pakdaman M, Rochon L, Gologan O, Hier MP, et al. Body mass index in the evaluation of thyroid cancer risk. *Thyroid*. 2009 May;19(5):467-72. PubMed PMID: 19415996. Epub 2009/05/07. eng.
31. Brindel P, Doyon F, Rachedi F, Boissin JL, Sebbag J, Shan L, et al. Anthropometric factors in differentiated thyroid cancer in French Polynesia: a case-control study. *Cancer Causes Control*. 2009 Jul;20(5):581-90. PubMed PMID: 19043789. Epub 2008/12/02. eng.
32. Clero E, Leux C, Brindel P, Truong T, Anger A, Teinturier C, et al. Pooled analysis of two case-control studies in New Caledonia and French Polynesia of body mass index and differentiated thyroid cancer: the importance of body surface area. *Thyroid*. 2010 Nov;20(11):1285-93. PubMed PMID: 20932181. Epub 2010/10/12. eng.
33. Leitzmann MF, Brenner A, Moore SC, Koebnick C, Park Y, Hollenbeck A, et al. Prospective study of body mass index, physical activity and thyroid cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010 Jun 15;126(12):2947-56. PubMed PMID: 19795465. Pubmed Central PMCID: 2919690. Epub 2009/10/02. eng.
34. Wolin KY, Carson K, Colditz GA. Obesity and cancer. *Oncologist*. 2010;15(6):556-65. PubMed PMID: 20507889. Pubmed Central PMCID: 3227989. Epub 2010/05/29. eng.
35. Rezzonico J, Rezzonico M, Pusiol E, Pitoia F, Niepomnischcze H. Introducing the thyroid gland as another victim of the insulin resistance syndrome. *Thyroid*. 2008 Apr;18(4):461-4. PubMed PMID: 18346005. Epub 2008/03/19. eng.
36. Rezzonico JN, Rezzonico M, Pusiol E, Pitoia F, Niepomnischcze H. Increased prevalence of insulin resistance in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Metab Syndr Relat Disord*. 2009 Aug;7(4):375-80. PubMed PMID: 19320560. Epub 2009/03/27. eng.
37. Haddad FH, Malkawi OM, Omari AA, Izzat AS, Khassrof HM, Faiad LM, et al. Diabetes and infarcted papillary thyroid cancer. *Saudi Med J*. 2002 Apr;23(4):467-70. PubMed PMID: 11953778. Epub 2002/04/16. eng.

38. Akinci M, Kosova F, Cetin B, Aslan S, Ari Z, Cetin A. Leptin levels in thyroid cancer. *Asian J Surg.* 2009 Oct;32(4):216-23. PubMed PMID: 19892624. Epub 2009/11/07. eng.
39. Cheng SP, Yin PH, Chang YC, Lee CH, Huang SY, Chi CW. Differential roles of leptin in regulating cell migration in thyroid cancer cells. *Oncol Rep.* 2010 Jun;23(6):1721-7. PubMed PMID: 20428831. Epub 2010/04/30. eng.
40. Kitahara CM, Platz EA, Beane Freeman LE, Black A, Hsing AW, Linet MS, et al. Physical activity, diabetes, and thyroid cancer risk: a pooled analysis of five prospective studies. *Cancer Causes Control.* 2012 Feb 1. PubMed PMID: 22294499. Pubmed Central PMCID: 3586378. Epub 2012/02/02. Eng.
41. Kitahara CM, Platz EA, Park Y, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Berrington de Gonzalez A. Body fat distribution, weight change during adulthood, and thyroid cancer risk in the NIH-AARP Diet and Health Study. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2012 Mar 15;130(6):1411-9. PubMed PMID: 21544808. Pubmed Central PMCID: 3242922. Epub 2011/05/06. eng.
42. Kitahara CM, Platz EA, Freeman LE, Hsing AW, Linet MS, Park Y, et al. Obesity and thyroid cancer risk among U.S. men and women: a pooled analysis of five prospective studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011 Mar;20(3):464-72. PubMed PMID: 21266520. Pubmed Central PMCID: 3079276. Epub 2011/01/27. eng.
43. Rinaldi S, Lise M, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Guillas G, Overvad K, et al. Body size and risk of differentiated thyroid carcinomas: findings from the EPIC study. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2012 Sep 15;131(6):E1004-14. PubMed PMID: 22511178. Epub 2012/04/19. eng.
44. Zhao ZG, Guo XG, Ba CX, Wang W, Yang YY, Wang J, et al. Overweight, obesity and thyroid cancer risk: a meta-analysis of cohort studies. *J Int Med Res.* 2012;40(6):2041-50. PubMed PMID: 23321160. Epub 2013/01/17. eng.
45. Kim HJ, Kim NK, Choi JH, Sohn SY, Kim SW, Jin SM, et al. Associations between body mass index and clinico-pathological characteristics of papillary thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013 Jan;78(1):134-40. PubMed PMID: 22812676. Epub 2012/07/21. eng.

46. Kitahara CM, Gamborg M, Berrington de Gonzalez A, Sorensen TI, Baker JL. Childhood height and body mass index were associated with risk of adult thyroid cancer in a large cohort study. *Cancer Res.* 2014 Jan 1;74(1):235-42. PubMed PMID: 24247722. Pubmed Central PMCID: 3891884.
47. Cham S, Zanocco K, Sturgeon C, Yeh MW, Harari A. Risk-based ultrasound screening for thyroid cancer in obese patients is cost-effective. *Thyroid.* 2014 Jun;24(6):975-86. PubMed PMID: 24512476. Pubmed Central PMCID: 4046196.
48. Kim SH, Park HS, Kim KH, Yoo H, Chae BJ, Bae JS, et al. Correlation between obesity and clinicopathological factors in patients with papillary thyroid cancer. *Surgery today.* 2014 Jul 25. PubMed PMID: 25059345.
49. Tseng CH. Diabetes and thyroid cancer mortality: a 12-year prospective follow-up of Taiwanese. *Eur J Clin Invest.* 2013 Jun;43(6):595-601. PubMed PMID: 23550697. Epub 2013/04/05. eng.
50. Shih SR, Chiu WY, Chang TC, Tseng CH. Diabetes and thyroid cancer risk: literature review. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:578285. PubMed PMID: 22778714. Pubmed Central PMCID: 3384966. Epub 2012/07/11. eng.
51. Akker M, Guldiken S, Sipahi T, Palabiyik O, Tosunoglu A, Celik O, et al. Investigation of insulin resistance gene polymorphisms in patients with differentiated thyroid cancer. *Mol Biol Rep.* 2014 May;41(5):3541-7. PubMed PMID: 24504452.
52. Cheng SP, Liu CL, Hsu YC, Chang YC, Huang SY, Lee JJ. Regulation of leptin receptor expression in human papillary thyroid cancer cells. *Biomed Pharmacother.* 2012 Sep;66(6):469-73. PubMed PMID: 22560341. Epub 2012/05/09. eng.
53. Cheng SP, Liu CL, Hsu YC, Chang YC, Huang SY, Lee JJ. Expression and biologic significance of adiponectin receptors in papillary thyroid carcinoma. *Cell Biochem Biophys.* 2013 Mar;65(2):203-10. PubMed PMID: 22907586. Epub 2012/08/22. eng.
54. Di Cristofano A. Obesity and thyroid cancer: is leptin the (only) link? *Endocrinology.* 2013 Aug;154(8):2567-9. PubMed PMID: 23873767. Pubmed Central PMCID: 3713224. Epub 2013/07/23. eng.

55. Kim WG, Park JW, Willingham MC, Cheng SY. Diet-Induced Obesity Increases Tumor Growth and Promotes Anaplastic Change in Thyroid Cancer in a Mouse Model. *Endocrinology*. 2013 Aug;154(8):2936-47. PubMed PMID: ISI:000322063900037. English.
56. Kim MR, Kim SS, Huh JE, Lee BJ, Lee JC, Jeon YK, et al. Neck circumference correlates with tumor size and lateral lymph node metastasis in men with small papillary thyroid carcinoma. *Korean J Intern Med*. 2013 Jan;28(1):62-71. PubMed PMID: 23345998. Pubmed Central PMCID: 3543962. Epub 2013/01/25. eng.
57. Kitahara CM, Neta G, Pfeiffer RM, Kwon D, Xu L, Freedman ND, et al. Common obesity-related genetic variants and papillary thyroid cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Dec;21(12):2268-71. PubMed PMID: 23064004. Pubmed Central PMCID: 3518668. Epub 2012/10/16. eng.
58. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. 2004 Sep;92(3):347-55. PubMed PMID: 15469638. Epub 2004/10/08. eng.
59. Fruhbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J*. 2006 Jan 1;393(Pt 1):7-20. PubMed PMID: 16336196. Pubmed Central PMCID: 1383660.
60. Schaffler A, Scholmerich J. Innate immunity and adipose tissue biology. *Trends in immunology*. 2010 Jun;31(6):228-35. PubMed PMID: 20434953.
61. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1796-808. PubMed PMID: 14679176. Pubmed Central PMCID: 296995.
62. Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008 Jul;28(7):1304-10. PubMed PMID: 18420999.
63. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology*. 2005 Dec;5(12):953-64. PubMed PMID: 16322748.

64. Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Rodriguez A, Fruhbeck G. Adipose tissue immunity and cancer. *Front Physiol.* 2013;4:275. PubMed PMID: 24106481. Pubmed Central PMCID: 3788329. Epub 2013/10/10. Eng.
65. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature.* 1987 Oct 15-21;329(6140):630-2. PubMed PMID: 2443857.
66. Liu Z, Brooks RS, Ciappio ED, Kim SJ, Crott JW, Bennett G, et al. Diet-induced obesity elevates colonic TNF-alpha in mice and is accompanied by an activation of Wnt signaling: a mechanism for obesity-associated colorectal cancer. *J Nutr Biochem.* 2012 Oct;23(10):1207-13. PubMed PMID: 22209007.
67. Pang XP, Yoshimura M, Wang J, Dubinett SM. TNF-alpha-induced antiproliferation is not dependent on the autocrine action of TGF-beta 1 in a thyroid cancer cell line. *Lymphokine and cytokine research.* 1994 Apr;13(2):93-7. PubMed PMID: 8061120.
68. Pang XP, Ross NS, Hershman JM. Alterations in TNF-alpha signal transduction in resistant human papillary thyroid carcinoma cells. *Thyroid.* 1996 Aug;6(4):313-7. PubMed PMID: 8875753.
69. Ghosh S, Ashcraft K. An IL-6 link between obesity and cancer. *Frontiers in bioscience.* 2013;5:461-78. PubMed PMID: 23277002.
70. Couto JP, Daly L, Almeida A, Knauf JA, Fagin JA, Sobrinho-Simoes M, et al. STAT3 negatively regulates thyroid tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2012 Aug 28;109(35):E2361-70. PubMed PMID: 22891351. Pubmed Central PMCID: 3435219.
71. Chang JW, Yeh KY, Shen YC, Hsieh JJ, Chuang CK, Liao SK, et al. Production of multiple cytokines and induction of cachexia in athymic nude mice by a new anaplastic thyroid carcinoma cell line. *J Endocrinol.* 2003 Dec;179(3):387-94. PubMed PMID: 14656208.
72. Lumachi F, Basso SM, Orlando R. Cytokines, thyroid diseases and thyroid cancer. *Cytokine.* 2010 Jun;50(3):229-33. PubMed PMID: 20381375.

73. Cunha LL, Marcello MA, Ward LS. The role of the inflammatory microenvironment in thyroid carcinogenesis. *Endocr Relat Cancer*. 2013 Dec 3. PubMed PMID: 24302667.
74. Souza SL, Montalli Da Assumpcao LV, Ward LS. Impact of previous thyroid autoimmune diseases on prognosis of patients with well-differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2003 May;13(5):491-5. PubMed PMID: 12855017. Epub 2003/07/12. eng.
75. Dailey ME, Lindsay S, Skahen R. Relation of thyroid neoplasms to Hashimoto disease of the thyroid gland. *AMA archives of surgery*. 1955 Feb;70(2):291-7. PubMed PMID: 13227748.
76. Hirabayashi RN, Lindsay S. The Relation of Thyroid Carcinoma and Chronic Thyroiditis. *Surg Gynecol Obstet*. 1965 Aug;121:243-52. PubMed PMID: 14320370. Epub 1965/08/01. eng.
77. Holm LE, Blomgren H, Lowhagen T. Cancer risks in patients with chronic lymphocytic thyroiditis. *N Engl J Med*. 1985 Mar 7;312(10):601-4. PubMed PMID: 3838363.
78. Kashima K, Yokoyama S, Noguchi S, Murakami N, Yamashita H, Watanabe S, et al. Chronic thyroiditis as a favorable prognostic factor in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 1998 Mar;8(3):197-202. PubMed PMID: 9545105.
79. Singh B, Shaha AR, Trivedi H, Carew JF, Poluri A, Shah JP. Coexistent Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma: impact on presentation, management, and outcome. *Surgery*. 1999 Dec;126(6):1070-6; discussion 6-7. PubMed PMID: 10598190. Epub 1999/12/22. eng.
80. Gupta S, Patel A, Folstad A, Fenton C, Dinauer CA, Tuttle RM, et al. Infiltration of differentiated thyroid carcinoma by proliferating lymphocytes is associated with improved disease-free survival for children and young adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Mar;86(3):1346-54. PubMed PMID: 11238531.
81. Loh KC, Greenspan FS, Dong F, Miller TR, Yeo PP. Influence of lymphocytic thyroiditis on the prognostic outcome of patients with papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Feb;84(2):458-63. PubMed PMID: 10022401.

82. Schaffler A, Palitzsch KD, Seiffarth C, Hohne HM, Riedhammer FJ, Hofstadter F, et al. Coexistent thyroiditis is associated with lower tumour stage in thyroid carcinoma. *Eur J Clin Invest*. 1998 Oct;28(10):838-44. PubMed PMID: 9792998. Epub 1998/10/30. eng.
83. Ramos AM, Sales Ade O, Barbalho de Mello LE, Cirino de Andrade M, Pinto Paiva F, Ramos CC, et al. Absence of peritumoral fibrosis or inflammatory infiltrate may be related to clinical progression of papillary thyroid microcarcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2009 Dec;17(6):432-7. PubMed PMID: 19403545. Epub 2009/05/01. eng.
84. Cunha LL, Morari EC, Guihen AC, Razolli D, Gerhard R, Nonogaki S, et al. Infiltration of a mixture of immune cells may be related to good prognosis in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012 Dec;77(6):918-25. PubMed PMID: 22738343.
85. Cunha LL, Morari EC, Guihen AC, Razolli D, Gerhard R, Nonogaki S, et al. Infiltration of a mixture of different immune cells may be related to molecular profile of differentiated thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*. 2012 Jun;19(3):L31-6. PubMed PMID: 22461634.
86. Santos LA. Avaliação Nutricional de Pacientes Obesos antes e seis meses após a cirurgia bariátrica. Belo Horizonte: UFMG; 2007.
87. Mafrá DFNE. O Papel do Tecido Adiposo na Doença Renal Crônica. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 2006;26(2):108-13.
88. Kwon H, Pessin JE. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:71. PubMed PMID: 23781214. Pubmed Central PMCID: 3679475. Epub 2013/06/20. eng.
89. Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2009 Jul 8;302(2):179-88. PubMed PMID: 19584347. Epub 2009/07/09. eng.
90. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood*. 2000 Sep 1;96(5):1723-32. PubMed PMID: 10961870. Epub 2000/08/29. eng.

91. Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K, et al. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation*. 2004 May 4;109(17):2046-9. PubMed PMID: ISI:000221173900002. English.
92. Takemura Y, Ouchi N, Shibata R, Aprahamian T, Kirber MT, Summer RS, et al. Adiponectin modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor-dependent clearance of early apoptotic bodies. *J Clin Invest*. 2007 Feb;117(2):375-86. PubMed PMID: ISI:000244051500017. English.
93. Hall J, Roberts R, Vora N. Energy homeostasis: The roles of adipose tissue-derived hormones, peptide YY and Ghrelin. *Obes Facts*. 2009;2(2):117-25. PubMed PMID: 20054215. Epub 2010/01/08. eng.
94. Obeid S, Hebbard L. Role of adiponectin and its receptors in cancer. *Cancer Biol Med*. 2012 Dec;9(4):213-20. PubMed PMID: 23691481. Pubmed Central PMCID: 3643674. Epub 2013/05/22. eng.
95. Mitsiades N, Pazaitou-Panayiotou K, Aronis KN, Moon HS, Chamberland JP, Liu X, et al. Circulating Adiponectin Is Inversely Associated with Risk of Thyroid Cancer: In Vivo and in Vitro Studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Sep 21. PubMed PMID: 21937620. Epub 2011/09/23. Eng.
96. Liao WL, Chen CC, Chang CT, Wu JY, Chen CH, Huang YC, et al. Gene polymorphisms of adiponectin and leptin receptor are associated with early onset of type 2 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Int J Obes (Lond)*. 2011 Sep 20. PubMed PMID: 21931325. Epub 2011/09/21. Eng.
97. Yu Z, Han S, Cao X, Zhu C, Wang X, Guo X. Genetic Polymorphisms in Adipokine Genes and the Risk of Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Jun 9. PubMed PMID: 21660081. Epub 2011/06/11. Eng.
98. Lau CH, Muniandy S. Adiponectin and resistin gene polymorphisms in association with their respective adipokine levels. *Ann Hum Genet*. 2011 May;75(3):370-82. PubMed PMID: 21323646. Epub 2011/02/18. eng.
99. Wang C, Mao X, Wang L, Liu M, Wetzel MD, Guan KL, et al. Adiponectin sensitizes insulin signaling by reducing p70 S6 kinase-mediated serine

phosphorylation of IRS-1. J Biol Chem. 2007 Mar 16;282(11):7991-6. PubMed PMID: 17244624.

100. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. Endocrinology. 2000 Nov;141(11):4255-61. PubMed PMID: 11089560. Epub 2000/11/23. eng.

101. Gualillo O, Caminos J, Blanco M, Garcia-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, et al. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. Endocrinology. 2001 Feb;142(2):788-94. PubMed PMID: 11159851. Epub 2001/02/13. eng.

102. Papotti M, Ghe C, Cassoni P, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, et al. Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. J Clin Endocrinol Metab. 2000 Oct;85(10):3803-7. PubMed PMID: 11061542. Epub 2000/11/04. eng.

103. Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, Feighner SD, Cheng K, Hickey GJ, et al. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. Endocr Rev. 1997 Oct;18(5):621-45. PubMed PMID: 9331545. Epub 1997/10/23 22:24. eng.

104. Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. Diabetes. 2001 Nov;50(11):2438-43. PubMed PMID: 11679419. Epub 2001/10/27. eng.

105. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, et al. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Oct 5;276(3):905-8. PubMed PMID: 11027567. Epub 2000/10/12. eng.

106. Arvat E, Di Vito L, Broglio F, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, et al. Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. J Endocrinol Invest. 2000 Sep;23(8):493-5. PubMed PMID: 11021763. Epub 2000/10/06. eng.

107. Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. Nature. 2000 Oct 19;407(6806):908-13. PubMed PMID: 11057670. Epub 2000/11/01. eng.

108. Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, et al. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001 May;280(5):R1483-7. PubMed PMID: 11294772. Epub 2001/04/11. eng.
109. Cassoni P, Papotti M, Ghe C, Catapano F, Sapino A, Graziani A, et al. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Apr;86(4):1738-45. PubMed PMID: 11297611. Epub 2001/04/12. eng.
110. Chopin L, Walpole C, Seim I, Cunningham P, Murray R, Whiteside E, et al. Ghrelin and cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Jun 20;340(1):65-9. PubMed PMID: 21616120. Epub 2011/05/28. eng.
111. Fung JN, Seim I, Wang D, Obermair A, Chopin LK, Chen C. Expression and in vitro functions of the ghrelin axis in endometrial cancer. *Horm Cancer*. 2010 Oct;1(5):245-55. PubMed PMID: 21761369. Epub 2011/07/16. eng.
112. Gioulbasanis I, Georgoulas P, Vlachostergios PJ, Baracos V, Ghosh S, Giannousi Z, et al. Mini Nutritional Assessment (MNA) and biochemical markers of cachexia in metastatic lung cancer patients: Interrelations and associations with prognosis. *Lung Cancer*. 2011 May 30. PubMed PMID: 21632145. Epub 2011/06/03. Eng.
113. Pabalan N, Seim I, Jarjanazi H, Chopin LK. Associations between ghrelin and ghrelin receptor polymorphisms and cancer in Caucasian populations: a meta-analysis. *BMC genetics*. 2014 Nov 7;15(1):118. PubMed PMID: 25376984. Pubmed Central PMCID: 4228186.
114. Garcia EA, King P, Sidhu K, Ohgusu H, Walley A, Lecoecur C, et al. The role of ghrelin and ghrelin-receptor gene variants and promoter activity in type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol*. 2009 Aug;161(2):307-15. PubMed PMID: 19460888. Epub 2009/05/23. eng.
115. Korbonits M, Gueorguiev M, O'Grady E, Lecoecur C, Swan DC, Mein CA, et al. A variation in the ghrelin gene increases weight and decreases insulin secretion

in tall, obese children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Aug;87(8):4005-8. PubMed PMID: 12161552. Epub 2002/08/06. eng.

116. Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P, Perusse L, Rankinen T, Tschop M, et al. Role of ghrelin polymorphisms in obesity based on three different studies. *Obes Res.* 2002 Aug;10(8):782-91. PubMed PMID: 12181387. Epub 2002/08/16. eng.

117. Poykko S, Ukkola O, Kauma H, Savolainen MJ, Kesaniemi YA. Ghrelin Arg51Gln mutation is a risk factor for Type 2 diabetes and hypertension in a random sample of middle-aged subjects. *Diabetologia.* 2003 Apr;46(4):455-8. PubMed PMID: 12739020. Epub 2003/05/10. eng.

118. Poykko SM, Kellokoski E, Horkko S, Kauma H, Kesaniemi YA, Ukkola O. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003 Oct;52(10):2546-53. PubMed PMID: 14514639. Epub 2003/09/30. eng.

119. Baessler A, Hasinoff MJ, Fischer M, Reinhard W, Sonnenberg GE, Olivier M, et al. Genetic linkage and association of the growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) gene in human obesity. *Diabetes.* 2005 Jan;54(1):259-67. PubMed PMID: 15616037. Pubmed Central PMCID: 2793077. Epub 2004/12/24. eng.

120. Mager U, Lindi V, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, et al. Association of the Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene with the risk of Type 2 diabetes in subjects with impaired glucose tolerance in the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabet Med.* 2006 Jun;23(6):685-9. PubMed PMID: 16759313. Epub 2006/06/09. eng.

121. Granata R, Baragli A, Settanni F, Scarlatti F, Ghigo E. Unraveling the role of the ghrelin gene peptides in the endocrine pancreas. *Journal of molecular endocrinology.* 2010 Sep;45(3):107-18. PubMed PMID: 20595321.

122. Piya MK, McTernan PG, Kumar S. Adipokine inflammation and insulin resistance: the role of glucose, lipids and endotoxin. *J Endocrinol.* 2013 Jan;216(1):T1-T15. PubMed PMID: 23160966. Epub 2012/11/20. eng.

123. Surmacz E. Leptin and adiponectin: emerging therapeutic targets in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2013 Dec;18(3-4):321-32. PubMed PMID: 24136336. Epub 2013/10/19. eng.

124. Vansaun MN. Molecular pathways: adiponectin and leptin signaling in cancer. Clin Cancer Res. 2013 Apr 15;19(8):1926-32. PubMed PMID: 23355630. Pubmed Central PMCID: 3630242. Epub 2013/01/29. eng.
125. Dutta D, Ghosh S, Pandit K, Mukhopadhyay P, Chowdhury S. Leptin and cancer: Pathogenesis and modulation. Indian J Endocrinol Metab. 2012 Dec;16(Suppl 3):S596-600. PubMed PMID: 23565495. Pubmed Central PMCID: 3602989. Epub 2013/04/09. eng.
126. Cheng SP, Chi CW, Tzen CY, Yang TL, Lee JJ, Liu TP, et al. Clinicopathologic significance of leptin and leptin receptor expressions in papillary thyroid carcinoma. Surgery. 2010 Jun;147(6):847-53. PubMed PMID: 20045163. Epub 2010/01/05. eng.
127. Zhang GA, Hou S, Han S, Zhou J, Wang X, Cui W. Clinicopathological implications of leptin and leptin receptor expression in papillary thyroid cancer. Oncol Lett. 2013 Mar;5(3):797-800. PubMed PMID: 23425972. Pubmed Central PMCID: 3576217. Epub 2013/02/22. Eng.
128. Cheng SP, Yin PH, Hsu YC, Chang YC, Huang SY, Lee JJ, et al. Leptin enhances migration of human papillary thyroid cancer cells through the PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways. Oncol Rep. 2011 Nov;26(5):1265-71. PubMed PMID: ISI:000295389600030. English.
129. Cheng SP, Yin PH, Chang YC, Lee CH, Huang SY, Chi CW. Differential roles of leptin in regulating cell migration in thyroid cancer cells. Oncol Rep. 2010 Jun;23(6):1721-7. PubMed PMID: ISI:000277526800031. English.
130. Rehem RA, Elwafa WA, Elwafa RA, Abdel-Aziz TE. Study of serum leptin in well-differentiated thyroid carcinoma: correlation with patient and tumor characteristics. World journal of surgery. 2014 Oct;38(10):2621-7. PubMed PMID: 24867470. Pubmed Central PMCID: 4161936.
131. Steppan CM, Wang J, Whiteman EL, Birnbaum MJ, Lazar MA. Activation of SOCS-3 by resistin. Mol Cell Biol. 2005 Feb;25(4):1569-75. PubMed PMID: ISI:000226908000030. English.

132. Hlavna M, Kohut L, Lipkova J, Bienertova-Vasku J, Dostalova Z, Chovanec J, et al. Relationship of resistin levels with endometrial cancer risk. *Neoplasma*. 2011;58(2):124-8. PubMed PMID: 21275461. Epub 2011/02/01. eng.
133. Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol*. 2005 May 1;174(9):5789-95. PubMed PMID: 15843582. Epub 2005/04/22. eng.
134. Benomar Y, Gertler A, De Lacy P, Crepin D, Hamouda HO, Riffault L, et al. Central Resistin Overexposure Induces Insulin Resistance Through Toll-Like Receptor 4. *Diabetes*. 2013 Jan;62(1):102-14. PubMed PMID: ISI:000312824700020. English.
135. Kim HJ, Lee YS, Won EH, Chang IH, Kim TH, Park ES, et al. Expression of resistin in the prostate and its stimulatory effect on prostate cancer cell proliferation. *BJU Int*. 2011 Jul;108(2 Pt 2):E77-83. PubMed PMID: 21050358. Epub 2010/11/06. eng.
136. Stewart PA, Luks J, Roycik MD, Sang QX, Zhang J. Differentially expressed transcripts and dysregulated signaling pathways and networks in african american breast cancer. *PLoS One*. 2013;8(12):e82460. PubMed PMID: 24324792. Epub 2013/12/11. eng.
137. Kuo CH, Chen KF, Chou SH, Huang YF, Wu CY, Cheng DE, et al. Lung tumor-associated dendritic cell-derived resistin promoted cancer progression by increasing Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1/Twist pathway. *Carcinogenesis*. 2013 Nov;34(11):2600-9. PubMed PMID: 23955539. Epub 2013/08/21. eng.
138. Duan XF, Tang P, Li Q, Yu ZT. Obesity, adipokines and hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*. 2013 Oct 15;133(8):1776-83. PubMed PMID: ISI:000322908600002. English.
139. Dalamaga M, Sotiropoulos G, Karmaniolas K, Pelekanos N, Papadavid E, Lekka A. Serum resistin: A biomarker of breast cancer in postmenopausal women? Association with clinicopathological characteristics, tumor markers, inflammatory and metabolic parameters. *Clin Biochem*. 2013 May;46(7-8):584-90. PubMed PMID: ISI:000317878100005. English.

140. Jiang CY, Wang W, Yin YL, Yuan ZR, Wang LB. Expression of the adipocytokine resistin and its association with the clinicopathological features and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncology Letters*. 2012 Nov;4(5):960-4. PubMed PMID: ISI:000310040300021. English.
141. Filkova M, Haluzik M, Gay S, Senolt L. The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clinical immunology*. 2009 Nov;133(2):157-70. PubMed PMID: 19740705.
142. Garrow JS, Webster J. Quetelet's index (W/H²) as a measure of fatness. *Int J Obes*. 1985;9(2):147-53. PubMed PMID: 4030199. Epub 1985/01/01. eng.
143. WHO. Measuring obesity: classification and distribution of anthropometric data. Copenhagen: Nutr UD, EUR/ICP/NUT 125; 1989.
144. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obes Res*. 1998 Sep;6 Suppl 2:51S-209S. PubMed PMID: 9813653. Epub 1998/11/14. eng.
145. Nascimento S, Barbosa FS, Sichieri R, Pereira RA. Dietary availability patterns of the Brazilian macro-regions. *Nutr J*. 2011;10:79. PubMed PMID: 21798035. Pubmed Central PMCID: 3171307. Epub 2011/07/30. eng.
146. Marcello MA, Sampaio AC, Geloneze B, Vasques AC, Assumpcao LV, Ward LS. Obesity and excess protein and carbohydrate consumption are risk factors for thyroid cancer. *Nutrition and cancer*. 2012;64(8):1190-5. PubMed PMID: 23163848.
147. Ekpechi OL, Dimitriadou A, Fraser R. Goitrogenic activity of cassava (a staple Nigerian food). *Nature*. 1966 Jun 11;210(5041):1137-8. PubMed PMID: 5964173. Epub 1966/06/11. eng.
148. Ermans AM, Delange F, Van der Velden M, Kinthaert J. Goitrogenic action of cyanogenic glucosides present in cassava: a possible etiologic factor of endemic goiter in the Idjwi island. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*. 1973 Oct;179:31. PubMed PMID: 4523769. Epub 1973/10/01. eng.
149. IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE: Coordenação de Trabalho e Rendimento; 2011. 150 p.

150. Romieu I, Lazcano-Ponce E, Sanchez-Zamorano LM, Willett W, Hernandez-Avila M. Carbohydrates and the risk of breast cancer among Mexican women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Aug;13(8):1283-9. PubMed PMID: 15298947. Epub 2004/08/10. eng.
151. Murtaugh MA, Herrick J, Sweeney C, Guiliano A, Baumgartner K, Byers T, et al. Macronutrient composition influence on breast cancer risk in Hispanic and non-Hispanic white women: the 4-Corners Breast Cancer Study. *Nutr Cancer.* 2011;63(2):185-95. PubMed PMID: 21271459. Epub 2011/01/29. eng.
152. Bidoli E, Talamini R, Bosetti C, Negri E, Maruzzi D, Montella M, et al. Macronutrients, fatty acids, cholesterol and prostate cancer risk. *Ann Oncol.* 2005 Jan;16(1):152-7. PubMed PMID: 15598953. Epub 2004/12/16. eng.
153. Sun Z, Liu L, Wang PP, Roebathan B, Zhao J, Dicks E, et al. Association of total energy intake and macronutrient consumption with colorectal cancer risk: results from a large population-based case-control study in Newfoundland and Labrador and Ontario, Canada. *Nutr J.* 2012 Mar 26;11(1):18. PubMed PMID: 22449145. Epub 2012/03/28. Eng.
154. Rezzonico J, Rezzonico M, Pusiol E, Pitoia F, Niepomnische H. High prevalence of thyroid nodules in patients with achrocordons (skin tags). Possible role of insulin-resistance. *Medicina (B Aires).* 2009;69(3):302-4. PubMed PMID: 19622476. Epub 2009/07/23. eng.
155. Bartholomeusz C, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2012 Jan;16(1):121-30. PubMed PMID: 22239433. Epub 2012/01/14. eng.
156. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol.* 2011 Oct;7(10):569-80. PubMed PMID: 21878896. Epub 2011/09/01. eng.
157. Gomez Saez JM. Diagnostic and prognostic markers in differentiated thyroid cancer. *Curr Genomics.* 2011 Dec;12(8):597-608. PubMed PMID: 22654559. Pubmed Central PMCID: 3271312. Epub 2012/06/02. eng.

158. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. A report of the WHO Study Group on Diet, Nutrition and Prevention of Noncommunicable Diseases. *Nutr Rev.* 1991 Oct;49(10):291-301. PubMed PMID: 1749527. Epub 1991/10/01. eng.
159. Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1990;797:1-204. PubMed PMID: 2124402. Epub 1990/01/01. eng.
160. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2003;916:i-viii, 1-149, backcover. PubMed PMID: 12768890. Epub 2003/05/29. eng.
161. Truong T, Baron-Dubourdieu D, Rougier Y, Guenel P. Role of dietary iodine and cruciferous vegetables in thyroid cancer: a countrywide case-control study in New Caledonia. *Cancer Causes Control.* 2010 Aug;21(8):1183-92. PubMed PMID: 20361352. Epub 2010/04/03. eng.
162. Bosetti C, Kolonel L, Negri E, Ron E, Franceschi S, Dal Maso L, et al. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. VI. Fish and shellfish consumption. *Cancer Causes Control.* 2001 May;12(4):375-82. PubMed PMID: 11456234. Epub 2001/07/18. eng.
163. Allen NE, Appleby PN, Key TJ, Bueno-de-Mesquita HB, Ros MM, Kiemeneys LA, et al. Macronutrient intake and risk of urothelial cell carcinoma in the European investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer.* 2012 May 23. PubMed PMID: 22618737. Epub 2012/05/24. Eng.
164. Crowe FL, Key TJ, Allen NE, Appleby PN, Roddam A, Overvad K, et al. The association between diet and serum concentrations of IGF-I, IGFBP-1, IGFBP-2, and IGFBP-3 in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 May;18(5):1333-40. PubMed PMID: 19423514. Epub 2009/05/09. eng.
165. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam AW. Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. *Lancet Oncol.* 2010 Jun;11(6):530-42. PubMed PMID: 20472501. Pubmed Central PMCID: 3113287. Epub 2010/05/18. eng.

166. Roddam AW, Allen NE, Appleby P, Key TJ, Ferrucci L, Carter HB, et al. Insulin-like growth factors, their binding proteins, and prostate cancer risk: analysis of individual patient data from 12 prospective studies. *Ann Intern Med*. 2008 Oct 7;149(7):461-71, W83-8. PubMed PMID: 18838726. Pubmed Central PMCID: 2584869. Epub 2008/10/08. eng.
167. Rinaldi S, Cleveland R, Norat T, Biessy C, Rohrmann S, Linseisen J, et al. Serum levels of IGF-I, IGFBP-3 and colorectal cancer risk: results from the EPIC cohort, plus a meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer*. 2010 Apr 1;126(7):1702-15. PubMed PMID: 19810099. Epub 2009/10/08. eng.
168. Lee SW, Lee SY, Lee SR, Ju W, Kim SC. Plasma levels of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 in women with cervical neoplasia. *J Gynecol Oncol*. 2010 Sep;21(3):174-80. PubMed PMID: 20922140. Pubmed Central PMCID: 2948225. Epub 2010/10/06. eng.
169. Ho GY, Wang T, Gunter MJ, Strickler HD, Cushman M, Kaplan RC, et al. Adipokines linking obesity with colorectal cancer risk in postmenopausal women. *Cancer Res*. 2012 Jun 15;72(12):3029-37. PubMed PMID: 22511581. Epub 2012/04/19. eng.
170. Gulen ST, Karadag F, Karul AB, Kilicarslan N, Ceylan E, Kuman NK, et al. Adipokines and systemic inflammation in weight-losing lung cancer patients. *Lung*. 2012 Jun;190(3):327-32. PubMed PMID: 22246553. Epub 2012/01/17. eng.
171. Murphy G, Kamangar F, Albanes D, Stanczyk FZ, Weinstein SJ, Taylor PR, et al. Serum ghrelin is inversely associated with risk of subsequent oesophageal squamous cell carcinoma. *Gut*. 2012 Nov;61(11):1533-7. PubMed PMID: 22180062. Pubmed Central PMCID: 3462270. Epub 2011/12/20. eng.
172. Macis D, Gandini S, Guerrieri-Gonzaga A, Johansson H, Magni P, Ruscica M, et al. Prognostic effect of circulating adiponectin in a randomized 2 x 2 trial of low-dose tamoxifen and fenretinide in premenopausal women at risk for breast cancer. *J Clin Oncol*. 2012 Jan 10;30(2):151-7. PubMed PMID: 22162577. Pubmed Central PMCID: 3255561. Epub 2011/12/14. eng.
173. Nishimura K, Soda T, Nakazawa S, Yamanaka K, Hirai T, Kishikawa H, et al. Serum adiponectin and leptin levels are useful markers for prostate cancer screening

- after adjustments for age, obesity-related factors, and prostate volume. *Minerva Urol Nefrol.* 2012 Sep;64(3):199-208. PubMed PMID: 22971685. Epub 2012/09/14. eng.
174. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006 Oct;6(10):772-83. PubMed PMID: 16998510. Epub 2006/09/26. eng.
175. Murphy G, Kamangar F, Dawsey SM, Stanczyk FZ, Weinstein SJ, Taylor PR, et al. The relationship between serum ghrelin and the risk of gastric and esophagogastric junctional adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Jul 20;103(14):1123-9. PubMed PMID: 21693726. Pubmed Central PMCID: 3139586. Epub 2011/06/23. eng.
176. Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, Collins GD, Sakthivel SK, Palaniappan R, et al. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest.* 2004 Jul;114(1):57-66. PubMed PMID: 15232612. Pubmed Central PMCID: 437970. Epub 2004/07/03. eng.
177. Lucas A, Granada ML, Olaizola I, Castell C, Julian MT, Pellitero S, et al. Leptin and thyrotropin relationship is modulated by smoking status in euthyroid subjects. *Thyroid.* 2013 Aug;23(8):964-70. PubMed PMID: 23528137.
178. Duntas LH, Biondi B. The Interconnections Between Obesity, Thyroid Function, and Autoimmunity: The Multifold Role of Leptin. *Thyroid.* 2013 Jun;23(6):646-53. PubMed PMID: ISI:000320032500002. English.
179. Marzullo P, Minocci A, Tagliaferri MA, Guzzaloni G, Di Blasio A, De Medici C, et al. Investigations of Thyroid Hormones and Antibodies in Obesity: Leptin Levels Are Associated with Thyroid Autoimmunity Independent of Bioanthropometric, Hormonal, and Weight-Related Determinants. *J Clin Endocr Metab.* 2010 Aug;95(8):3965-72. PubMed PMID: ISI:000280652400056. English.
180. Guzel S, Seven A, Guzel EC, Buyuk B, Celebi A, Aydemir B. Visfatin, Leptin, and TNF-alpha: Interrelated Adipokines in Insulin-Resistant Clinical and Subclinical Hypothyroidism. *Endocr Res.* 2013 Jan 16. PubMed PMID: 23324036. Epub 2013/01/18. Eng.
181. Jiang Y, Wilk JB, Borecki I, Williamson S, DeStefano AL, Xu G, et al. Common variants in the 5' region of the leptin gene are associated with body mass index in

- men from the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *American journal of human genetics*. 2004 Aug;75(2):220-30. PubMed PMID: 15197684. Pubmed Central PMCID: 1216056.
182. Mammes O, Betoulle D, Aubert R, Herbeth B, Siest G, Fumeron F. Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the LEP gene with overweight. *Ann Hum Genet*. 2000 Sep;64(Pt 5):391-4. PubMed PMID: 11281277. Epub 2001/04/03. eng.
183. Portoles O, Sorli JV, Frances F, Coltell O, Gonzalez JI, Saiz C, et al. Effect of genetic variation in the leptin gene promoter and the leptin receptor gene on obesity risk in a population-based case-control study in Spain. *Eur J Epidemiol*. 2006;21(8):605-12. PubMed PMID: 17031518. Epub 2006/10/13. eng.
184. He J, Xu G. LEP gene variant is associated with prostate cancer but not with colorectal cancer. *Tumour Biol*. 2013 Jun 11. PubMed PMID: 23754448. Epub 2013/06/12. Eng.
185. Liu C, Liu L. Polymorphisms in three obesity-related genes (LEP, LEPR, and PON1) and breast cancer risk: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2011 Dec;32(6):1233-40. PubMed PMID: 21887553. Epub 2011/09/03. eng.
186. Landgren S, Jerlhag E, Zetterberg H, Gonzalez-Quintela A, Campos J, Olofsson U, et al. Association of pro-ghrelin and GHS-R1A gene polymorphisms and haplotypes with heavy alcohol use and body mass. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2008 Dec;32(12):2054-61. PubMed PMID: 18828808.
187. Landgren S, Jerlhag E, Hallman J, Orelan L, Lissner L, Strandhagen E, et al. Genetic variation of the ghrelin signaling system in females with severe alcohol dependence. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2010 Sep 1;34(9):1519-24. PubMed PMID: 20586762.
188. Cassoni P, Ghe C, Marrocco T, Tarabra E, Allia E, Catapano F, et al. Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. *Eur J Endocrinol*. 2004 Feb;150(2):173-84. PubMed PMID: 14763915.

189. Lanfranco F, Baldi M, Cassoni P, Bosco M, Ghe C, Muccioli G. Ghrelin and prostate cancer. *Vitamins and hormones*. 2008;77:301-24. PubMed PMID: 17983862.
190. Hoffstedt J, Eriksson P, Mottagui-Tabar S, Arner P. A polymorphism in the leptin promoter region (-2548 G/A) influences gene expression and adipose tissue secretion of leptin. *Horm Metab Res*. 2002 Jul;34(7):355-9. PubMed PMID: 12189581. Epub 2002/08/22. eng.
191. Murugesan D, Arunachalam T, Ramamurthy V, Subramanian S. Association of polymorphisms in leptin receptor gene with obesity and type 2 diabetes in the local population of Coimbatore. *Indian J Hum Genet*. 2010 May;16(2):72-7. PubMed PMID: 21031055. Pubmed Central PMCID: 2955955. Epub 2010/10/30. eng.
192. Quinton ND, Lee AJ, Ross RJM, Eastell R, Blakemore AIF. A single nucleotide polymorphism (SNP) in the leptin receptor is associated with BMI, fat mass and leptin levels in postmenopausal Caucasian women. *Human Genetics*. 2001 Mar;108(3):233-6. PubMed PMID: ISI:000168063800011. English.
193. Mattevi VS, Zembruski VM, Hutz MH. Association analysis of genes involved in the leptin-signaling pathway with obesity in Brazil. *Int J Obesity*. 2002 Sep;26(9):1179-85. PubMed PMID: ISI:000177835600005. English.
194. Yiannakouris N, Yannakoulia M, Melistas L, Chan JL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS. The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage of body weight and body composition variability. *J Clin Endocr Metab*. 2001 Sep;86(9):4434-9. PubMed PMID: ISI:000170951600062. English.
195. Stefan N, Vozarova B, Del Parigi A, Ossowski V, Thompson DB, Hanson RL, et al. The Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor in Pima Indians: influence on energy expenditure, physical activity and lipid metabolism. *Int J Obesity*. 2002 Dec;26(12):1629-32. PubMed PMID: ISI:000179866500013. English.
196. Chiu KC, Chu A, Chuang LM, Saad MF. Association of leptin receptor polymorphism with insulin resistance. *European Journal of Endocrinology*. 2004 May;150(5):725-9. PubMed PMID: ISI:000221793100017. English.

197. Chu A, Chuang LM, Saad M, Chiu K. Association of the Q223R polymorphism of the leptin receptor gene with insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes*. 2003 Jun;52:A510-A. PubMed PMID: ISI:000183173802179. English.
198. Duarte SFP, Francischetti EA, Genelhu-Abreu V, Barroso SG, Braga JU, Cabello PH, et al. p.Q223R leptin receptor polymorphism associated with obesity in Brazilian multiethnic subjects. *Am J Hum Biol*. 2006 Jul-Aug;18(4):448-53. PubMed PMID: ISI:000238624100002. English.
199. Wauters M, Mertens I, Chagnon M, Rankinen T, Considine RV, Chagnon YC, et al. Polymorphisms in the leptin receptor gene, body composition and fat distribution in overweight and obese women. *Int J Obesity*. 2001 May;25(5):714-20. PubMed PMID: ISI:000168294900017. English.
200. Ogawa T, Hirose H, Yamamoto Y, Nishikai K, Miyashita K, Nakamura H, et al. Relationships between serum soluble leptin receptor level and serum leptin and adiponectin levels, insulin resistance index, lipid profile, and leptin receptor gene polymorphisms in the Japanese population. *Metabolism*. 2004 Jul;53(7):879-85. PubMed PMID: ISI:000222912400010. English.
201. Fairbrother UL, Tanko LB, Walley AJ, Christiansen C, Froguel P, Blakemore AIF. Leptin receptor genotype at Gln223Arg is associated with body composition, BMD, and vertebral fracture in postmenopausal Danish women. *J Bone Miner Res*. 2007 Apr;22(4):544-50. PubMed PMID: ISI:000245234000008. English.
202. Salopuro T, Pulkkinen L, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, et al. Genetic variation in leptin receptor gene is associated with type 2 diabetes and body weight: The Finnish Diabetes Prevention Study. *Int J Obesity*. 2005 Oct;29(10):1245-51. PubMed PMID: ISI:000231790100013. English.
203. Wauters M, Mertens I, Rankinen T, Chagnon M, Bouchard C, Van Gaal L. Leptin receptor gene polymorphisms are associated with insulin in obese women with impaired glucose tolerance. *J Clin Endocr Metab*. 2001 Jul;86(7):3227-32. PubMed PMID: ISI:000169838300052. English.
204. Park KS, Shin HD, Park BL, Cheong HS, Cho YM, Lee HK, et al. Polymorphisms in the leptin receptor (LEPR) - putative association with obesity and

T2DM. *J Hum Genet.* 2006 Feb;51(2):85-91. PubMed PMID: ISI:000234906600001. English.

205. Han CZ, Du LL, Jing JX, Zhao XW, Tian FG, Shi J, et al. Associations among Lipids, Leptin, and Leptin Receptor Gene Gln223Arg Polymorphisms and Breast Cancer in China. *Biol Trace Elem Res.* 2008 Dec;126(1-3):38-48. PubMed PMID: ISI:000261329300004. English.

206. Okobia MN, Bunker CH, Garte SJ, Zmuda JM, Ezeome ER, Anyanwu SN, et al. Leptin receptor Gln223Arg polymorphism and breast cancer risk in Nigerian women: A case control study. *Bmc Cancer.* 2008 Nov 18;8. PubMed PMID: ISI:000262699800001. English.

207. He BS, Pan YQ, Zhang Y, Xu YQ, Wang SK. Effect of LEPR Gln223Arg polymorphism on breast cancer risk in different ethnic populations: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2012 Mar;39(3):3117-22. PubMed PMID: ISI:000301107800122. English.

208. Lin DW, FitzGerald LM, Fu R, Kwon EM, Zheng SL, Kolb S, et al. Genetic Variants in the LEPR, CRY1, RNASEL, IL4, and ARVCF Genes Are Prognostic Markers of Prostate Cancer-Specific Mortality. *Cancer Epidem Biomar.* 2011 Sep;20(9):1928-36. PubMed PMID: ISI:000294609200016. English.

209. Li YL, Geng JL, Wang YZ, Lu QH, Du YM, Wang WJ, et al. The role of leptin receptor gene polymorphisms in determining the susceptibility and prognosis of NSCLC in Chinese patients. *J Cancer Res Clin.* 2012 Feb;138(2):311-6. PubMed PMID: ISI:000300344800017. English.

210. Wazir U, Al Sarakbi W, Jiang WG, Mokbel K. Evidence of an Autocrine Role for Leptin and Leptin Receptor in Human Breast Cancer. *Cancer Genom Proteom.* 2012 Nov-Dec;9(6):383-7. PubMed PMID: ISI:000311765600004. English.

211. Li L, Lee KJ, Choi BC, Baek KH. Relationship between leptin receptor and polycystic ovary syndrome. *Gene.* 2013 Sep 15;527(1):71-4. PubMed PMID: 23769971. Epub 2013/06/19. eng.

212. Friedlander Y, Li G, Fornage M, Williams OD, Lewis CE, Schreiner P, et al. Candidate molecular pathway genes related to appetite regulatory neural network, adipocyte homeostasis and obesity: results from the CARDIA Study. *Ann Hum*

Genet. 2010 Sep 1;74(5):387-98. PubMed PMID: 20642810. Pubmed Central PMCID: 2945878. Epub 2010/07/21. eng.

213. Slattery ML, Wolff RK, Herrick J, Caan BJ, Potter JD. Leptin and leptin receptor genotypes and colon cancer: gene-gene and gene-lifestyle interactions. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008 Apr 1;122(7):1611-7. PubMed PMID: 18059035. Pubmed Central PMCID: 2430084.

214. Hedayatzadeh-Omran A, Rafiei A, Khajavi R, Alizadeh-Navaei R, Mokhberi V, Moradzadeh K. Association between ghrelin gene (Leu72Met) polymorphism and ghrelin serum level with coronary artery diseases. *DNA Cell Biol*. 2014 Feb;33(2):95-101. PubMed PMID: 24341728.

215. Yu LX, Zhou NN, Liu LY, Wang F, Ma ZB, Li J, et al. Adiponectin receptor 1 (ADIPOB1) rs1342387 polymorphism and risk of cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(18):7515-20. PubMed PMID: 25292021.

216. Kaklamani V, Yi N, Zhang K, Sadim M, Offit K, Oddoux C, et al. Polymorphisms of ADIPOB and ADIPOB1 and prostate cancer risk. *Metabolism*. 2011 Sep;60(9):1234-43. PubMed PMID: 21397927. Pubmed Central PMCID: 3134585.

217. Siitonen N, Pulkkinen L, Lindstrom J, Kolehmainen M, Schwab U, Eriksson JG, et al. Association of ADIPOB2 gene variants with cardiovascular disease and type 2 diabetes risk in individuals with impaired glucose tolerance: the Finnish Diabetes Prevention Study. *Cardiovascular diabetology*. 2011;10:83. PubMed PMID: 21943112. Pubmed Central PMCID: 3196906.

218. Howard JM, Cathcart MC, Healy L, Beddy P, Muldoon C, Pidgeon GP, et al. Leptin and adiponectin receptor expression in oesophageal cancer. *The British journal of surgery*. 2014 May;101(6):643-52. PubMed PMID: 24664553.

219. Huang B, Cheng X, Wang D, Peng M, Xue Z, Da Y, et al. Adiponectin promotes pancreatic cancer progression by inhibiting apoptosis via the activation of AMPK/Sirt1/PGC-1alpha signaling. *Oncotarget*. 2014 Jul 15;5(13):4732-45. PubMed PMID: 25051362. Pubmed Central PMCID: 4148095.

220. Gao Q, Zheng J. Adiponectin-induced antitumor activity on prostatic cancers through inhibiting proliferation. *Cell Biochem Biophys*. 2014 Sep;70(1):461-5. PubMed PMID: 24793551.

8 - ANEXOS



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 06/11/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 705/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0565.0.146.000-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ANÁLISE DE POSSÍVEIS MARCADORES SÉRICOS DE DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO PARA O CÂNCER BEM DIFERENCIADO DA TIRÓIDE”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Marjory Alana Marcello

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas / UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/09/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 06/11/09 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Verificar a utilidade de diversos genes e proteínas como marcadores de diagnóstico e/ou prognóstico para o câncer bem diferenciado da tireóide.

III - SUMÁRIO

Projeto de mestrado. Para avaliar os diferentes possíveis marcadores, serão analisadas amostras de sangue de 100 indivíduos com câncer de tireóide atendidos no ambulatório de Câncer de Tireóide, 50 indivíduos com nódulos benignos, e 150 indivíduos controles. As amostras de sangue dos pacientes (com câncer e nódulos benignos) serão realizadas em momentos em que eles necessitem realizar tais amostras para procedimentos relativos a seu tratamento/diagnóstico.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de setembro de 2008.


Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP.



Comitê de Ética em Pesquisa CEP

Para: Dr. André Lopes Carvalho

De: Renato José Affonso Junior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Data: 17/07/2009

Projeto de Pesquisa: **233/2009**

Prezado (a) Senhor (a),

Venho, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Câncer de Barretos analisou as pendências apontadas em reunião, referentes ao projeto **233/2009** intitulado : **“Avaliação da utilidade prática de potenciais marcadores séricos para o cancer de tireóide”** decidindo que o mesmo encontra-se **“Aprovado”**.

Atenciosamente,

*Dr. Renato José Affonso Junior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital de Câncer de Barretos*



LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR DO CÂNCER
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas
Departamento de Clínica Médica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa em Câncer de Tireóide

Pesquisadora: Profª Dra Laura Sterian Ward

Profª Dra Lígia Vera Montalli Assumpção

Paciente ou Responsável pelo paciente

Sr(a) _____

_____ anos RG: _____ HC: _____

Endereço: _____

Telefone: _____ Data: / /

Concordo em doar sangue e tecido para pesquisa de ácidos nucleicos e proteínas que podem estar envolvidas em doenças malignas e benignas da tireóide. A pesquisa tem por objetivo a melhor compreensão dos fatores moleculares de diagnóstico e prognóstico. Tal pesquisa justifica-se dada a importância da compreensão destes fatores para o tratamento dos pacientes. Sei que se trata de uma pesquisa científica e concordo em que os dados de meu caso, registrados no meu prontuário médico, sejam utilizados na pesquisa, sabendo que meu nome assim como meus dados clínicos e de laboratório não serão individualmente citados e que em nenhum momento meu diagnóstico ou tratamento serão prejudicados por tal doação. Meus dados e o material biológico advindo da coleta poderão ser usados em novas pesquisas, caso justificativa devida, sendo estas pesquisas aprovadas devidamente pelo CEP e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP, submissas totalmente à devida legislação. Tenho a garantia de sigilo de dados confidenciais ou que, de algum modo, possam me provocar constrangimentos ou prejuízos, tornando anônimo o material ou dados obtidos. Também sei que esta pesquisa pode trazer benefícios para a cura ou tratamento das doenças tireoidianas no futuro, mesmo que eu não me beneficie disso agora. Não terei nenhuma forma de reembolso, já que não terei nenhum gasto com a doação do meu material para esta pesquisa e sei que poderei cancelar minha decisão e deixar de participar em qualquer momento. Também não serei submetido a qualquer procedimento que não faça parte da rotina de meu tratamento normal, sob a orientação de meu médico habitual. Estou consciente da importância de minha participação da qual posso desistir em qualquer momento. Fui informado de que este projeto está aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e sei que poderei obter todas as informações que desejar e necessitar no contato ao CEP (infracitado), bem como denunciar quaisquer procedimentos que infrinjam as normas do CEP. Poderei obter esclarecimentos antes, durante e depois da realização da pesquisa sobre a mesma, contatando a pesquisadora responsável Profa. Dra. Laura S. Ward no contato abaixo.

Autorizo a guarda do material biológico para fins de pesquisas futuras? () Sim () Não

Assinatura do Paciente ou Responsável pelo Paciente

Profª Dra. Laura Sterian Ward: Coordenadora do GEMOCA- Clínica Médica/ FCM-
UNICAMP, CEP:13081-970, Campinas, SP, (19) 3521-8954, e-mail:ward@unicamp.br

CEP: Fone: (19) 3521-8938, Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP,
e-mail: cep@fcm.unicamp.br

This article was downloaded by: [UNICAMP], [Ms Marjory Maricello]

On: 30 April 2014, At: 07:20

Publisher: Routledge

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Nutrition and Cancer

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/hnuc20>

Obesity and Excess Protein and Carbohydrate Consumption Are Risk Factors for Thyroid Cancer

Marjory Alana Maricello^a, Aline Castaldi Sampaio^a, Bruno Geloneze^b, Ana Carolina Junqueira Vasques^a, Ligia Vera Montalli Assumpção^a & Laura Sterian Ward^a

^aLaboratory of Cancer Molecular Genetics (Gemoca), Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, São Paulo, Brazil

^bLaboratory of Investigation on Metabolism and Diabetes, Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, São Paulo, Brazil

Published online: 19 Nov 2012.

To cite this article: Marjory Alana Maricello, Aline Castaldi Sampaio, Bruno Geloneze, Ana Carolina Junqueira Vasques, Ligia Vera Montalli Assumpção & Laura Sterian Ward (2012) Obesity and Excess Protein and Carbohydrate Consumption Are Risk Factors for Thyroid Cancer, *Nutrition and Cancer*, 64:8, 1190-1195, DOI: [10.1080/01635581.2012.721154](https://doi.org/10.1080/01635581.2012.721154)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2012.721154>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

Obesity and thyroid cancer

Marjory Alana Marcello, Lucas Leite Cunha, Fernando Assis Batista and Laura Sterlan Ward

Laboratory of Cancer Molecular Genetics (Gimoca), Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (FCM- Unicamp), Rua Tessália Vieira de Camargo 126, Barão Geraldo, Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil

Correspondence should be addressed to M A Marcello
Email: marjoryam@gmail.com

Abstract

Many studies have provided observational data on the association of obesity and thyroid cancers, but only few of them propose mechanisms that would permit a better understanding of the causal molecular mechanisms of this association. Considering that there is an increasing incidence of both obesity and thyroid cancer, we need to summarize and link recent studies in order to characterize and understand the contribution of obesity-related factors that might affect thyroid cancer development and progression. Adipose tissue is involved in many vital processes, including insulin sensitivity, angiogenesis, regulation of energy balance, activation of the complement system, and responses such as inflammation. Although these processes have their own molecular pathways, they involve the same molecules through which obesity and adipose tissue might exert their roles in carcinogenesis, not only affecting MAPK and PI3K or even insulin pathways, but also recruiting local inflammatory responses that could result in disease formation and progression. This review describes five important issues that might explain the link between excessive weight and thyroid cancer: thyroid hormones, insulin resistance, adipokines, inflammation, and sexual hormones.

Key Words

- obesity
- oncology
- molecular biology

Endocrine-Related Cancer
(2014) 21, T255–T271

Introduction

Overweight and/or obesity have been consistently related to the development and progression of different types of cancer during the last decades. An extensive review published a few years ago estimated that approximately 20% of all cancers might be caused by excessive weight (overweight or obesity) (Wolin et al. 2010). Both the International Agency for Research on Cancer (IARC) and the World Cancer Research Fund (WCRF) recognize solid evidence that postmenopausal breast cancer, endometrial cancer, colon cancer, esophageal adenocarcinoma, kidney cancer, liver cancer, pancreatic cancer, prostate cancer, thyroid cancers, leukemia, non-Hodgkin lymphoma, and myeloma are related to overweight and obesity with respect to development, treatment, and progression of the disease (IARC 2002, World Cancer Research Fund & American Institute for Cancer Research 2007, Wolin et al. 2010,

De Pergola et al. 2013). However, because of the differences in the etiological factors related to different types of tumors and the variety of mechanisms involved in excessive weight conditions, cancers might be related to weight variations by distinct and complex pathways.

Many efforts have been made to understand the possible mechanisms underlying these associations, and it has been strongly suggested that endometrial and postmenopausal breast cancers are linked to obesity by endogenous estrogen levels (Begg et al. 1987, Kaaks et al. 2002, Renehan et al. 2008, Hvidtfeldt et al. 2012, Strong et al. 2013), whereas cancers of the gallbladder, and esophagus, lymphomas, and myelomas might be influenced by inflammation, which, itself, is very closely related to obesity (Renehan et al. 2008, Lodhi et al. 2012, Kavanagh et al. 2013, Li et al. 2013, Wang et al. 2013). In patients with pancreatic and colon cancers, the evidence

Research Article

Polymorphism in *LEP* and *LEPR* May Modify Leptin Levels and Represent Risk Factors for Thyroid Cancer

Marjory Alana Marcello,¹ Antonio Ramos Calixto,²
Jacqueline Fatima Martins de Almeida,¹ Mariana Bonjorno Martins,¹
Lucas Leite Cunha,¹ Camilla Ayume Amano Cavallari,¹ Elba C. S. Etchebehere,³
Ligia Vera Montalli da Assumpção,⁴ Bruno Geloneze,²
Andre Lopes Carvalho,⁵ and Laura Sterian Ward¹

¹Laboratory of Cancer Molecular Genetics (Gemoca), Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (FCM-Unicamp), Rua Tessália Vieira de Camargo 126, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

²Laboratory of Investigation on Metabolism and Diabetes (LIMED), Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (FCM-Unicamp), Rua Carlos Chagas 420, 13083-878 Campinas, SP, Brazil

³Service of Nuclear Medicine, University of Campinas, Rua Vital Brasil 251, 13083-888 Campinas, SP, Brazil

⁴Service of Endocrinology, University of Campinas, Rua Vital Brasil 251, 13083-888 Campinas, SP, Brazil

⁵Department of Head and Neck Surgery, Barretos Cancer Hospital, Rua Antenor Duarte Vilela 1331, 14784-400 Barretos, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Marjory Alana Marcello; marjoryam@gmail.com

Received 6 January 2015; Accepted 13 February 2015

Academic Editor: Giuseppe Damante

Copyright © 2015 Marjory Alana Marcello et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Purpose. To understand the role of polymorphisms in the *LEP* (rs7799039 and rs2167270) and *LEPR* (rs1137101 and rs1137100) genes in DTC susceptibility and their effect on leptin levels. **Methods.** We studied 153 patients with DTC and 234 controls through TaqMan SNP Genotyping and ELISA, comparing these data to the clinicopathological data of patients with DTC. **Results.** Patients with AA genotype of rs7799039 had higher levels of serum leptin (9.22 ± 0.98 ng/mL) than those with AG genotype (10.07 ± 0.60 ng/mL; $P = 0.005$). Individuals with AG genotype of rs2167270 also produced higher serum leptin levels (10.05 ± 0.59 ng/mL) than the subjects with GG genotype (9.52 ± 0.79 ng/mL; $P < 0.05$). A multivariate logistic regression adjusted for gender, age, and BMI showed that the AG genotype of rs7799039 was an independent risk for DTC (OR, 1.689; $P = 0.0183$; 95% CI, 1.516–19.116). Similarly, AG and GG genotypes of rs1137101 increased the susceptibility to DTC (OR, 3.747; $P = 0.029$; 95% CI, 1.361–12.092 and OR, 5.437; $P = 0.013$; 95% CI, 1.426–20.729). **Conclusions.** We demonstrated that rs7799039 and rs2167270 polymorphisms modify the serum leptin concentrations in patients with DTC. Furthermore, polymorphisms rs7799039 and rs1137101 increase the risk of DTC development, although they do not correlate with tumor aggressiveness.

1. Introduction

The mechanisms underlying the relationship between cancer and obesity have not been established and may vary according to the primary tumour location [1, 2]. These variations may be attributed to the metabolic and endocrine effects that obesity may exert on the metabolism, hormones, inflammation, and protein production [3], thus leading to the development and progression of cancer.

Our group has previously demonstrated that cytokines produced by adipocytes (adipokines), such as adiponectin, leptin, and resistin, are differentially expressed in malignant and benign thyroid nodules, helping to differentiate not only malignancy but also subtypes of thyroid nodules, which are difficult to identify using PAAF [4]. Of the three adipokines, leptin presents as an interesting diagnostic option for thyroid malignancy; leptin has a 100% accuracy, as well as high sensitivity and specificity. Additionally, the serum leptin