AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Efeitos citogenético e dosimétrico do ^{131}I em pacientes com câncer diferenciado da tireóide com e sem estimulação com r-hTSH. Estudo em células tumorais tireoidianas (WRO) tratadas com ^{131}I e ^{60}Co *in vitro*

Flávia Gomes Silva Valgôde

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora:

Profa. Dra. Kayo Okazaki

São Paulo

2015

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Efeitos citogenético e dosimétrico do ^{131}I em pacientes com câncer diferenciado da tireóide com e sem estimulação com r-hTSH. Estudo em células tumorais tireoidianas (WRO) tratadas com ^{131}I e ^{60}Co *in vitro*

Flávia Gomes Silva Valgôde

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientadora:

Profa. Dra. Kayo Okazaki

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

São Paulo

2015

"Tente mover o mundo – o primeiro passo será mover a si mesmo" Platão.

Para minha família.

*À minha mãe Maria Gomes e ao meu pai
Serafim Valgôde pelo amor incondicional,
cuidado, apoio, incentivo e por serem meu
porto seguro.*

*Minhas irmãs Fabiana Valgôde e Fernanda
Valgôde, por me ensinarem a ser uma pessoa
melhor todos os dias.*

AGRADECIMENTOS

À Dra Kayo Okazaki, pela paciência, amizade e brilhante orientação durante todos esses anos.

À Dra Márcia Augusta da Silva, por sua imensa colaboração e amizade.

Ao Dr Daniel Perez pela paciência infinita e por todos os conselhos.

Ao Dr. Paolo Bartolini, Dr. Carlos Roberto Jorge Soares, Dra Cibeles Peroni e a Dra Maria Teresa Ribela pela enorme contribuição e amizade.

A todo o Centro de Biotecnologia, em especial ao Dr. João Ezequiel, Dra Miriam, José Maria, Junqueira, Ivete, Thais, Eliana, Elisa, Fernanda, Patrícia, Victor, Neide, Ruth e Arlete por toda ajuda e por tornarem leve a rotina no laboratório.

Ao Luis Alberto do Centro de Radiofarmácia e ao Carlos do Centro de Tecnologia das Radiações.

Ao Centro de Medicina Nuclear, em especial ao Dr. Carlos Alberto Buchpiguel e Dra. Maria Inês Calil Cury Guimarães pela colaboração.

Aos pacientes que aceitaram participar desse estudo e confiaram no nosso trabalho.

À Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) pelo apoio financeiro.

Aos grandes amigos, Cláudia Cecchi, Renata Martinussi, Renata Damiani, Mayra Andozia, Fernanda Maciel, Mariza Porto e Thiago Henrique Cruz por participarem com todo amor e carinho dessa jornada.

À Camila Pellicciotti, por estar perto mesmo longe e pela amizade de toda uma vida.

À Julia Porto, Barbara Rimi, Luisa Paiva e Luciana Kamachi pelo carinho, conselhos e por todo apoio.

Ao Rafael Sanfurgo por participar das 24 horas do meu dia, mesmo nos piores dias.

À Karla Freitas, Fátima Feijoó e Roberta Monteiro por serem amigas sempre presentes e pelas “sessões de terapia” online.

À Maria Valéria Castro de Oliveira, pelas verdadeiras sessões de terapia e grande ajuda nas horas mais nebulosas.

E mais uma vez a toda minha família, nada disso seria possível sem vocês.

EFEITOS CITOGENÉTICO E DOSIMÉTRICO DO ^{131}I EM PACIENTES COM CÂNCER DIFERENCIADO DA TIREOIDE COM E SEM ESTIMULAÇÃO COM r-hTSH. ESTUDO EM CÉLULAS TUMORAIS TIREOIDIANAS (WRO) TRATADAS COM ^{131}I E ^{60}Co *IN VITRO*

Flávia Gomes Silva Valgôde

RESUMO

O câncer diferenciado da tireoide (CDT) representa cerca de 90% das malignidades tireoidianas com incidência crescente nas últimas décadas. As modalidades de tratamento incluem tireoidectomia, terapia com ^{131}I (com e sem r-hTSH), radio e quimioterapias. Pouco se sabe sobre os efeitos desses tratamentos em nível celular. O presente trabalho foi proposto com o intuito de avaliar em que extensão a terapia com radioiodo pode causar danos em linfócitos periféricos de pacientes com CDT precedidos ou não com r-hTSH, levando-se em consideração, efeitos agudos, tardios e dosimétricos do ^{131}I (estudo *in vivo*). Um estudo *in vitro* também foi realizado em células-alvo de tumores tireoidianos (WRO) por meio de análise de citotoxicidade, genotoxicidade e captação do radioiodo. Para tanto, amostras sanguíneas de pacientes, divididos em 2 grupos (grupo A com r-hTSH + ^{131}I e grupo B somente com ^{131}I) foram coletadas antes, 24h, 1 semana, 1 mês e 1 ano após administração do ^{131}I para análise de aberrações cromossômicas (AC). Curva dose-resposta para ^{131}I *in vitro* foi elaborada para a estimativa de dose absorvida nos pacientes, comparando as frequências de dicêntricos obtidas *in vitro* com dados *in vivo* pelo programa Monte Carlo. A iodoterapia induziu um aumento no número de AC em linfócitos de pacientes com valor máximo 24h após o tratamento, com declínio gradativo ao longo do tempo, com mais danos cromossômicos no grupo B em relação ao grupo A, atingindo níveis similares aos basais 1 ano após a administração do radioiodo. A frequência de dicêntricos encontrada nos linfócitos de pacientes 24h após o tratamento foi equivalente àquela induzida *in vitro* ($0,354 \pm 0,153$ MBq/mL para o grupo A e $0,309 \pm 0,154$ MBq/mL para o grupo B), que corresponde a dose absorvida de $0,8 \pm 0,3$ Gy e $0,7 \pm 0,3$ Gy para os grupos A e B, respectivamente, sem significância estatística entre os grupos. As células WRO mostraram um ciclo celular relativamente lento de 96,3h com um cariótipo instável. O ensaio genotóxico mostrou uma radiorresistência relativamente alta (0,07 a 3,70 MBq/mL), sem significância estatística com e sem r-hTSH. No entanto, o ensaio citotóxico, mostrou uma tendência à queda nas concentrações mais altas de 1,85 ($p < 0,05$) e 3,70 MBq/mL ($p < 0,01$) somente na presença de r-hTSH, coincidindo com nível mais alto de captação. Células WRO foram relativamente radiorresistentes também à irradiação externa de ^{60}Co na faixa de dose de 0,2 a 8,3 Gy, com queda gradativa em função do tempo para doses mais altas (10, 20 e 40Gy). Dados obtidos mostraram pouco dano citogenético nos pacientes após a exposição terapêutica com radioiodo, o que sugere um tratamento seguro e eficaz para os pacientes dos dois grupos. Pacientes do grupo A, no entanto, obtiveram uma melhor qualidade de vida com o uso do r-hTSH. Estudos *in vitro* com irradiação interna (^{131}I) e externa (^{60}Co) com ou sem r-hTSH, apontam a necessidade de uma estratégia terapêutica alternativa para contornar a perda da habilidade das células tireoidianas (WRO) em concentrar o radioiodo, responsável pelo relativo insucesso da iodoterapia em pacientes com CDT.

CYTOGENETIC AND DOSIMETRIC EFFECTS OF ^{131}I IN LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH DIFFERENTIATED THYROID CANCER WITH AND WITHOUT r-hTSH STIMULATION. STUDY IN THYROID TUMOR CELLS (WRO) TREATED WITH ^{131}I AND ^{60}Co IN VITRO

Flávia Gomes Silva Valgôde

ABSTRACT

Differentiated thyroid cancer (DTC) represents about 90% of thyroid malignancies with increasing incidence in the recent decades. Treatment modalities include thyroidectomy, ^{131}I therapy (with or without r-hTSH), radio and chemotherapy. Little is known about the effects of these treatments at the cellular level. This work was proposed in order to assess to what extent radioiodine therapy can cause damage in peripheral lymphocytes of patients with DTC, preceded or not by r-hTSH, taking into account acute, slow and dosimetric effects of ^{131}I (in vivo study). An in vitro study was also carried out on thyroid tumor target cells (WRO) by cytotoxicity and genotoxicity analysis and radioiodine uptake. For this, blood samples from patients divided into two groups (group A, r-hTSH + ^{131}I and group B, ^{131}I only) were collected before, 24 hours, 1 week, 1 month and 1 year after ^{131}I administration for aberration chromosome analysis (CA). A dose-response curve for ^{131}I in vitro was developed for estimating the absorbed dose in patients, comparing the dicentric frequencies obtained in vitro with in vivo data by Monte Carlo program. Radioiodine therapy induced an increase in the number of CA in lymphocytes of patients peaking 24 hours after treatment, with gradual decline over time and with more chromosomal damage in group B than in group A, reaching baseline levels one year after radioiodine administration. The frequency of dicentric found in patient lymphocytes, 24h after treatment, was equivalent to that induced in vitro ($0.354 \pm 0.153 \text{ MBq / mL}$ for group A and $0.309 \pm 0.154 \text{ MBq / mL}$ for group B), which corresponds to absorbed doses of $0.8 \pm 0.3 \text{ Gy}$ and $0.7 \pm 0.3 \text{ Gy}$ for groups A and B, respectively, with no significant difference between the groups. WRO cells showed a cell cycle relatively slow: 96,3h with an unstable karyotype. The genotoxic test showed a relatively high radioresistance (0.07 to 3.70 MBq/mL), with no statistical significance, with or without r-hTSH. However, the cytotoxic assay, showed a tendency to decrease at higher concentrations of 1.85 (p <0.05) and 3.70 MBq/mL (p <0.01) only in the presence of r-hTSH, coincident with the highest level of uptake. WRO cells were also relatively radioresistant to external irradiation of ^{60}Co in the range of 0.2-8.3 Gy, with a gradual decrease in function of time for higher doses (10,20 and 40Gy). The data obtained showed little cytogenetic damage in patients upon therapeutic exposure, suggesting a safe and effective treatment for both groups of patients. Patients in group A, however, had a better quality of life by using r-hTSH. In vitro studies with internal (^{131}I) and external (^{60}Co) irradiation, with or without r-hTSH, point to the need for an alternative therapeutic strategy to overcome the loss of ability of thyroid cells (WRO) to concentrate radioiodine, which is responsible for the failure of radioiodine therapy in patients with DTC.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Considerações gerais sobre tireoide	11
1.1.1 Anatomia	11
1.1.2 Síntese e secreção de hormônios	12
1.1.3 Iodo	13
1.1.4 Doenças tireoidianas	14
1.2 Diagnóstico e tratamento	22
1.3 Considerações gerais sobre radioiodoterapia	23
1.4 Considerações gerais sobre r-TSH	24
1.5 Considerações gerais sobre técnicas citogenéticas	27
1.5.1 Técnica de aberrações cromossômicas (ACs)	28
1.5.2 Técnica do micronúcleo (MN)	31
2 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Materiais	35
3.1.1 Pacientes	35
3.1.2 Doadores sadios	37
3.1.3 Linhagem celular WRO	37
3.2 Métodos	38
3.2.1 Ensaio de genotoxicidade	38
3.2.2 Cálculo da dose absorvida de ^{131}I	40
3.2.3 Cálculo do tempo de duplicação em células WRO	41
3.2.4 Ensaio de citotoxicidade com ^{131}I e ^{60}Co em células WRO	41
3.2.5 Ensaio de captação de ^{131}I em células WRO	42
3.2.6 Análise estatística	43
4 RESULTADOS	44
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÕES	69
ANEXOS	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a incidência de câncer da tireoide mais que dobrou em diversos países como Canadá, França e Estados Unidos (Cramer *et al.*, 2010). A partir dos anos 90, o câncer de tireoide se tornou um tipo de neoplasia com crescimento mais rápido de incidência dentre todos os tumores malignos (Siegel *et al.*, 2012). Segundo as informações do último volume da publicação *Cancer Incidence in Five Continents*, durante o período de 1973 a 2002, as taxas de incidência aumentaram mais de cinco vezes na maioria das populações analisadas (INCA, 2014).

Até o momento, a discussão sobre a incidência crescente do câncer da tireoide está centrada em duas possíveis explicações: uma notável melhora nos exames diagnósticos ou um real aumento na incidência da doença (Pellegriti *et al.*, 2013).

A primeira hipótese defende que o aumento da incidência de câncer de tireoide é resultado, em grande parte, de um maior acesso a técnicas mais sofisticadas de diagnóstico como a difusão de exames com imagens de alta resolução (particularmente ultrassonografia) e o aumento do uso de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) para biópsia de pequenos nódulos. Assim sendo, o aumento da incidência pode refletir no aumento na detecção da doença em estágios subclínicos (Kent *et al.*, 2007; Pacini e Castagna, 2008; Grodski *et al.*, 2009; Nikiforov e Nikiforova, 2011).

Outra hipótese parte do princípio de que se essa fosse a única razão, somente pequenos tumores em estágio inicial teriam aumentado. No entanto, tumores maiores (palpáveis clinicamente) também apresentaram um aumento de incidência como mostra a figura 1 (Chen *et al.*, 2009; Cramer, 2010; Morris, 2010).

Figura 1 – Tendência na incidência de câncer diferenciado da tireoide (CDT) de acordo com o tamanho do tumor. (A) Incidência por 100.000 casos de CDT; (B) número de casos observados com tumores maiores que 4 cm; (C) maiores que 5 cm e (D) maiores que 6 cm (Adaptada de Morris e Mysseorek, 2010).

A segunda hipótese acredita que o maior número de casos em todos os estádios da doença pode caracterizar um aumento real de incidência devido a vários fatores, tanto endógenos como exógenos: problemas genéticos, hormonais e dieta alimentar, bem como fatores de risco ambientais (Tabela 1) (Chen *et al.*, 2009; Kim e Zhu, 2009; Morris e Mysseorek, 2010; Cramer *et al.*, 2010;; Li *et al.*, 2013; Pellegriti *et al.*, 2013).

Tabela 1 – Principais fatores de risco associados ao câncer de tireoide (Adaptada de Pellegriti *et al.*, 2013)

	Fator	Fonte
Exógeno	Raio X	Raio-X dental e scan CT
	Iodo 131	Procedimentos em medicina nuclear
	Iodo	Dieta
	Nitrato	Água e dieta
	Estilo de vida e fatores ambientais	Carcinógenos
	Poluentes	Carcinógenos
Mecanismo		
Endógeno	TSH	Estimulação do crescimento da tireoide
	Auto-imune	Aumento do TSH e estresse oxidativo
	Doenças da tireoide, obesidade e resistência a insulina	Aumento de insulina promove câncer

Acredita-se, no entanto, que o aumento da incidência do câncer da tireoide seja multifatorial decorrente de uma combinação dessas duas hipóteses: um aparente aumento devido a procedimentos de diagnósticos mais sensíveis e um aumento real decorrente da exposição excessiva da população à radiação e outros agentes cancerígenos, além dos fatores endógenos (Tabela 2). Assim sendo, a alta variabilidade na incidência de câncer de tireoide pela área geográfica e etnia podem ser explicadas pelos fatores genéticos, influências ambientais e o acesso aos cuidados médicos (Pellegriti *et al.*, 2013). Desde que não há um consenso quanto à etiologia do câncer, estudos mais acurados são necessários a fim de determinar seus verdadeiros fatores de risco.

Tabela 2 – Possíveis razões para o aumento da incidência de câncer de tireoide (Adaptada de Pellegriti *et al.*, 2013)

(A) O aumento é aparente (não há aumentos nos casos de câncer e sim melhora na detecção)

- (i) A ampla difusão de procedimentos médicos avançados (ultrassom e biópsia aspirativa por agulha fina);
- (ii) As crescentes preocupações de incidência principalmente microcarcinomas;
- (iii) Aumento da detecção de pequenos nódulos por que:
 - (1) Tireoidectomias totais para lesões benignas são mais frequentes
 - (2) Os exames patológicos são mais detalhados
 - (3) A descoberta acidental de nódulos no exame de diagnóstico para outras doenças
- (iv) A alta frequência de pequenos cânceres de tireoide não diagnosticados e assintomáticos na autópsia;
- (v) Melhora na previsão do registro de câncer.

(B) O aumento é verdadeiro (mais casos de câncer por causa de mudanças nos fatores de risco)

- (i) Os casos de tumores grandes também aumentaram;
- (ii) A incidência de tumores maiores e também câncer em estágio avançado não diminuiu, mesmo considerando diagnóstico precoce;
- (iii) Aumento da incidência não é proporcionalmente distribuído entre idade e sexo;
- (iv) A melhora na previsão do registro de câncer deveria ter produzido efeitos semelhantes também para outros tumores.
- (v) Taxa de mortalidade:
 - (1) taxa de mortalidade estável pode ser resultante de um diagnóstico precoce e um melhor tratamento contrariando o efeito do aumento do número de casos de câncer
 - (2) A progressão do câncer de tireoide é muito lenta e aumento da incidência de mortalidade afetaria somente depois de décadas
 - (3) Os dados recentes indicam que a mortalidade está aumentando, especialmente em homens

1.1 Considerações gerais sobre tireoide

1.1.1 Anatomia

A glândula da tireoide localiza-se imediatamente abaixo da laringe e anteriormente a traquéia, sendo um dos maiores órgãos endócrinos pesando aproximadamente 15 a 20 gramas. É constituída de dois lobos unidos por uma fina banda de tecido, o istmo, que mede aproximadamente 1 a 2 cm de altura, 2 cm de largura e 0,5 cm de espessura. Normalmente os lobos individuais apresentam um pólo superior pontiagudo e um pólo inferior pouco definido que se funde ao istmo. Cada lobo tem aproximadamente 2 a 2,5 cm de espessura e largura em seu maior diâmetro e aproximadamente 4 cm de comprimento (Figura 2) (Melmed *et al.*, 2011).

Figura 2 – Ilustração da glândula da tireoide. Retirado de: www.medicina.ufmg.br

A glândula é composta de unidades esféricas muito próximas entre si, denominadas folículos que são circundados por uma rica rede capilar. O principal constituinte da massa tireoidiana é o colóide protéico que é encontrado no interior dos folículos. É na superfície celular ou próximo a ela que ocorrem a iodação e a fase inicial da secreção dos hormônios tireoidianos.

Além dos folículos, o tecido tireoidiano contém células parafoliculares que são fonte de calcitonina, que é responsável pela regulação de cálcio no sangue (Melmed *et al.*, 2011).

1.1.2 Síntese e secreção de hormônios

A função da tireoide é gerar a quantidade de hormônio tireoidiano necessária para suprir a demanda dos tecidos periféricos. Isso requer um transporte diário suficiente de iodeto pela proteína *simporter* sódio-iodeto (NIS), transferência de iodeto para o colóide e sua oxidação pela tireoperoxidase (TPO) para permitir a síntese de aproximadamente 85 µg de tiroxina (T₄), que tem 65% de seu peso constituído por Iodo. Requer ainda, a síntese de um homodímero glicoprotéico, a tireoglobulina (Tg) que é exportada para o lúmen do folículo. Resíduos de tirosina específicos da Tg são então iodados na margem da célula tireoidiana para formar diiodotirosina (DIT) e monoiodotirosina (MIT). A TPO também catalisa a ligação de duas moléculas de DIT e MIT levando a formação de triiodotironina (T₃) e tiroxina (T₄), que são responsáveis pela regulação do desenvolvimento físico, neurológico e manutenção do metabolismo (Melmed *et al.*, 2011).

A regulação do metabolismo celular no sistema endócrino funciona através do controle e do monitoramento sobre produção e secreção de hormônios pelo hipotálamo, pela hipófise e pela tireoide. O processo de regulação inicia-se com a produção e a liberação do hormônio estimulante de tireotropina (TRH) pelo hipotálamo. Esse hormônio estimula a glândula pituitária na síntese e secreção do hormônio estimulante da tireoide (TSH) no receptor de TSH existente em cada célula folicular. O TSH, por sua vez, estimula a tireoide para a fabricação e a secreção dos hormônios tireoideanos (TH) T₄ e T₃. Isso faz com que as células-alvo tenham um suprimento hormonal satisfatório e que movam do sangue a quantidade necessária para seu metabolismo. O nível de hormônios tireoidianos livres no sangue exerce um efeito de *feedback* negativo sobre o suprimento de TSH, ou seja, quanto maior a quantidade de TH no sangue, menor será a produção do TSH pela hipófise, e vice-versa (Figura 3) (Martins & Monteiro, 2007, Melmed *et al.*, 2011).

Figura 3 – Sistema de regulação dos hormônios tireoidianos (Martins & Monteiro, 2007).

1.1.3 Iodo

O iodo é indispensável para a formação de hormônios tireoidianos, uma vez que sua concentração no plasma é baixa, sendo necessário um mecanismo para que a célula tireoidiana concentre as quantidades necessárias desse elemento. Para tanto, como foi mencionado anteriormente, esse processo de aprisionamento de iodeto é feito pela proteína de membrana NIS (Kleiman *et al.*, 2013).

Já é sabido que o mecanismo de transporte de iodeto é necessário para a manutenção da função normal da tireoide. A falha no sistema de transporte de iodo, como a mutação do gene NIS, causa diversas anomalias e problemas tanto para diagnóstico como para tratamento de indivíduos acometidos. Alguns estudos têm documentado uma redução na expressão de NIS em adenomas e carcinomas da tireoide, o que contribui para a perda da capacidade de captação de iodo em células neoplásicas. Isso dificulta a secreção e a síntese de hormônios tireoidianos bem como a terapia com radioiodo em indivíduos com câncer da tireoide (Kleiman *et al.*, 2013).

1.1.4 Doenças tireoidianas

Os distúrbios da tireoide são as anomalias endócrinas mais comumente encontradas na prática clínica. Pessoas de qualquer sexo ou idade podem ser acometidas, embora quase todas as formas de doença da tireoide sejam mais frequentes em mulheres do que em homens e aumente com a idade. A apresentação clínica das doenças da tireoide pode variar de clinicamente óbvias a assintomáticas. As consequências podem ser disseminadas e graves, até mesmo ameaçando a vida.

1.1.4.1 Hipotireoidismo

O hipotireoidismo é um distúrbio comum que ocorre com maior frequência em mulheres; a incidência aumenta durante e após a meia idade em ambos os sexos (Roberts & Ladenson, 2004). O hipotireoidismo clínico reflete uma perda disseminada das ações dos hormônios tireoidianos em tecidos-alvo, onde o T_3 se liga a receptores que são membros da superfamília de receptores nucleares. Por sua vez, estes receptores de T_3 estão ligados a elementos de resposta tireoidiana localizados nas regiões regulatórias de certos genes que aumentam ou diminuem a sua transcrição em resposta ao hormônio tireoidiano. Os sintomas clássicos incluem fadiga, letargia, intolerância ao frio, ganho ponderal, constipação, pele seca, rouquidão, raciocínio lento e humor deprimido (Ladenson, 2010).

1.1.4.2 Hipertireoidismo

O hipertireoidismo, ou tirotoxicose, é caracterizado pelo excesso de produção de hormônio pela glândula tireoide. Tirotoxicose é o resultado clínico fisiológico e bioquímico do excesso de hormônios T_3 e T_4 e pode ser dividida em três categorias etiológicas: estimulação anormal da glândula tireoide, autonomia da glândula e inflamação da glândula com liberação não controlada de hormônio tireoidiano. Os sintomas clássicos são perda ponderal apesar de bom apetite, intolerância ao calor, tremor, palpitações e ansiedade (Bahn *et al*, 2011).

1.1.4.3 Bócio

Bócio é um aumento do volume da glândula tireoide e é causado normalmente pela deficiência de iodo no organismo. O principal sintoma é a

compressão de estruturas adjacentes pela glândula. Pode ocorrer uma sensação de aperto ou dor quando a glândula em expansão estica sua cápsula, a qual tem inervação sensitiva e comprime tecidos e estruturas adjacentes. A compressão traqueal pode causar tosse e dificuldade na eliminação de muco. A compressão do nervo laríngeo recorrente resulta em rouquidão, voz fraca e disfagia para líquidos; a disfunção bilateral destes nervos pode causar dispnéia por obstrução de vias aéreas. Esse distúrbio pode estar associado com hipotireoidismo, eutireoidismo ou hipertireoidismo. Ele pode ser uma manifestação de condições hiperplásicas ou neoplásicas benignas, doença maligna e inflamação. Em muitos destes distúrbios, o aumento da glândula tireoide é inicialmente difuso, mas, com o tempo, a tireoide se torna multinodular e pode ficar assimétrica (Ladenson, 2010).

1.1.4.4 Nódulos tireoidianos

Nódulos tireoidianos são palpáveis em 6% das mulheres e 2% dos homens: os não palpáveis podem ser detectados por ultrassonografia em um terço das mulheres. Os nódulos podem representar tecido sólido composto de células tireoidianas ou colóide, ou podem ser cistos por acúmulo de fluido ou sangue, em geral por hemorragia dentro de um nódulo sólido. A maioria dos nódulos tireoidianos são benignos; em adultos, apenas 5 a 10% dos nódulos tireoidianos são câncer (Ladenson, 2010).

1.1.4.5 Câncer de tireoide

O câncer da glândula tireoide é a neoplasia maligna mais comum do sistema endócrino e é responsável por 2,5% de todos os cânceres humanos (Cramer *et al.*, 2010; Jemal *et al.*, 2010), afetando quase 3 vezes mais as mulheres do que aos homens: a maioria dos casos ocorre entre pessoas de 25 à 65 anos de idade. No Brasil, em 2012, estimou-se 10.590 novos casos de câncer de tireoide, com um risco estimado de 11 casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2014),

A maioria dos tumores da tireoide origina de células epiteliais foliculares da tireoide enquanto que 3 – 5% dos cânceres originam de células C parafoliculares. A neoplasia maligna de tireoide é dividida em três principais grupos (Figura 4): câncer bem-diferenciado (carcinomas papífero e folicular),

câncer pouco-diferenciado (carcinoma medular) e câncer desdiferenciado (carcinoma anaplásico) (Nikiforov & Nikiforova, 2011).

Figura 4 – Esquema das etapas de desdiferenciação celular de câncer de tireoide originário de células foliculares (Adaptada de Nikiforov e Nikiforova, 2011).

Entre esses tipos de câncer, o câncer diferenciado da tireoide (CDT) representa 90% das malignidades tireoidianas, sendo 80% do tipo papilar e 10% do tipo folicular (Carvalho *et al.*, 2012). São denominados diferenciados por manterem semelhanças estruturais e funcionais com o tecido tireoidiano normal, tendo sua origem nas células foliculares normais.

Câncer da tireoide representa um tipo de neoplasia onde os genes críticos (alvos) são frequentemente mutados via dois distintos mecanismos moleculares: mutação pontual ou rearranjo cromossômico. O primeiro é o resultado de uma simples mudança no nucleotídeo dentro da cadeia de DNA, enquanto que o outro representa uma anomalia genética mais ampla com quebra e fusão de partes do mesmo cromossomo ou de cromossomos diferentes. Evidências crescentes sugerem que estes 2 mecanismos mutacionais distintos estão associados com fatores etiológicos específicos envolvidos na carcinogênese de tireoide (Nikiforov e Nikiforova, 2011).

É um tipo de câncer que similarmente a outros tipos de neoplasia, a iniciação e a progressão tumoral ocorrem através de acúmulo gradual de várias alterações genéticas e epigenéticas, incluindo ativação e inativação de

mutações somáticas e alterações no padrão de expressão gênica (Nikiforov & Nikiforova, 2011).

São conhecidas duas principais rotas de sinalização envolvidas na carcinogênese de tireoide: rotas MAPK e P13K-AKT (Figura 5). Estas rotas estão envolvidas na propagação de sinais de vários receptores da membrana celular tirosina kinase ao núcleo e elas regulam múltiplos processos celulares incluindo proliferação, diferenciação e sobrevivência. A ativação da rota MAPK é um evento de iniciação tumoral comum em carcinomas bem diferenciado do tipo papilar e em alguns carcinomas foliculares. Mutações envolvendo os efetores da rota P13K-AKT são mais frequentemente encontradas em carcinomas foliculares e em tipos menos diferenciados de câncer da tireoide. Estas informações mostram que carcinomas papilar e folicular se originam através de rotas oncogênicas distintas (Lacroix *et al.*, 2005)

Figura 5 - As principais vias de sinalização envolvidas na carcinogênese da tireoide (Nikiforov & Nikiforova, 2011).

1.1.4.5.1 Carcinoma papilar da tireoide (CPT)

O câncer do tipo papilar é o carcinoma mais comum da tireoide (~80%) e é definido como “tumor epitelial maligno com evidência de diferenciação folicular e caracterizado pela formação de papilas e/ou alterações nucleares distintas”. É um tumor não encapsulado com estruturas papilares e foliculares (Cerutti *et al.*, 2004)

Este tipo de câncer, como em outros tipos de neoplasia, está estritamente relacionado a eventos genéticos mutacionais entre eles a ativação e rearranjo cromossômico dos receptores da tirosina kinase (RET) e as mutações pontuais nos genes RAS (*Rat Sarcoma*) e BRAF (*B-type Raf Kinase*) (Nikiforov e Nikiforova, 2011; Son *et al.*, 2014).

O evento mutacional no receptor tirosina kinase da membrana celular leva à produção de um gene quimérico RET/PTC que é o resultado do rearranjo cromossômico (inversão paracêntrica do braço longo do cromossomo 10) encontrado em câncer papilar, responsável pela transdução de sinais extracelulares para o crescimento celular. Como resultado do rearranjo, uma porção do gene RET se funde com um dos vários possíveis genes parceiros. Todos os genes quiméricos passam a controlar a expressão da proteína RET/PTC, o que leva a estimulação crônica da sinalização MAPK e tumorigênese em células tireoidianas.

Rearranjos cromossômicos envolvendo um outro receptor do gene tirosina kinase NTRK1 (*Neutrophilic Tyrosine Kinase receptor 1*), conhecido como TRK, também ocorrem em carcinoma papilar, embora com prevalência significativamente baixa do que com rearranjos RET/PTC. Ocorrem até 10 - 15% de carcinoma papilar em alguns grupos de pacientes.

Outra via para o desenvolvimento tumoral é uma mutação ativadora do oncogene RAS que afeta principalmente os códons 12, 13 e 61. No caso de câncer de tireoide, as mutações no códon 61 dos genes NRAS e HRAS são mais frequentes. Mutações no gene RAS são responsáveis por 10 – 20% dos casos de câncer papilar, 40 – 50% de carcinoma folicular e 20 – 40% de carcinoma pouco diferenciado ou anaplásico (Nikiforov & Nikiforova, 2011).

Um outro oncogene que está envolvido na carcinogênese é o gene BRAF que pode ser ativado pela mutação pontual, pequenas deleções e inserções ou por rearranjo cromossômico onde mais de 40 diferentes mutações

têm sido identificadas. O mecanismo mais comum de ativação é, todavia, através de uma mutação pontual no gene que envolve a substituição de timina por adenina na posição 1799 da cadeia nucleotídica que resulta na substituição de valina por ácido glutâmico no resíduo 600 (BRAF^{V600E} ou BRAF^{Val600Glu}) que representa mais de 90% de todas as mutações encontradas no gene BRAF. Esta alteração genética é tipicamente encontrada em câncer papilar e em carcinoma anaplásico originário de papilar e não ocorre no folicular ou outro tipo de tumor tireoidiano (Xing, 2005; Leonardi *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013).

A mutação do gene BRAF está diretamente associada à progressão clínica, agressividade (metástase, invasão extratireoidiana), recorrência e falha no tratamento do câncer de tireoide e pode ser a mutação chave para o tratamento e diagnóstico do mais frequente câncer de tireoide, o papilar (Nucera *et al.*, 2010; Xing, 2010; Saiselet *et al.*, 2012).

1.1.4.5.2 Carcinoma folicular da tireoide (CFT)

O CFT é “um tumor maligno com evidência de diferenciação de células foliculares, mas sem características diagnósticas do carcinoma papilífero” (Chevallard *et al.*, 2004). Carcinomas foliculares são encapsulados e a invasão de vasos sanguíneos ou capsular é a chave para distinguir carcinomas foliculares. O CFT é dividido em duas categorias em função da agressividade: (1) minimamente invasivo ou capsulado e (2) amplamente invasivo. Existe pouca sobreposição entre os dois tipos (Melmed *et al.*, 2011).

Vários dados sobre a patogênese do câncer folicular indicam que a deficiência de iodo e bócio endêmico podem ser considerados fatores predisponentes para o desenvolvimento desse tipo de câncer. Um aumento do risco de câncer folicular tem sido relatado em áreas de deficiência de iodo e em áreas de bócio endêmico. A adição de iodeto à dieta resultou numa diminuição da incidência de câncer folicular (McHenry e Phitayakorn, 2011).

Outros fatores de predisposição ao câncer folicular incluem a ativação de oncogenes: mutações pontuais do gene RAS (aproximadamente 45% dos casos) que produzem continuamente ativação de sinais que conduzem ao crescimento descontrolado (McHenry e Phitayakorn, 2011) e o rearranjo

PAX8/PPARy (Saiselet *et al.*, 2012), resultante de uma translocação entre cromossomos 2 e 3 (Lacroix *et al.*, 2005)

Este rearranjo leva à fusão entre uma porção do gene PAX8 que codifica um fator de transcrição e o gene PPARy. Esta fusão resulta em uma forte “superexpressão” da proteína quimérica PAX8/PPARy, embora os mecanismos de sua atividade transformante não estejam totalmente elucidados. PAX8/PPARy é uma alteração típica encontrada em carcinoma folicular que ocorre com uma frequência de 30 – 35%. Em alguns estudos, este rearranjo tem sido encontrado em alguns adenomas foliculares (2 – 13%) e uma pequena proporção (1 – 5%) em variante folicular de carcinomas papilares. Rearranjo PAX8/PPARy e mutação pontual RAS raramente são encontrados no mesmo tumor, o que sugere que eles representam rotas patogênicas distintas no desenvolvimento de carcinomas foliculares. O oncogene RET parece não estar envolvido na tumorigênese de cânceres foliculares (Lacroix *et al.*, 2005).

1.1.4.5.3 Carcinoma medular de tireoide

O câncer medular da tireoide é responsável por menos de 10% de todas as doenças de tireoide. Ele é derivado das células C ou parafoliculares da tireoide. O tumor ocorre tanto de forma esporádica quanto hereditária, sendo esta última representando cerca de 20% do total.

Esse tipo de carcinoma está associado a mutações na linhagem germinativa do proto-oncogene RET que afetam resíduos ricos em cisteína nos domínios extracelular ou intracelular da tirosina kinase, levando a ativação constitutiva do receptor.

São, de modo geral, lesões circunscritas, raramente encapsuladas, sendo que mesmo lesões pequenas podem exibir padrão infiltrativo (Melmed *et al.*, 2011).

1.1.4.5.4 Carcinoma anaplásico de tireoide

O carcinoma anaplásico é um tumor indiferenciado do epitélio folicular da tireoide e constitui a forma mais agressiva de neoplasia maligna da tireoide (Wiseman, 2007). Representa cerca de 1 - 2% de todos os carcinomas da tireoide, normalmente ocorre após 60 anos de idade e é ligeiramente mais frequente em mulheres. Aproximadamente metade dos pacientes apresenta história de bócio multinodular, enquanto 20 a 30% apresentam concomitantemente um tumor tireoidiano bem diferenciado, geralmente carcinoma papilífero. Estes tumores podem surgir de novo ou através da dediferenciação de um carcinoma papilífero ou folicular bem diferenciado (Melmed *et al.*, 2011).

Carcinomas anaplásico e medular frequentemente apresentam progressivo acúmulo de alterações genéticas adicionais que não são encontradas no câncer bem diferenciado, o que sugere que possam representar eventos tardios da tumorigênese necessários para iniciar a dediferenciação tumoral. Estes eventos tardios incluem mutações dos genes TP53 e CTNNB1 (“catenin (*cadherin – associated protein*), beta 1, 88 kDa”) bem como as mutações em genes que codificam efetores da rota sinalizadora P13K – AKT.

Mutações pontuais que afetam o gene P53 que codifica a proteína p53, reguladora do ciclo celular, reparo e apoptose (Gauchotte *et al.*, 2011) são encontradas em 50 – 80% dos casos de carcinoma anaplásico. Elas são menos frequentes em carcinomas pouco diferenciado e são extremamente raras em câncer bem diferenciado. As mutações levam a perda de função deste importante gene supressor do tumor. Um outro gene frequentemente mutado em carcinoma anaplásico é o CTNNB1 que codifica uma β -catenina que está envolvida na adesão celular.

1.2 Diagnóstico e tratamento

O câncer de tireoide apresenta nódulos detectáveis através da palpação e mais frequentemente por ultrassom cervical. Para fins diagnósticos são utilizados dois importantes exames; o ultrassom (US) e/ou punção aspirativa com agulha fina (PAAF). Nódulos em estágios avançados podem ser detectados também por exames clínicos palpáveis.

O US da tireoide é uma técnica comum que é utilizada como um processo de diagnóstico de primeira linha para a detecção e caracterização de doença nodular da tireoide. Já a PAAF é realizada em qualquer nódulo da tireoide > de 1 cm, e naqueles <1 cm, se houver algum histórico clínico (irradiação de cabeça e pescoço, história familiar de câncer de tireoide, características suspeitas à palpação, presença de adenopatia cervical) ou suspeita de malignidade através do US.

Recentemente, vários estudos têm apontado os testes moleculares como a chave para um diagnóstico mais preciso, uma vez que a presença de mutação nos genes BRAF, RAS, RET/PTC e PAX8/PPAR γ está envolvida em cerca de 97% dos casos de câncer da tireoide (Nikiforov & Nikiforova, 2011; Pacini *et al.*, 2012).

Uma vez diagnosticado como câncer diferenciado da tireoide, o primeiro passo do tratamento é a cirurgia para remoção total ou parcial da glândula tireoide (tireoidectomia). Após esse procedimento, é indicado uma segunda etapa no tratamento (pacientes nos estágios 3 e 4 da doença), que consiste na ablação dos tecidos remanescentes da tireoide com ^{131}I . Essa metodologia auxilia na erradicação de qualquer foco microscópico que ainda possa existir na região (Cooper *et al.*, 2009). Para tanto, os pacientes necessitam apresentar níveis de TSH acima de 25 mUI/L para induzir a captação tanto para tecido “saudável” quanto dos tecidos tumorais. A preparação desse procedimento envolve dieta com baixo consumo de iodo e suspensão da reposição hormonal para elevação dos níveis de TSH (Reiners *et al.*, 2013).

1.3 Considerações gerais sobre radioiodoterapia

O ^{131}I é um componente essencial no tratamento de pacientes com doenças de tireoide (Sisson *et al.*, 2011). É um emissor de partículas beta ($E_{\text{máxima}} = 0,61 \text{ MeV}$ e $E_{\text{média}} = 0,20 \text{ MeV}$) e de raios gama ($E_{\text{média}} = 0,36 \text{ MeV}$), com meia vida física de 8 dias. Aproximadamente 90% dos efeitos secundários são resultantes da radiação beta que apresenta um alcance relativamente curto de cerca de 0,4 mm no tecido mole (Gutiérrez *et al.*, 1998). A sua ampla aplicação clínica, tanto para fins diagnósticos como terapêuticos desde os últimos 60 anos, se deve essencialmente a rapidez com que o ^{131}I é incorporado pelos restos de tecido tireoidiano, oferecendo uma indicação da atividade dos tecidos remanescentes do paciente.

A emissão beta do iodo radioativo rompe as ligações químicas dos constituintes celulares, infligindo danos severos em várias moléculas biologicamente importantes, entre as quais as moléculas de DNA, desencadeando a disfunção e finalmente a morte de células remanescentes da tireoide (Sundaram *et al.*, 2011). O uso do radioiodo consiste na administração via oral de uma cápsula gelatinosa incolor contendo iodeto de sódio (Na^{131}I) (IPEN, 2012) ou também em sua forma líquida, que é rápida e completamente absorvida pelo estômago (Sundaram *et al.*, 2011). Não há um consenso sobre a atividade ótima de ^{131}I para ablação entre vários centros de tratamento. No entanto, as atividades entre 3,7 – 7,4 GBq (100 – 200 mCi) de radioiodo são comumente usadas na tentativa de liberar doses de pelo menos 300Gy de radiação para remoção do tecido remanescente (Luster *et al.*, 2005), o que resulta na ablação com sucesso em pelo menos 75% dos pacientes (El-Refaei *et al.*, 2015). Assim, a administração pós-operatória de ^{131}I proporciona a erradicação de focos microscópicos de câncer e, dessa maneira, diminui o risco de recorrência da doença e a taxa de mortalidade. (Zanotti-Fregonara *et al.*, 2008).

Para ablação dos tecidos tireoidianos remanescentes ser eficaz através do ^{131}I , o paciente precisa ter nível de hormônio estimulador da tireoide (TSH) acima de 25 mUI/L (Luster, 2006; Borget *et al.*, 2008; Pacini e Castagna, 2008). Para tanto são indicados dois protocolos de preparo para o tratamento: a suspensão do hormônio tireoidiano ou a estimulação com r-hTSH exógeno.

No primeiro regime de tratamento, o paciente interrompe a ingestão dos hormônios T₄ (4 a 6 semanas) e/ou T₃ (2 a 3 semanas) para que as células tireoidianas realizem a máxima captação de iodo (Sapienza *et al.*, 2005; Tuttle, 2008). Porém, este procedimento acarreta o estado hipotireoideo nos pacientes, causando reações adversas como fadiga, depressão, distúrbio do sono, incapacidade para executar atividades diárias normais, resultando numa queda na qualidade de vida e causando uma incapacidade temporária para o trabalho (Borget *et al.*, 2007). Esse tratamento apresenta, portanto, um grande impacto na vida familiar, social, econômico e profissional dos pacientes (Schroeder *et al.*, 2006).

Como alternativa à suspensão do hormônio tireoidiano, foi desenvolvida uma preparação recombinante altamente purificada do TSH humano, o TSH humano recombinante (r-hTSH), que age elevando os níveis séricos de TSH, sem causar, no entanto, o quadro de hipotireoidismo em pacientes com CDT (Cole, 1993; Lippi *et al.*, 2001; Peroni *et al.*, 2002; Luster *et al.*, 2005).

1.4 Considerações gerais sobre r-hTSH

O TSH recombinante (r-hTSH) é de grande interesse clínico e tem sido amplamente utilizado para avaliação da função tireoidiana, melhoria na qualidade dos testes da tireoide em medicina nuclear e principalmente no diagnóstico e tratamento do câncer da tireoide (Damiani *et al.*, 2009).

Com a obtenção do r-hTSH tornou-se possível alcançar níveis relativamente elevados de TSH, sem a necessidade de um longo período de hipotireoidismo clínico. Desenvolvido por Weintraub e Szkudlinski em 1999, o r-hTSH foi inicialmente estudado e licenciado para uso diagnóstico. O uso terapêutico do r-hTSH foi somente aprovado pela Agência Europeia de Medicina e pela *Food and Drug Administration* nos Estados Unidos em 2005 e 2007, respectivamente (Pacini & Castagna, 2008), e também no Brasil em 2006 (Rosário *et al.*, 2009). As vantagens de r-hTSH incluem a prevenção de morbidade associada ao hipotireoidismo após suspensão de hormônios tireoidianos e manutenção da qualidade de vida (Luster *et al.*, 2005; Schroeder *et al.*, 2006; Duntas e Biondi, 2007).

O r-hTSH é vendido comercialmente pela empresa Genzyme com o

nome de Thyrogen[®]. É uma forma recombinante altamente purificada de hormônio estimulador da tireoide (TSH) humano, uma glicoproteína produzida pela tecnologia de DNA recombinante. A tirotrofina alfa é sintetizada em linhagem de células ovarianas de hamster Chinês (CHO), modificadas geneticamente. A tirotrofina alfa é uma glicoproteína heterodimérica que consiste de duas subunidades ligadas de forma não covalente: uma subunidade alfa de 92 resíduos de aminoácidos contendo dois sítios de glicosilação ligados ao N e uma subunidade beta de 118 resíduos contendo um sítio de glicosilação ligado ao N (Damiani *et al.*, 2009).

A Tabela 3 mostra alguns benefícios da terapia utilizando r-hTSH em vez da terapia de suspensão de hormônio tireoidiano em pacientes com CDT. Taxas similares de ablação foram obtidas tanto com r-hTSH como com a suspensão do L-T4. Mas com o r-hTSH, a eliminação renal do radioiodo é cerca de 50% mais rápida (Luster *et al.*, 2005), assim reduzindo a retenção no corpo inteiro e, conseqüentemente, acarretando doses mais baixas nos tecidos extratireoidianos, resultando num encurtamento de estadia no hospital (Borget *et al.*, 2008). Quando comparada com a suspensão do hormônio, a utilização de r-hTSH tem mostrado eficácia similar, mantendo a qualidade de vida dos pacientes, além de mostrar um risco mais baixo de radiotoxicidade sem comprometer a sua eficácia. Em termos de impacto econômico, para os pacientes ativos, o tratamento com r-hTSH reduz a duração e o custo de hospitalização quando comparado ao tratamento convencional o que pode compensar os custos relativamente altos de aquisição do r-hTSH (Borget *et al.*, 2007; 2008; Remy *et al.*, 2008).

A redução de cerca de 33% da exposição à radiação de corpo inteiro devida ao rápido “clearance” renal (Luster *et al.*, 2005; Tuttle *et al.*, 2008), diminuindo assim a dose de radiação deliberada nos tecidos extratireoidianos, é um dos aspectos importantes da terapia com rec-hTSH. Isto deve ser salientado especialmente, se levar em consideração os efeitos colaterais adversos da terapia ablativa com ¹³¹I, visto que tecidos sadios são também expostos à radiação: radiotireoidite, sintomas gastrointestinais, alteração do paladar, risco maior de indução de tumores secundários e danos genéticos estocásticos decorrentes da terapia com radioiodo não podem ser também descartados (Seidlová-Wuttke *et al.*, 1996).

Tabela 3 - Comparação entre a terapia utilizando r-hTSH e aquela com suspensão de hormônio tireoidiano, antes da administração de 3,7GBq (100 mCi) de ^{131}I em pacientes com câncer diferenciado da tireoide.

Parâmetro	r-hTSH	Suspensão do L-T4	Referência
Ablação	Taxa similar de sucesso	Taxa similar de sucesso	Pacini, Castagna, 2008 Borget <i>et al.</i> , 2008 Rosario <i>et al.</i> , 2008
Eliminação renal do ^{131}I	Mais rápida	Mais lenta	Luster <i>et al.</i> , 2005
Qualidade de vida	Estado eutireoideo Positivo	Estado hipotireoideo Negativo	Pacini, Castagna, 2008
Radiotoxicidade	Mais baixa	Mais alta	Rosario <i>et al.</i> , 2008
Risco de crescimento tumoral	Diminui	Aumenta	Zanotti-Fregonara <i>et al.</i> , 2008
Dose extratireoidiana (sangue e corpo inteiro)	Mais baixa (0,40 Gy no sangue)	Mais alta (0,62 Gy no sangue)	Luster <i>et al.</i> , 2005 Hanscheid <i>et al.</i> , 2006 Rosario <i>et al.</i> , 2008
Necessidade de hospitalização	11%	33 %	Borget <i>et al.</i> , 2007 Borget <i>et al.</i> , 2008 Remy <i>et al.</i> , 2008
Duração média de internação	Mais curta (3,1 dias)	Mais longa (11,2 dias)	Borget <i>et al.</i> , 2007 Borget <i>et al.</i> , 2008
Custos indiretos devido à ausência ao trabalho	€ 454 $\pm$ 1673	€ 1537 $\pm$ 2899	Borget <i>et al.</i> , 2007 Borget <i>et al.</i> , 2008

A despeito da reconhecida eficácia terapêutica da utilização do ^{131}I e do r-hTSH (Thyrogen[®]) em pacientes com CDT, pouco se sabe sobre o impacto que o tratamento com r-hTSH associado ao ^{131}I pode causar em nível celular, e consequentemente aos indivíduos, em relação ao tratamento convencional. Para o nosso conhecimento, um dos dois trabalhos que avaliaram os efeitos do ^{131}I associado ao r-hTSH citogeneticamente foi desenvolvido primeiramente no nosso laboratório (da Silva *et al.*, 2008), utilizando modelo animal por meio da técnica de aberrações cromossômicas (AC). O outro trabalho comparou a frequência de translocações cromossômicas entre pacientes eutireoideos pré-tratados com r-hTSH e pacientes hipotireoideos após a suspensão prolongada de L-T4, antes e 45 dias após a administração do radioiodo (Frigo *et al.*, 2009). No entanto, os autores adotaram somente um tipo de AC (translocação) para a análise que foi efetuada 45 dias após a exposição ao ^{131}I .

Outro aspecto importante que merece ser salientado é que cerca de 25% dos tumores primários diferenciados da tireoide e 50% das metástases são resistentes a iodoterapia. Essa baixa captação de iodo radioativo em pacientes com CDT é a principal responsável pelo relativo insucesso de ablação, o que leva a uma taxa significativa de morbidade e mortalidade dos pacientes com CDT (Zarnegar *et al.*, 2002; Kleiman *et al.*, 2013).

1.5 Considerações gerais sobre técnicas citogenéticas

Uma das características relevantes da técnica citogenética é que ela permite visualizar e quantificar danos induzidos por agentes genotóxicos especificamente em nível cromossômico, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Assim sendo, uma série de metodologias tem sido desenvolvidas e aperfeiçoadas e entre elas se destacam as técnicas de trocas entre cromátides-irmãs, hibridização *in situ* fluorescente (FISH), aberrações cromossômicas e micronúcleos que são amplamente utilizadas para diferentes finalidades em vários laboratórios do mundo.

1.5.1 Técnica de aberrações cromossômicas (ACs)

A análise de aberrações cromossômicas (ACs) é um teste de mutagenicidade para detecção de alterações numéricas e estruturais de cromossomos, sendo um dos poucos métodos diretos para mensurar mutações em sistemas expostos a mutagênicos ou carcinogênicos genotóxicos. Trata-se de um teste amplamente difundido no mundo inteiro pela sua sensibilidade e pela riqueza de informações, aplicável tanto em sistemas biológicos *in vitro* como *in vivo*.

As ACs estruturais são resultantes de lesões induzidas no DNA celular pelos agentes físicos, químicos ou biológicos. Dentre eles, a radiação ionizante produz diferentes tipos de lesões primárias do DNA: quebras na fita simples ou dupla, dano de base, ligações cruzadas entre DNA – DNA, DNA – proteína etc.

Muitas dessas lesões são, contudo, reparadas rapidamente para reverter à configuração original pela maquinaria de reparo celular. Somente uma fração muito pequena dessas lesões não reparadas ou erros no reparo dão origem a AC produzindo, respectivamente, deleções terminais e vários tipos de aberração de rearranjo. As quebras nas cadeias duplas do DNA são lesões fundamentais para a formação de AC, que podem ocorrer espontaneamente ou induzidas pelos agentes clastogênicos.

Dessa maneira, as ACs não são meramente o resultado de uma interação direta entre um mutagênico e o DNA celular. Sua produção envolve também o processo de reparo. Uma AC é, portanto, o resultado de conjunto da ação de um clastogênico e dos eventuais erros causados pelos mecanismos de reparo celular, quando agem sobre as lesões primárias induzidas. Uma exceção a este conceito pode ser uma quebra no cromossomo, resultando em uma deleção terminal.

As ACs podem ser induzidas em qualquer fase do ciclo celular. Elas são melhor visualizadas, porém, na metáfase ou na anáfase, quando os cromossomos estão no seu estado de máxima condensação e facilmente identificados e caracterizados como estruturas independentes.

As ACs estruturais são classificadas de acordo com a porção afetada dos cromossomos: tipo cromossômico ou isocromatídico, quando envolve ambas as cromátides-irmãs e tipo cromatídico, somente uma das cromátides-irmãs é afetada (Buckton & Evans, 1973).

Do ponto de vista da análise ao microscópio óptico, vários tipos de ACs estruturais podem ser visualizados em células de mamíferos expostas a agentes genotóxicos (Figuras 6 e 7):

- **Cromossomo dicêntrico:** resulta da junção de extremidades quebradas de dois cromossomos diferentes com centrômeros, produzindo um fragmento acêntrico.

- **Anel cromossômico:** resultante de duas quebras ocorridas, uma em cada braço do mesmo cromossomo, com posterior junção das extremidades quebradas originando um fragmento acêntrico.

- **Fragmento acêntrico:** são estruturas em pares sem a presença de um centrômero, resultantes de quebras ocorridas nos cromossomos ou nas cromátides (deleção terminal).

- **Double minute:** estrutura pareada, menor que o fragmento acêntrico, proveniente de quebras e deleções ocorridas no mesmo cromossomo (deleção intersticial).

- **Translocação:** ocorre quando há uma troca de um fragmento de um cromossomo para outro cromossomo não-homólogo.

- **Inversão:** resultante de duas quebras no mesmo braço cromossômico, seguido de inversão do segmento e sua reincorporação no cromossomo

INTRACHANGES	NORMAL	TERMINAL DELETION	INTERSTITIAL DELETION	CENTRIC RING AND FRAGMENT	ACENTRIC RING	PERICENTRIC INVERSION

INTERCHANGES	NORMAL		DICENTRIC AND FRAGMENT		SYMMETRICAL INTERCHANGE

Figura 6 – Desenho esquemático dos principais tipos de aberrações cromossômicas estruturais encontrados em células de mamíferos expostas a agentes genotóxicos (Adaptado de Buckton e Evans, 1973).

- **Quebra cromossômica:** é uma descontinuidade maior que a largura de ambas as cromátides de um mesmo cromossomo, originando um fragmento acêntrico. As duas cromátides são afetadas.
- **Quebra cromatídica:** é uma descontinuidade maior que a largura das cromátides, na qual existe um desalinhamento evidente. Somente uma das cromátides é afetada.
- **Falha (gap) cromossômica:** é uma descontinuidade menor do que a largura das cromátides. As duas cromátides são afetadas e há um alinhamento cromossômico.
- **Falha (gap) cromatídica:** é uma descontinuidade menor do que a largura da cromátide na qual existe um alinhamento cromossômico. Somente uma das cromátides é afetada.

Quebra cromatídica	Quebra cromossômica	Falha cromossômica	Falha cromatídica

Figura 7 – Desenho esquemático mostrando quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas.

1.5.2 Técnica do micronúcleo (MN)

A avaliação da frequência de MNs em linhagens celulares é extensivamente utilizada na epidemiologia molecular e citogenética para determinar a presença e extensão de dano cromossômico. Pode-se afirmar que o teste detecta agentes clastogênicos e aneugênicos que interferem no fuso mitótico, os quais afetam a distribuição equitativa dos cromossomos na divisão celular (Fenech *et al.*, 1999).

O teste de MN foi desenvolvido primeiramente por Schmid em 1975, em células de medula óssea de camundongos. Em 1976, Countryman e Heddle publicaram os primeiros resultados mostrando uma relação quantitativa entre a frequência de MNs e a dose de radiação em linfócitos humanos. A desvantagem dessa técnica era de não permitir a distinção entre as células que, em cultura, haviam passado por um ciclo de divisão e aquelas que não haviam se dividido.

Para contornar esta situação, Fenech e Morley, em 1985, introduziram pela primeira vez o uso da citocalasina B para bloquear a citocinese celular, mas não a cariocinese, diferenciando as células que passaram por um ciclo de divisão. A citocalasina B é uma substância isolada do fungo *Helminthosporium dematoideum*, e é um inibidor de polimerização de actina, componente do microfilamento responsável pela citocinese. Dessa maneira, a citocalasina-B impede a divisão do citoplasma, mas não a divisão do núcleo (Figura 8) e consequentemente, as células tratadas apresentam um

aspecto binuclear. O ensaio ficou conhecido como técnica do micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN, *cytokinesis-block micronucleus*).

FIGURA 8– Bloqueio da citocinese induzido pela citocalasina-B e a consequente obtenção de células binucleadas (Fenech e Morley, 1985).

A CBMN é o método preferencial para a avaliação de MNs em cultura de células humanas e/ou de outros mamíferos, pois, a contagem é especificamente restrita às células que passam por um ciclo de divisão, identificadas pelo seu aspecto binuclear e permite uma análise mais rápida que a técnica convencional de AC. Na análise das células binucleadas, pode-se visualizar além dos MNs, que correspondem a fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incorporados pelos núcleos-filhos, as pontes nucleoplasmáticas (PNPs) que por sua vez ocorrem, por exemplo, quando os centrômeros de cromossomos dicêntricos são transferidos para os pólos opostos da célula, sendo possível visualizar material nuclear unindo dois núcleos-filhos. Pode-se visualizar também os brotos (*buds*) nucleares, que são considerados como um indicador de amplificação gênica na periferia nuclear. Resumindo, utilizando a técnica do MN, é possível avaliar a frequência de quebra e perda cromossômicas, rearranjos cromossômicos (PNP) e amplificação gênica (*bud*). Além desses parâmetros, é possível avaliar necrose e apoptose (Figura 9), e a cinética de proliferação celular, levando-se em consideração além das células binucleadas, também células mono e multinucleadas (Fenech *et al.*, 2007).

Figura 9 – Fotomicrografias de células analisadas através do ensaio do micronúcleo. (a) célula mononucleada; (b) célula binucleada; (c) célula multinucleada; (d) célula necrótica; (e) célula apoptótica; (f) célula binucleada contendo um micronúcleo; (g) célula binucleada contendo um micronúcleo e uma ponte e (h) célula binucleada contendo dois brotos nucleares (Adaptada de Fenech, 2007)

A importância desses testes citogenéticos está no seu papel indicativo; uma alta frequência de AC e/ou MN pode estar correlacionada com o aumento de dano ao DNA, o que implica em um maior risco de desenvolver, por exemplo, câncer ou anomalias genéticas.

2 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

O objetivo desse trabalho foi analisar danos cromossômicos induzidos pelo radioiodo em linfócitos periféricos de pacientes com CDT nos dois procedimentos terapêuticos (precedidos ou não com r-hTSH), levando-se em consideração efeitos agudos (24h, 1 semana e 1 mês) e tardios (1 ano) após o tratamento com ^{131}I . Paralelamente, propusemos fazer uma estimativa de dose absorvida de corpo inteiro, 24h após a administração do ^{131}I nos dois grupos de pacientes, utilizando o método de dosimetria biológica, baseando-se nas frequências de cromossomos dicêntricos encontrados nos linfócitos circulantes dos pacientes.

Outra abordagem do presente estudo consistiu em realizar uma análise em células tireoidianas tumorais (células WRO) *in vitro* para averiguar efeitos de radioiodo e da irradiação externa de gama de ^{60}Co . Estas células carregam mutações nos genes BRAF, RAS e P53, que estão envolvidas por cerca de 25% de insucesso da terapia com radioiodo em pacientes com CDT. Para tanto, propusemos ensaios citotóxicos, genotóxicos e de captação de radioiodo em células WRO, tratadas ou não com r-hTSH, irradiadas com ^{131}I e ^{60}Co para a análise da radiosensibilidade celular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Pacientes

Todos os pacientes apresentavam CDT sem metástase, com tireoidectomia parcial ou total, diagnosticados pelo Setor de Endocrinologia da FMUSP, sem exposição prévia à radioterapia externa ou ao ^{131}I . Os pacientes foram divididos em 2 grupos: grupo A (n=11; 10 mulheres e 1 homem; 10 indivíduos com carcinoma papilar e 1 com carcinoma folicular; idade média de 45,4 anos) foi submetido ao protocolo do Centro de Medicina Nuclear da FMUSP que consistiu na administração intramuscular de r-hTSH (Thyrogen[®], Genzyme Corporation, Cambridge, MA, EUA) (0,9 mg por dois dias consecutivos) antes da terapia ablativa com ^{131}I enquanto recebia terapia hormonal com tiroxina (L-T4), ao passo que o grupo B (n=10; 9 mulheres e 1 homem; 8 indivíduos com carcinoma papilar e 2 indivíduos com carcinoma folicular; idade média de 48,2 anos) foi submetido ao tratamento com radioiodo após a suspensão de hormônio tireoidiano por 4 semanas visando estimular a captação tireoidiana. As amostras sanguíneas (3 mL) de cada paciente foram coletadas por punção venosa em seringas e agulhas estéreis descartáveis, previamente heparinizadas, por enfermeiras do Centro de Medicina Nuclear e Hospital das Clínicas, sem nenhum risco ou desconforto para a saúde dos pacientes. Para a avaliação dos efeitos agudos com base nos danos cromossômicos, as amostras sanguíneas foram coletadas antes da aplicação do Thyrogen[®] (grupo A) (basal), ou antes, da administração do ^{131}I (grupo B) (basal) 24 horas, 1 semana e 1 mês e, igualmente para efeitos tardios, 1 ano após a administração do radioiodo para o acompanhamento citogenético, com base nos dados da literatura (M'Kacher *et al.*, 1996; Gutiérrez *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2004; Erselcan *et al.*, 2004). A atividade de radioiodo (cápsula de Na^{131}I) foi de 4995 a 7030 MBq (135 a 190 mCi) administrado via oral para ablação do tecido tireoidiano remanescente, e no caso do grupo A, 24-36h após a injeção de Thyrogen[®].

Os dados individuais dos pacientes estão apresentados na tabela 4. Todos os dados referentes aos pacientes foram fornecidos pelo Centro de Medicina Nuclear da FMUSP.

Tabela 4- Dados de pacientes submetidos à terapia com r-hTSH antes da administração do radioiodo (Grupo A, n=11) e pacientes hipotireodianos tratados somente com radioiodo (Grupo B, n=10).

GRUPO	DOADOR	IDADE (anos)	SEXO	PESO (Kg)	ATIVIDADE TOTAL ADMINISTRADA (MBq)	NÍVEL DE TSH (mUI/L)
A r-hTSH + ¹³¹ I	P1	27	F	136.0	5032	76.30
	P2	62	F	56.0	5797	183.10
	P3	31	F	56.0	6031	113.52
	P4	54	F	96.2	4995	144.46
	P5	48	F	98.0	5735	86.66
	P6	30	F	76.9	5735	81.91
	P7	64	F	61.5	6327	220.10
	P8	30	M	95.0	5735	154.06
	P9	50	F	110.3	5772	83.68
	P10	54	F	69.5	5994	-
	P11	50	F	76.0	6068	78.32
Média ± DP		45.4 ± 13.56	10F/1M	84.67 ± 25.01	5747.45 ± 407.61	122.21 ± 50.86
B ¹³¹ I	P12	59	F	-	6105	96.31
	P13	37	F	-	5846	163.83
	P14	51	F	87.0	6660	91.27
	P15	58	M	-	5402	150.63
	P16	25	F	48.0	5957	254.66
	P17	56	F	70.0	7030	94.75
	P18	60	F	70.0	6031	150.28
	P19	32	F	64.0	6068	141.07
	P20	47	F	70.1	5846	87.15
	P21	57	F	63.0	6068	102.19
Média ± DP		48.2 ± 12.58	9F/1M	67.44 ± 11.63	6101.30 ± 449.94	133.21 ± 51.67

Todos os doadores foram submetidos a um questionário para a coleta de dados complementares, como hábitos alimentares, estilo de vida, história médica, fumantes ou não, entre outros, além de todos eles fornecerem consento informado por escrito. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da FMUSP em 24/02/2011 (número 0741/10) e pela FAPESP (processo 2010 / 51417-0).

3.1.2 Doadores sadios

Para a estimativa de dose absorvida de ^{131}I pela dosimetria biológica nos pacientes foi necessária a elaboração de curva dose-resposta baseada nas amostras sanguíneas de doadores sadios. Para tanto, foram coletadas amostras sanguíneas de 5 indivíduos sadios (grupo C), 2 do sexo masculino e 3 do sexo feminino, com idade variando de 29 – 48 anos (idade média de 37,4 anos), sem indicação de prévia exposição ocupacional, acidental ou médica à radiação no momento da coleta das amostras sanguíneas.

3.1.3 Linhagem celular WRO

Foi utilizada uma linhagem tumoral de tireoide humana, células WRO (UCLA RO 82 W-1), originárias de tecido metastático, obtidas de uma paciente com carcinoma microfolicular de tireoide (Estour *et al.*, 1989), gentilmente cedida pela professora Dra Janete M. Cerutti da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). As células WRO foram descritas como sendo portadoras de mutações nos genes RAS (*Rat sarcoma viral oncogene homolog*), p53 e BRAF (*V-raf murine oncogene homolog B*) (Latini *et al.*, 2008).

As células foram cultivadas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 (Cultilab, Campinas, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma, St Louis, Mo, EUA). A linhagem celular foi mantida a 37°C com 5% de CO₂ em atmosfera úmida (Figura 10).

FIGURA 10 – Fotomicrografia de células WRO em seu respectivo meio de cultura. Aumento de 100x.

3.2 Métodos

3.2.1 Ensaio de genotoxicidade

3.2.1.1 Técnica de aberrações cromossômicas (linfócitos periféricos e células WRO)

A amostra sanguínea de pacientes e de indivíduos sadios (1 mL), foi cultivada com meio RPMI (Cultilab, Campinas, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (3 mL) (Sigma, St Louis, Mo, EUA), 1% de antibióticos (Gibco MRL., EUA), 100 µL de fitohemaglutinina (5 µg/mL, GibcoMRL., EUA) e 60 µL de BrdU (5µg/mL) (Gibco MRL., EUA) por 48 horas em estufa a 37°C. Após 46 horas de cultivo foram adicionadas 40µL de colchicina (0,7µg/mL) (Sigma, St Louis, Mo, EUA) para a obtenção de um número maior de metáfases. Ao completar 48 horas de cultivo, as células foram hipotonizadas com cloreto de potássio (Merck, Darmstadt, Dinamarca) e citrato de sódio (Merck, Darmstadt, Dinamarca) (3:1), fixadas com metanol e ácido acético (3:1) e gotejadas em lâminas histológicas aquecidas a 65°C em atmosfera úmida. Após esse processo, as lâminas foram coradas com 1 mL de Hoechst 33258 (5µg/mL) (GibcoMRL., EUA) em 200 mL de água destilada, cobertas com 0,5 mL de tampão Mc Ilvaine (pH 8,0) e expostas à luz ultra violeta (254 nm) por 20 minutos em placa aquecida a 60°C. Após esse período, as lâminas foram lavadas em água destilada e coradas com 5% de Giemsa (Sigma, St Louis, Mo, EUA) em tampão fosfato (pH 6,8) por 10 minutos.

A análise de cada amostra foi realizada em microscópio óptico NIKON (Eclipse, 80i, Japão), utilizando a objetiva de imersão (100x). Foram analisados diferentes tipos de aberrações cromossômicas estruturais, classificados de acordo com os critérios adotados pela Agência Internacional de Energia Atômica(AIEA, 2001), considerando também o número de cromossomos e células nos diferentes ciclos da divisão mitótica.

O mesmo protocolo citogenético utilizado para a análise de linfócitos sanguíneos foi empregado também para células WRO. No entanto, em vez de 48 horas de cultivo, as células permaneceram por 96 horas em decorrência do seu período mais longo de duplicação celular. Assim a colchicina foi adicionada 92 horas após o início do cultivo.

3.2.1.2 Técnica do micronúcleo em células WRO

Para avaliação citogenética de danos induzidos pelo ^{131}I em células WRO com e sem r-hTSH foi utilizado o teste do micronúcleo (MN) pelo método do bloqueio citocinético utilizando citocalasina- B (Fenech e Morley, 1985) com algumas alterações (Murakami et al., 2004). O método consiste em adicionar citocalasina-B que impede a citocinese (divisão do citoplasma) sem afetar a cariocinese (divisão do núcleo) e assim dependendo do número de divisões pelas quais as células passam, essas podem apresentar dois ou mais núcleos.

Células WRO em crescimento exponencial foram divididas em 2 grupos: grupo que recebeu pré-estímulo com r-hTSH (0,4 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas e aquele que recebeu somente ^{131}I . Ambos os grupos foram expostos às diferentes concentrações radioativas de radioiodo (0,07 – 3,70 MBq) por 24 horas a 37°C com 5% de CO_2 . A seguir, as células dos 2 grupos foram lavadas 3 vezes com PBS, permanecendo no meio RPMI fresco. A citocalasina-B (2 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionada à cultura 48 horas após a exposição com o radioiodo para indução de células binucleadas.

Após 48 horas de incubação com citocalasina B, as células foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspensas em solução isotônica de NaCl (0,85%), fixadas com metanol e ácido acético (3:1), gotejadas sobre lâminas histológicas sob vapor a 65°C, secas e coradas com 5% de Giemsa em tampão fosfato (pH 6,8) por 10 minutos.

Para a identificação de micronúcleos foram adotados os critérios estabelecidos pela AIEA (2001): só foram quantificados micronúcleos em células binucleadas com citoplasma preservado, com coloração igual à do núcleo principal e que não estavam em contato com o núcleo principal. Células com mais de 5 micronúcleos não foram consideradas. Dois parâmetros foram levados em consideração: incidência de células afetadas (% de células binucleadas com MN) e grau de dano intracelular (número de MN/célula).

Além do MN foi levado em consideração a presença de células binucleadas com pedúnculo (*nuclear budding*), uma expansão do núcleo conectada por material nucleoplasmático e a ponte anafásica (*anaphase bridge*) entre os núcleos de células binucleadas, com base nos critérios adotados por Fenech (2007).

Foram analisadas no mínimo 500 células binucleadas (CB) por concentração radioativa, onde também foram quantificadas células mononucleadas (CM) e multinucleadas (CMu) com ou sem micronúcleos para o cálculo do índice de proliferação (IP) que avalia a cinética de divisão celular (Surralles *et al.*, 1992), segundo a equação:

$$IP = (n^{\circ} \text{ de CM} + 2 \times n^{\circ} \text{ de CB} + 3 \times n^{\circ} \text{ de CMu}) / \text{total de células}$$

Foram realizados no mínimo três ensaios independentes. Todas as lâminas foram identificadas e analisadas no microscópio óptico Nikon (Eclipse, 80i, Japão) no aumento de 400 vezes.

3.2.2 Cálculo da dose absorvida de ^{131}I

Para estimar a dose absorvida recebida pelos pacientes após 24 horas de administração com ^{131}I , as frequências de dicêntricos em linfócitos *in vivo* foram comparadas com os dados de linfócitos de doadores sadios obtidos após 24 horas de exposição *in vitro* por meio da elaboração de curva dose-resposta. Para correlacionar a atividade de ^{131}I (MBq) com a correspondente dose absorvida (Gy) foi utilizado o programa Monte Carlo N- *Particle Transport Code* realizado pelo pesquisador Dr. Hélio Yoriyaz do Centro de Engenharia Nuclear/IPEN.

Para a construção de curva atividade-resposta *in vitro* as amostras sanguíneas obtidas de doadores sadios foram expostas a diferentes concentrações radioativas de ^{131}I (0,074 a 0,740 MBq/mL) e mantidas durante 24h a 37°C. Este período de tempo foi escolhido levando-se em consideração o período de captação máxima do ^{131}I pela glândula tireoide *in vivo*, que é da ordem de 12 a 25h (Zanzonico, 1997; Moka *et al.*, 2002).

A faixa de atividade do radioiodo foi escolhida considerando um homem referência de 70Kg de peso corpóreo com 5L de sangue recebendo uma atividade oral de 3,7Gbq de ^{131}I . As soluções de Na^{131}I usadas nos ensaios foram fornecidas pelo Centro de Radiofarmácia do IPEN-CNEN/SP.

A fim de simular as atividades de radioiodo no corpo humano, diferentes volumes de solução de Na^{131}I foram adicionados às amostras contendo 1 mL de sangue e 3 mL de meio de cultura, de modo a obter as atividades de ^{131}I de 0,074-0,740 MBq / mL (2 a 20 $\mu\text{Ci/mL}$). As amostras resultantes, em seguida, foram mantidas por 24 horas a 37°C. Para a simulação por meio do programa Monte Carlo, admitiu-se que o ^{131}I permaneceu distribuído homogeneamente em todo o volume e em contato direto com o sangue durante 24 h. Também um fator de 0,9585 foi aplicado por conta da correção do decaimento do radioiodo. O espectro de emissão de energia de fótons foi tomado a partir do Centro Nacional de Dados Nucleares (NNDC) (<http://www.nndc.bnl.gov/mird/>).

3.2.3 Cálculo do tempo de duplicação em células WRO

Para os ensaios citotóxicos e/ou genotóxicos é importante saber o tempo de duplicação das células. Assim sendo, foram semeadas 1×10^4 células WRO por poço, em triplicatas e em duas placas de 24 poços. O número de células foi contado diariamente durante um período de 20 dias em câmara de Neubauer, utilizando corante *Trypan Blue*. O tempo de duplicação foi calculado através da equação $Y=Y_0e^{(kX)}$, onde Y é o número de células encontradas, Y_0 é o número inicial de células, K é a constante do modelo e X é o tempo de duplicação em horas.

3.2.4 Ensaio de citotoxicidade com ^{131}I e ^{60}Co em células WRO

Para a avaliação da citotoxicidade em células WRO submetidas à ação do ^{131}I foi utilizado o teste da viabilidade celular. Para tanto, foi adotado o método colorimétrico utilizando MTS e PMS (Promega, Madison, EUA). O ensaio tem como princípio avaliar a capacidade de células vivas em reduzir o composto MTS (tetrazolium 3-(4,5-dimetiliazol-2-yl)-5-(3-carboxi-metoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazolium), na presença de PMS (metossulfeto de fenazina) (Sigma, St Louis, Mo, EUA) em um produto formazan solúvel em meio de cultura, graças às enzimas desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas (Cory *et al.*, 1991).

A quantidade de produto formazan formado é determinada pela absorbância a 490 nm e é proporcional ao número de células viáveis em

cultura. A principal vantagem desse método é a rapidez na obtenção de dados permitindo a análise de várias amostras ao mesmo tempo.

As células foram expostas a diferentes concentrações radioativas de ^{131}I (0,07 a 3,70 MBq/mL ou 2 a 100 $\mu\text{Ci/mL}$) por 24 horas, com e sem r-hTSH (0,4 $\mu\text{g/mL}$), semeadas em placas de 96 poços, contendo 5.000 células em um volume final de 100 $\mu\text{L/poço}$. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, permanecendo em meio de cultivo a 37°C e com 5% de CO_2 . A densidade celular foi determinada após 96 horas de incubação, adicionando 20 $\mu\text{L/poço}$ de solução composta de MTS (2 mg/mL de PBS) e PMS (0,92 mg/mL de PBS), na proporção de 20:1. A leitura da absorbância foi realizada a 490 nm diretamente na placa de 96 poços utilizando um leitor de ELISA (Multiskan EX, *Thermo Eléctron Corporation*, EUA), uma hora após a adição do corante. Foram realizados 3 ensaios independentes.

Para a avaliação citotóxica da irradiação externa com ^{60}Co , as células WRO na fase exponencial de crescimento foram acondicionadas em tubos Eppendorf contendo 1×10^6 células/mL e irradiadas no Centro de Tecnologia das Radiações (IPENCNEN/SP) em uma fonte de ^{60}Co (*Gammacell 220 Irradiation Unit of the Canadian Atomic Energy Commission, Ltd*) nas doses de 0,2; 0,4; 0,6; 1,2; 1,6; 4,2 e 8,3 Gy (1,019 kGy/h) a temperatura ambiente. O mesmo protocolo colorimétrico utilizado para radioiodo, foi adotado também para a irradiação externa com ^{60}Co .

Além do ensaio citotóxico pelo método colorimétrico, a viabilidade de células WRO irradiadas com doses mais altas de ^{60}Co , foi acompanhada ao longo do tempo após a irradiação. Para tanto, 1×10^4 células WRO por poço, em placas de 24 poços, em triplicatas, foram expostas com doses de 4, 10, 20 e 40 Gy (3,057 kGy/h), onde o número de células foi contado diariamente em câmara de Neubauer durante um período de 11 dias.

3.2.5 Ensaio de captação de ^{131}I pelas células WRO

Para averiguar a influência de r-hTSH na captação do radioiodo *in vitro* foram semeadas 3×10^4 células/mL em placas de 96 poços, expostas a diferentes atividades de ^{131}I (0,74; 1,85 e 3,70 MBq/mL) com e sem pré-estimulação de r-hTSH (0,4 $\mu\text{g/mL}$) por 24h. Após o período de incubação com radioiodo, as amostras foram lavadas com meio RPMI para a retirada de todo

radioiodo e a seguir, foi adicionado corante MTS-PMS, onde a leitura de absorbância a 490 nm foi efetuada no leitor ELISA, 1 hora após a adição do corante (vide item 3.2.4). A seguir, as células foram tripsinizadas e centrifugadas, onde o sobrenadante e o *pellet* foram analisados em um contador Gama (modelo Cobra auto-gamma, PACKARD, Canadá). A partir da densidade óptica obtida para cada amostra, pode-se obter o número de células correspondente através de uma curva-padrão estabelecida (número de células versus absorbância). Os dados foram expressos em número de contagem por minuto por célula (CPM/Célula).

3.2.6 Análise estatística

Toda a análise foi feita utilizando o programa GraphPad Prism (versão 5,0) para a elaboração de gráficos e tabelas. A curva atividade-resposta obtida para indução de dicêntricos foi ajustada através do modelo linear-quadrático, de acordo com a equação $Y = \alpha A + \beta A^2$, onde Y é a frequência de dicêntricos, α e β são os coeficientes do modelo e A é a atividade em MBq/mL. Os dados obtidos foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão.

Para verificar as diferenças entre valores basais e diferentes concentrações radioativas, aplicou-se a análise de variância (Two-way ANOVA Kruskal-Wallis). Para comparação dos dados obtidos entre as médias foi utilizado o teste t de *Student*, onde o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

Foram analisadas ao todo 116 amostras sanguíneas de 21 pacientes com câncer diferenciado de tireoide (CDT), tireodectomizados, sendo 11 pacientes preparados para terapia com r-hTSH(grupo A) e 10 pacientes com suspensão do hormônio tireoidiano L-T4 (grupo B) (Tabela 4).

Os pacientes dos dois grupos foram comparáveis ($p>0,05$) em termos de gênero, idade, atividade administrada de radioiodo e nível de TSH antes da administração do radioiodo. O grupo A apresentou um valor médio basal de TSH de 8,47 mUI/L (faixa de 0,03 – 37,75) e uma elevação no nível sérico de TSH para 122 mUI/L após a segunda a injeção do r-hTSH. Um valor médio similar de 133,21 mUI/L foi encontrado no grupo B antes da administração do ^{131}I (dados fornecidos pelo Centro de Medicina Nuclear – FMUSP).

A análise citogenética mostrou a presença de vários tipos de aberrações cromossômicas estruturais, entre os quais dicêntricos, fragmentos acêntricos, *double minute*, *gaps* e quebras (Figura 11).

Figura 11 – Fotomicrograficas obtidas de linfócitos, mostrando metáfases com aberrações: (A) *double minute*, (B) dicêntrico e fragmento, (C) *gap* cromatídico, (D) anel.

A Figura 12 mostra as frequências individuais de aberrações cromossômicas encontradas *in vivo* em função do tempo após a administração de ^{131}I , obtidos a partir de linfócitos periféricos de todo o grupo estudado (grupos A + B). Um aumento na frequência de células com AC foi observado 24h após a administração de ^{131}I em relação aos valores basais nos dois grupos de pacientes. Houve um declínio gradual nos três parâmetros, isto é, porcentagem de células com AC (Figura 12 A), número de AC / célula (Figura 12 B) e número de dicêntricos / célula (Figura 12 C), 7 e 30 dias e 1 ano após o tratamento com radioiodo.

Figura 12 – Frequências de aberrações cromossômicas estruturais (AC) observadas em linfócitos periféricos de todos os grupos estudados (Grupo A + B) de pacientes (n = 21) antes (r-hTSH e basal) e após o tratamento com ^{131}I (24 horas, 7 dias, 30 dias e 1 ano). A) Porcentagem de células com AC; B) Número de AC / célula; C) Número de dicêntricos / célula.

A tabela 5 mostra as frequências de diferentes tipos de aberrações cromossômicas encontradas em linfócitos periféricos de pacientes dos dois grupos (A e B) nos diferentes tempos após a administração do radioiodo, levando em consideração os 3 parâmetros analisados. O cromossomo dicêntrico foi o mais frequentemente encontrado e é considerado o melhor indicador de dano por radiação ionizante.

Tabela 5 – Média da frequência $\pm$ desvio padrão de aberrações cromossômicas estruturais (AC) observada em linfócitos de pacientes do grupo A (r-hTSH + ^{131}I , n=11) e grupo B (^{131}I , n=10), analisadas antes e depois da administração de ^{131}I .

Grupo	Amostra	Número de células analisadas	AC estrutural						Células com aberração (%)	Número de aberrações/célula	Frequência de dicêntricos/célula
			Dic	Anel	Ace	Dm	Gap	Quebra			
Grupo A	Basal	2134	9	0	6	6	10	8	1.8 ± 1.0	0.018 ± 0.011	0.0042 ± 0.0038
	Após rhTSH	1840	10	0	3	7	9	5	1.8 ± 1.1	0.018 ± 0.011	0.0054 ± 0.0042
	24 horas	1801	46	1	16	20	24	11	6.3 ± 2.6	0.065 ± 0.027	0.0255 ± 0.0140
	7 dias	2200	32	1	13	18	14	8	3.7 ± 1.6	0.039 ± 0.018	0.0145 ± 0.0099
	30 dias	1904	13	2	11	9	12	3	2.4 ± 1.4	0.024 ± 0.015	0.0068 ± 0.0064
	1 ano	1917	12	0	6	3	4	8	1.7 ± 1.0	0.017 ± 0.011	0.0063 ± 0.0058
Grupo B	Basal	2000	10	0	7	5	10	5	1.9 ± 1.4	0.019 ± 0.014	0.0050 ± 0.0053
	24 horas	2000	42	1	20	20	18	9	5.5 ± 2.3	0.055 ± 0.023	0.0210 ± 0.0141
	7 dias	1785	29	1	13	15	8	10	4.1 ± 2.2	0.043 ± 0.024	0.0162 ± 0.0113
	30 dias	2100	24	0	10	10	13	7	3.0 ± 1.6	0.031 ± 0.017	0.0114 ± 0.0117
	1 ano	1781	10	0	4	6	10	3	1.8 ± 1.3	0.019 ± 0.013	0.0056 ± 0.0047

Dic = dicêntrico; Anel = anel cêntrico e acêntrico; Ace = fragmento acêntrico; Dm = double minute; Gap= gap cromossômico e cromatídico ; Quebra = quebra cromossômica e cromatídica.

A figura 13 mostra em forma de histograma, os valores médios de AC obtidos nos dois grupos de pacientes para cada um dos parâmetros considerados em função de tempo. O valor máximo na frequência de AC foi observado nas amostras de 24h após a administração do radioiodo em relação aos valores basais, para ambos os grupos ($p < 0,05$), não havendo significância estatística entre os grupos ($p > 0,05$). Houve uma tendência ao declínio a partir

de 7 dias após administração de ^{131}I , com valores mais baixos para o grupo A. Análise estatística mostrou uma significância entre os grupos ($p < 0,05$) 30 dias e 1 ano para a % de células com AC (Figura 13A) e 30 dias para o número de AC/célula (Figura 13B). Além do mais, a frequência de dicêntricos foi até mais alta nos pacientes hipotireoideos do que nos eutireoideos (Figura 13C), 7 e 30 dias após o tratamento, embora a diferença não seja estatisticamente significativa ($p > 0,05$). O tratamento somente com o r-hTSH não induziu qualquer alteração nos valores basais. É importante enfatizar que as frequências de AC atingiram valores similares aos dos basais, um ano após a terapia com radioiodo nos dois grupos de pacientes.

Figura 13 - Médias das frequências de aberrações cromossômicas (AC) com seus respectivos desvios-padrão encontradas nos dois grupos de pacientes em função do tempo. A) % de células com AC; B) número de AC/célula; C) número de dicêntrico/célula. Cada barra de erro representa a média $\pm$ DP (desvio padrão) de 11 e 10 determinações independentes para os grupos A e B, respectivamente. * $p < 0,05$

Foi também analisada a distribuição de células com número modal ($2N = 46$) e hipomodal ($2N = 44$ e 45) de cromossomos e de células nos diferentes ciclos mitóticos (Tabela 6). O número modal de cromossomos variou de 89,8 a 94,0% e nenhuma correlação positiva foi encontrada com a administração de ^{131}I ou com r-hTSH. A porcentagem de células na primeira divisão mitótica foi maior que 93 % tanto para amostras basais como tratadas.

Tabela 6—Média da frequência $\pm$ desvio padrão de células com número modal (N=46) e hipomodal (N= 45 e 44) de cromossomos e % de linfócitos nos diferentes ciclos mitóticos após tratamento em pacientes dos grupos A (r-hTSH + ^{131}I , n=11) e B (^{131}I , n=10), analisados antes e após a administração de ^{131}I .

Grupo	Amostra	Número de células analisadas	Número de cromossomos (%)		Ciclo mitótico (%)	
			44 e 45	46	Primeira divisão	Segunda divisão
Grupo A	Basal	2134	7.8 $\pm$ 0.4	92.2 $\pm$ 0.8	96.9 $\pm$ 0.9	3.1 $\pm$ 0.2
	Após rhTSH	1840	8.4 $\pm$ 0.6	91.6 $\pm$ 1.9	97.9 $\pm$ 2.1	2.1 $\pm$ 0.2
	24 horas	1801	8.4 $\pm$ 0.7	91.6 $\pm$ 3.3	94.9 $\pm$ 3.4	5.1 $\pm$ 0.5
	7 dias	2200	9.1 $\pm$ 0.5	90.9 $\pm$ 0.5	95.6 $\pm$ 0.4	4.4 $\pm$ 0.4
	30 dias	1904	7.7 $\pm$ 0.6	92.3 $\pm$ 1.7	97.1 $\pm$ 1.6	2.9 $\pm$ 0.3
	1 ano	1917	6.2 $\pm$ 0.4	93.8 $\pm$ 1.3	96.7 $\pm$ 1.5	3.3 $\pm$ 0.3
Grupo B	Basal	2000	9.4 $\pm$ 0.6	90.6 $\pm$ 0.6	96.6 $\pm$ 0.5	3.5 $\pm$ 0.5
	24 horas	2000	8.5 $\pm$ 0.5	91.5 $\pm$ 0.5	97.3 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.1
	7 dias	1785	10.2 $\pm$ 0.7	89.8 $\pm$ 2.5	93.1 $\pm$ 2.4	6.9 $\pm$ 0.7
	30 dias	2100	8.6 $\pm$ 0.6	91.4 $\pm$ 1.8	96.3 $\pm$ 1.7	3.7 $\pm$ 0.5
	1 ano	1781	6.0 $\pm$ 0.4	94.0 $\pm$ 3.4	97.9 $\pm$ 3.1	2.1 $\pm$ 0.3

Dados da análise de frequência de aberrações cromossômicas em amostras sanguíneas de cinco doadores sadios submetidos a diferentes concentrações radioativas de ^{131}I *in vitro* (grupo C) estão expressos na tabela 7. Pode-se observar um aumento na frequência de aberrações cromossômicas em função da concentração radioativa do ^{131}I , 24 horas após a exposição nos três parâmetros analisados.

Tabela 7 – Dados individuais referentes às frequências de diferentes tipos de aberrações cromossômicas estruturais, observados em linfócitos periféricos de doadores sadios (A, B, C, D e E) expostos a diferentes concentrações radioativas de Na¹³¹I *in vitro* após 24 horas.

Doador	Atividade (MBq)	Total de células analisadas	Dic	DM	Anel	Ace	QCM	QCT	GCM	GCT	Total de aberrações	dic/célula	AC/célula	Células com aberrações (%)
A	0,000	388	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0,000	0,002	1 (0,26)
	0,074	319	2	1	0	0	0	0	0	1	4	0,006	0,012	4 (1,25)
	0,185	299	4	4	0	3	1	4	0	1	17	0,013	0,057	17 (5,68)
	0,370	321	3	3	0	7	1	1	1	0	16	0,009	0,050	16 (4,98)
	0,555	179	5	2	0	2	2	0	0	0	11	0,028	0,061	11 (6,14)
B	0,000	244	0	2	0	0	1	0	0	0	3	0,000	0,012	2 (0,82)
	0,074	272	3	5	0	1	2	0	0	1	12	0,011	0,044	12 (4,41)
	0,185	296	6	0	0	2	3	1	0	1	13	0,020	0,044	13 (4,39)
	0,370	316	7	5	1	5	0	0	1	0	19	0,022	0,044	19 (6,01)
	0,555	140	8	4	0	3	0	0	0	0	15	0,057	0,107	15 (10,71)
	0,740	127	10	4	0	5	0	0	0	3	22	0,079	0,173	22 (17,32)
C	0,000	375	0	1	0	0	0	1	2	1	5	0,000	0,013	5 (1,33)
	0,074	165	2	1	0	5	0	0	1	2	11	0,012	0,067	11 (6,67)
	0,185	206	4	4	0	2	0	0	1	1	12	0,019	0,058	12 (5,82)
	0,370	90	6	3	0	2	0	0	1	0	12	0,067	0,133	12 (13,33)
	0,555	100	7	4	0	7	0	0	2	2	22	0,070	0,220	22 (22,00)
	0,740	102	7	6	0	7	0	0	6	8	34	0,069	0,333	34 (33,33)
D	0,000	200	0	5	0	0	0	0	2	0	7	0,000	0,035	7 (3,50)
	0,074	84	0	3	0	6	0	0	1	0	10	0,000	0,119	10 (11,90)
	0,185	54	0	0	0	4	0	0	0	1	5	0,000	0,092	5 (9,26)
	0,370	89	1	1	3	3	0	1	0	1	10	0,011	0,112	9 (10,11)
	0,555	58	0	2	0	5	0	1	3	3	14	0,000	0,241	14 (24,14)
	0,740	60	3	1	3	3	0	0	0	0	10	0,050	0,167	9 (15,00)
E	0,000	178	0	1	0	0	0	0	1	0	2	0,000	0,011	2 (1,12)
	0,074	122	6	5	1	2	1	0	1	0	16	0,049	0,131	16 (13,11)
	0,185	125	6	3	1	2	0	0	5	1	18	0,048	0,144	18 (14,40)
	0,370	110	9	1	2	6	0	0	0	0	18	0,082	0,164	18 (16,36)
	0,555	114	8	1	3	6	0	0	0	0	18	0,070	0,158	18 (15,79)
	0,740	47	8	5	1	6	0	0	0	2	22	0,170	0,468	22 (46,81)

Dic = dicêntrico; Anel = anel cêntrico e acêntrico; Ace = fragmento acêntrico; Dm = double minute; Gap= gap cromossômico e cromatídico ; Quebra = quebra cromossômica e cromatídica.

Uma vez que os dicêntricos são considerados os melhores indicadores de danos induzidos pela radiação ionizante, foi construída uma curva atividade-resposta levando-se em consideração a frequência de dicêntricos encontrados 24h após a administração do radioiodo em função da concentração radioativa (0,074 a 0,740 MBq/mL). Os dados obtidos foram ajustados ao modelo linear-quadrático ($Y = \alpha A + \beta A^2$), onde $Y = 0,0401 (\pm 0,0754)A + 0,0900 (\pm 0,1018)A^2$ (Figura 14).

Figura 14 – Curva dose-resposta obtida através de linfócitos periféricos de doadores saudáveis (Grupo C), submetidos a diferentes concentrações radioativas de ^{131}I por 24 horas, ajustada de acordo com o modelo ($Y = \alpha A + \beta A^2$) para indução de dicêntricos. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão de 5 ensaios independentes.

Os danos citogenéticos induzidos pelo ^{131}I *in vitro* na faixa de concentrações radioativas de 0,074 a 0,740 MBq/mL equivalem a uma faixa de dose absorvida de 0,17 a 1,67 Gy, estimada pelo programa Monte Carlo (Tabela 8). Quando o número de dicêntricos/célula encontrado em linfócitos periféricos de 2 grupos de pacientes, 24 horas após a administração do radioiodo foi introduzido na equação linear-quadrática, foram encontradas concentrações radioativas correspondentes de $0,354 \pm 0,153$ MBq/mL para o grupo A e $0,309 \pm 0,154$ MBq/mL para o grupo B. Pode-se considerar que o dano citogenético *in vivo* causado pelo ^{131}I em pacientes com CDT equivale ao induzido *in vitro* pelas doses de $0,8 \pm 0,3$ Gy e $0,7 \pm 0,3$ Gy para os grupos A e B, respectivamente.

Tabela 8 - Valores de dose absorvida obtidos através do programa Monte Carlo em função das atividades administradas de ^{131}I para 24h de exposição em linfócitos periféricos de indivíduos sadios (Grupo C).

Atividade (MBq/mL)	Dose absorvida (Gy)
0,074	0,167
0,185	0,417
0,370	0,833
0,555	1,250
0,740	1,670
0,925	2,080
1,110	2,500
1,480	3,330
2,220	5,000

A figura 15 mostra a curva de crescimento das células WRO mantidas no meio RPMI 1640 a 37°C com 5% de CO_2 em função do tempo. Aplicando a equação exponencial ($Y=Y_0e^{(kx)}$) foi calculado o tempo de duplicação que foi 96,3 horas, o que indica um ciclo celular relativamente lento das células tireoidianas.

Figura 15 – Curva de crescimento de células WRO em função do tempo.

A figura 16 mostra o perfil de viabilidade celular obtido em função da concentração radioativa de ^{131}I , com e sem r-hTSH no quarto dia após 24 horas de exposição ao radioiodo *in vitro*. Houve uma tendência a queda no número de células viáveis com o aumento da concentração radioativa de ^{131}I , com um leve declínio nas concentrações mais altas de 1,85 e 3,70 MBq/mL em relação ao controle, cuja análise estatística mostrou significância de $p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente, quando pré-estimuladas com r-hTSH.

Figura 16 – Efeitos de diferentes concentrações radioativas de ^{131}I na viabilidade de células WRO, avaliada no quarto dia após exposição ao radioiodo pelo método colorimétrico (MTS e PMS) ($n=3$). * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Igualmente, a figura 17 mostra o efeito citotóxico de irradiação externa de gama através do teste de viabilidade celular. Não houve variação no perfil quando expostas a diferentes doses de ^{60}Co , com exceção de doses mais baixas de 0,2Gy ($p<0,05$) e 0,4Gy ($p<0,05$) em relação ao controle.

Figura 17 –Efeitos de diferentes doses de ^{60}Co na viabilidade de células WRO, avaliada no quarto dia após exposição (n=3).

Tendo em vista a radiorresistência das células WRO frente à ação da radiação de gama de ^{60}Co (0,2 – 8,3 Gy), doses mais altas de 20 e 40 Gy foram empregadas para o acompanhamento da viabilidade celular em função do tempo.

Células WRO quando irradiadas externamente com ^{60}Co mostraram um declínio gradual no número de células em função do tempo e em função da dose recebida (Figura 18): a partir do sexto dia para as doses mais altas de 20 e 40 Gy e a partir do oitavo e décimo dia para as doses de 10 e 4 Gy, respectivamente.

Figura 18 – Células WRO expostas a diferentes doses de ^{60}Co em função do tempo (n=3).

A figura 19 apresenta algumas metáfases de células WRO mostrando um cariótipo instável contendo um número variado de cromossomos (de 46 a 99 cromossomos) e vários *double minutes* (DM).

Figura 19 – Fotomicrografias de metáfases de células WRO com números variados de cromossomos apresentando *double minutes* (setas) (A, B e C) e metáfase sem *double minutes* (D).

Diante desses resultados, propusemos empregar o teste do micronúcleo como uma alternativa à técnica convencional de AC, uma vez que as células WRO apresentam um cariótipo instável e de difícil análise cromossômica.

A tabela 9 e a figura 20 mostram as frequências de micronúcleos encontrados em WRO expostas a diferentes concentrações radioativas de ^{131}I por 24h. A análise estatística mostrou não significância entre as amostras analisadas, com e sem r-hTSH ($p>0,05$) e entre as concentrações radioativas em relação ao controle ($p>0,05$).

Tabela 9 - Frequências de micronúcleo (MN) com seus respectivos desvios-padrão encontradas em células binucleadas (CB) de WRO expostas a diferentes concentrações de ^{131}I (n=3), mostrando também a ocorrência de brotos e pontes nucleoplasmáticas.

	Concetação radioativa (MBq/mL)	Total de CB	Total de MN	CB com MN		MN/CB (Média $\pm$ D.P.)	%CBMN (Média $\pm$ D.P.)	Broto	Ponte nucleoplasmática
^{131}I	0,00	1514	14	14	0	0,009 $\pm$ 0,004	0,9 $\pm$ 0,4	6	5
	0,07	1552	18	18	0	0,012 $\pm$ 0,002	1,2 $\pm$ 0,2	7	9
	0,18	1572	14	14	0	0,009 $\pm$ 0,006	0,9 $\pm$ 0,5	2	9
	0,37	1538	17	17	0	0,011 $\pm$ 0,004	1,1 $\pm$ 0,4	6	6
	0,55	1398	16	16	0	0,011 $\pm$ 0,005	1,1 $\pm$ 0,5	5	6
	0,74	1508	13	13	0	0,009 $\pm$ 0,005	0,9 $\pm$ 0,5	9	8
	1,85	1509	15	13	1	0,010 $\pm$ 0,005	0,9 $\pm$ 0,4	7	6
	3,70	1524	12	12	0	0,008 $\pm$ 0,003	0,8 $\pm$ 0,3	0	9
^{131}I + r-hTSH	0,00	1510	11	11	0	0,007 $\pm$ 0,01	0,7 $\pm$ 0,1	11	6
	0,07	1502	14	14	0	0,009 $\pm$ 0,001	0,9 $\pm$ 0,1	11	9
	0,18	1542	13	13	0	0,008 $\pm$ 0,001	0,8 $\pm$ 0,1	7	4
	0,37	1520	14	14	0	0,009 $\pm$ 0,002	0,9 $\pm$ 0,2	6	7
	0,55	1503	11	11	0	0,007 $\pm$ 0,002	0,7 $\pm$ 0,2	10	9
	0,74	1514	14	14	0	0,009 $\pm$ 0,001	0,9 $\pm$ 0,1	4	3
	1,85	1515	12	12	0	0,008 $\pm$ 0,002	0,8 $\pm$ 0,2	10	5
	3,70	1518	13	13	0	0,008 $\pm$ 0,003	0,9 $\pm$ 0,3	7	9

Figura 20 – Média das frequências de micronúcleo com seus respectivos desvios-padrão encontradas em células WRO expostas a diferentes concentrações de ^{131}I com e sem adição de r-hTSH (n=3). A) Número de micronúcleo por célula binucleada e B) Porcentagem de células binucleadas com micronúcleo.

Não houve variação nos valores de índice de proliferação em função da concentração radioativa de ^{131}I com e sem r-hTSH ($p>0,05$), o que mostra que o tratamento não afetou a cinética de proliferação celular (tabela 10 e figura 21).

Tabela 10 – Frequências de células bi (CB), mono (CM) e multinucleadas (Cmu) e valores médios de índice de proliferação, com seus respectivos desvios-padrão, obtidos de células WRO expostas a diferentes concentrações de ^{131}I com e sem r-hTSH ($n=3$).

	Concetração radioativa (MBq/mL)	CB	CM	Cmu	Total	%CB	%CM	%Cmu	Índice de proliferação (Média $\pm$ D.P.)
^{131}I	0,00	1514	883	151	2548	59,4	34,6	5,9	$1,71 \pm 0,07$
	0,07	1552	626	157	2335	66,5	26,8	6,7	$1,80 \pm 0,05$
	0,18	1572	716	130	2418	65,0	29,6	5,4	$1,76 \pm 0,07$
	0,37	1538	636	158	2332	65,9	27,3	6,8	$1,80 \pm 0,06$
	0,55	1398	633	126	2157	64,8	29,3	5,8	$1,76 \pm 0,05$
	0,74	1508	571	181	2260	66,7	25,3	8,0	$1,83 \pm 0,09$
	1,85	1509	366	130	2005	75,3	18,2	6,5	$1,88 \pm 0,08$
	3,70	1524	687	150	2361	64,5	29,1	6,4	$1,77 \pm 0,08$
$^{131}\text{I} + \text{r-hTSH}$	0,00	1510	427	165	2102	71,8	20,3	7,8	$1,88 \pm 0,02$
	0,07	1502	378	200	2080	72,2	18,2	9,6	$1,91 \pm 0,01$
	0,18	1542	451	139	2132	72,3	21,1	6,5	$1,85 \pm 0,03$
	0,37	1520	364	166	2050	74,1	17,7	8,1	$1,90 \pm 0,01$
	0,55	1503	374	145	2022	74,3	18,5	7,2	$1,89 \pm 0,01$
	0,74	1514	400	144	2058	73,6	19,4	7,0	$1,88 \pm 0,02$
	1,85	1515	408	158	2081	72,8	19,6	7,6	$1,88 \pm 0,01$
	3,70	1518	408	150	2076	73,1	19,6	7,2	$1,88 \pm 0,01$

Figura 21 – Média do índice de proliferação, com seus respectivos desvios-padrão, encontrada em células WRO expostas a diferentes concentrações de ^{131}I com e sem adição de r-hTSH ($n=3$).

Quanto ao ensaio de captação do radioiodo, a figura 22 mostra que somente na concentração radioativa de 3,7 MBq/mL houve uma captação significativa de ^{131}I na presença do r-hTSH em relação à amostra sem o hormônio ($p<0,05$). A amostra de 3,7 MBq/mL foi significativa também quando comparada com controle ($p<0,01$ e $p<0,001$) e com amostra de 0,74 MBq/mL com e sem hormônio ($p<0,01$).

Figura 22 – Efeitos de diferentes concentrações radioativas de ^{131}I na captação pelas células WRO com e sem r-hTSH, avaliada 24 horas após exposição ao radioiodo. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

5 DISCUSSÃO

Entender a resposta dos pacientes (ou das células) frente a diferentes modalidades de tratamentos para o CDT é um caminho necessário para tornar mais eficaz a conduta clínica para esse tipo de câncer. O tratamento com ^{131}I associado ao r-hTSH apesar de bastante difundido, ainda se faz necessário estudos mais acurados para uma melhor compreensão dos mecanismos celular e molecular envolvidos na carcinogênese.

No presente estudo, foi investigada e comparada a incidência de AC induzida por ^{131}I em linfócitos periféricos, decorrente da ablação de tecidos remanescentes em pacientes com CDT submetidos ao tratamento com r-hTSH (grupo A com r-hTSH) ou com suspensão do hormônio tireoidiano (grupo B sem r-hTSH). A análise estatística mostrou não significância ($p > 0,05$) entre os grupos em relação aos parâmetros clínicos antes do tratamento com iodo radioativo. Estas observações sugerem que a variabilidade da resposta citogenética observada entre os pacientes pode ser decorrente da diferença de sensibilidade de cada indivíduo à radiação ionizante.

A radioiodoterapia induziu danos genotóxicos nos pacientes, cujas frequências de AC diminuíram em função do tempo. Os pacientes eutireoideos apresentaram, de modo geral, uma taxa mais baixa de AC se comparada aos pacientes hipotireoideos após o tratamento com ^{131}I em função do tempo. Trinta dias e 1 ano após o tratamento essas diferenças foram estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Um ano após a administração de ^{131}I , os valores citogenéticos praticamente retornaram aos valores basais, em ambos os grupos.

A cinética do declínio no número de MN ou AC após a exposição genotóxica ainda não está totalmente elucidada. De fato, vários estudos têm relatado resultados que diferem algo dos nossos dados. Gutierrez *et al.* (1999) e M'Kacher *et al.* (1997) verificaram uma diminuição gradual das frequências AC e do MN em função do tempo após o tratamento com ^{131}I , mas os valores citogenéticos nas amostras coletadas um ano após a terapia ainda estavam acima dos valores basais. Ballardin *et al.* (2002) mostraram um pico de frequência de MN 7 dias após o tratamento com ^{131}I o que posteriormente diminuiu, atingindo os níveis basais após 6 meses. Outros autores (Gil *et al.*,

2000) relataram um aumento significativo e persistente de danos cromossômicos induzidos pelo tratamento com ^{131}I em pacientes com CDT. Por outro lado, utilizando o ensaio do cometa, Gutierrez *et al.* (1998) não encontraram diferença significativa 1 semana após a administração do radioiodo em relação aos valores basais de pacientes com CDT. O declínio gradual de células com defeitos genéticos na circulação periférica de pacientes que receberam ^{131}I ao longo do tempo podem ser, em parte, uma consequência de vários mecanismos integrados, tais como: morte seletiva de linfócitos danificados pelo iodo radioativo, “turnover” normal de células, mecanismos de reparo, captura pelo sistema retículo-endotelial e o “clearance” renal de ^{131}I , entre outros fatores (Gutiérrez *et al.*, 1999, Erselcan *et al.*, 2004).

Muitos estudos têm relatado um “clearance” renal mais rápido de ^{131}I (aproximadamente 50%) em pacientes submetidos à terapia com r-hTSH em relação à terapia convencional (Luster *et al.*, 2005, Hanscheid *et al.* 2006), o que representa uma excreção mais rápida do radioiodo e consequentemente, uma menor retenção de ^{131}I em todo o organismo. Assim, os valores citogenéticos mais elevados observados em pacientes hipotireoideos em relação aos pacientes eutireoideos no presente estudo, podem estar relacionados com o “status” dos pacientes no momento da administração de ^{131}I , uma condição que diminui o “clearance” renal de iodo radioativo e, portanto, aumenta a retenção de corpo inteiro, resultando consequentemente, em uma dose mais alta de radiação no corpo inteiro. Além disso, quando um tipo específico de AC, ou seja, o cromossomo dicêntrico é utilizado como base para dosimetria biológica (Pinto e Amaral, 2014), a sua frequência foi mais elevada em pacientes hipotireoideos do que em eutireoideos, embora sem significância estatística. Considerando-se que a captação máxima de ^{131}I na tireoide ocorre 24h após a administração (Zanzonico, 1997), este período de tempo permite estimar o valor máximo de dose absorvida de radiação recebida pelos pacientes.

Partindo do princípio de que células sanguíneas (linfócitos) de pacientes foram expostas homogeneamente à radiação (Serna *et al.*, 2008), a curva de calibração dose-resposta obtida *in vitro* pode ser diretamente usada para determinar a dose equivalente para o corpo todo, visto que o sangue e a medula óssea são considerados como órgãos críticos nesta abordagem

(Catena *et al.*, 2000; Serna *et al.*, 2008; Lassmann *et al.*, 2010; Reiners *et al.*, 2013). Uma vez que a corrente sanguínea recebe a radiação do radioiodo distribuída no organismo, pode admitir que a dose de radiação recebida pelos linfócitos representa as doses médias de corpo inteiro ou da medula óssea (Catena *et al.*, 2000, Serna *et al.*, 2008), que são as principais responsáveis pelos efeitos a curto ou a longo prazo da radiação ionizante, incluindo a terapia com radionuclídeo.

Dados da literatura têm mostrado que a estimativa de dose de radiação decorrente da terapia com radioiodo usando parâmetro biológico ou mesmo físico pode variar dependendo do período de tempo analisado após o tratamento, do número amostral, condições de tratamento, do procedimento e do parâmetro usados para a sua determinação (Tabela 11)

Tabela 11 – Estimativa de dose absorvida de corpo inteiro em pacientes com CDT submetidos à iodoterapia.

Número de pacientes com CDT	Atividade de ^{131}I (GBq)	Tempo após a iodoterapia	Técnica / método utilizado	Dose estimada (Gy)	Referência
22	3,7	7 dias	MN	0,45	Watanabe <i>et al.</i> , 2004
25	3,7	7 dias	MN	0,33	Watanabe <i>et al.</i> , 1998
8	~ 3,7	7 dias	MN	0,32	Monsieurs <i>et al.</i> , 1999
30	3,7	4 dias	AC FISH	0,54 0,48	M'Kacher <i>et al.</i> , 1996
25	3,7	3 dias	MN	0,73	Serna <i>et al.</i> , 2008
20	3,7	45 dias	FISH (com r-hTSH) FISH (sem TSH)	0,22 0,37	Frigo <i>et al.</i> , 2009
19	2,5	1 mês 6 meses	AC MN	0,2 – 0,3 0,2	Gil <i>et al.</i> , 2000
50	3,7	4 dias 3 meses 6 meses 1 ano 2 anos	AC	0,52 0,49 0,45 0,44 0,42	M'Kacher <i>et al.</i> , 1997
50	3,7	4 dias 3 meses 6 meses 1 ano 2 anos	FISH	0,47 0,45 0,44 0,43 0,42	M'Kacher <i>et al.</i> , 1997
14	7,4		Dosimetria física	0,23	De Keizer, 2004
63	3,7	2 dias	Dosimetria física (com r-hTSH) Dosimetria física (sem r-hTSH)	0,40 0,62	Haenscheid, 2006

Embora seja aconselhável ter cuidado ao extrapolar dados *in vitro* para a situação clínica, o nosso estudo mostra que os danos citogenéticos em linfócitos periféricos *in vivo*, 24h após a terapia com ^{131}I , pode ser equivalente ao dano observado *in vitro* para doses médias de $0,8 \pm 0,3$ e $0,7 \pm 0,3$ Gy para os grupos A e B, respectivamente, estimado pelo programa Monte Carlo. Os valores obtidos são mais altos que os obtidos por outros autores, possivelmente porque a estimativa foi realizada 24 horas após o tratamento

com uma atividade mais alta de ^{131}I ($5,9 \pm 0,4$ GBq). Os dados de genotoxicidade mostram que, nas primeiras 24h após o tratamento com ^{131}I , os dois grupos de pacientes apresentaram altos níveis similares de linfócitos danificados, independente se haviam recebido r-hTSH ou não. No entanto, um declínio gradual na frequência de AC com o tempo foi observado, mais acentuado no grupo A do que no grupo B. Nenhum efeito aneugênico mediado pelo iodo radioativo foi encontrado nos linfócitos periféricos de pacientes. No que diz respeito à frequência de células nos diferentes ciclos de mitose, o tratamento só com ^{131}I ou associado com o hormônio pareceu não influenciar na cinética de proliferação nos linfócitos sanguíneos de pacientes com CDT.

Nossos dados estão de acordo com artigos publicados anteriormente (Remy *et al.* 2008, Taieb *et al.* 2010, Reiners *et al.*, 2013), mostrando que a terapia com iodo radioativo, bem como a administração de r-hTSH, são procedimentos seguros e eficazes para o tratamento de pacientes com DTC. A melhor qualidade de vida é, obviamente, fornecida pela terapia com r-hTSH (Hanscheid *et al.*, 2006, Rosário *et al.*, 2008). Após a administração de elevadas atividades de ^{131}I , a dose absorvida permaneceu bem abaixo do limite de 2 Gy no sangue em todos os pacientes, o que tem sido considerado como um nível de limiar seguro para todas as terapias com iodo radioativo, evitando assim mielotoxicidade grave (de Keizer *et al.*, 2001).

É importante ressaltar, contudo, que, sob as condições *in vitro* em nosso estudo, o “clearance” renal não foi considerado: ^{131}I permaneceu em contato direto com o sangue durante 24 horas. Todavia, um fator de 0,9585 foi aplicado ao resultado, levando em consideração uma correção de 24h de decaimento radioativo.

Outro aspecto abordado no presente estudo foi entender a resposta de células tumorais tireoidianas (WRO) frente a diferentes estímulos ou tratamentos. Linhagens celulares derivadas de tumores são amplamente utilizadas na pesquisa de câncer, pois podem fornecer informações úteis sobre os mecanismos subjacentes que desempenham um importante papel na biologia do tumor. Esse tipo de estudo se faz necessário para uma melhor compreensão de aspectos de grande relevância, tais como a cinética de crescimento, propriedade metastáticas e também servir como ensaios de

primeira linha para novas modalidades de tratamento (Van Staveren *et al.*, 2007).

De modo geral, o CDT é altamente curável e tem um excelente prognóstico (Xing, 2007; Leonardi *et al.*, 2012). No entanto, cerca de 25% dos pacientes com CDT não respondem à iodoterapia, isto é, o tumor perde a avidéz pelo radioiodo, a principal causa para o insucesso na terapia ablativa. Esta perda de capacidade de captar o radioiodo pelas células tumorais constitui um importante fator que leva à taxa significativa de morbidade e mortalidade desse tipo de câncer com incidência cada vez mais crescente nestas últimas 3 décadas no mundo inteiro (Xing, 2007; Kleiman *et al.*, 2013; Pellegriti *et al.*, 2013).

Vários autores têm mostrado uma estreita associação entre pacientes com CDT resistentes a iodoterapia e a mutação nos vários genes da rota MAPK, particularmente no gene BRAF. Uma vez que a eficácia da ablação pela captação do radioiodo após a tireoidectomia é dependente do transporte intracelular ativo e captação de iodeto pelo “symporter” sódio-iodeto (NIS) (Kleiman *et al.*, 2013), sugeriu-se que a falha na resposta à iodoterapia seja devido à alteração na função do NIS e outras proteínas que metabolizam iodeto em células que carregam este tipo de mutação (Xing, 2010). O gene BRAF^{V600E} tem sido descrito como um dos principais responsáveis pelas características agressivas, por exemplo, invasão extratireoidiana, metástase no linfonodo, estágio avançado da doença, resistência ao radioiodo e recorrência clínica (Xing, 2005; Liu *et al.*, 2007; Frasca *et al.*, 2008).

A mutação no gene BRAF é considerada uma ocorrência frequente do carcinoma de tireoide do tipo papilar (CPT) (Xing, 2010; Leonardi *et al.*, 2012). A presença deste tipo de mutação em células WRO, originárias de CFT sugere, a despeito do seu inicial diagnóstico de câncer folicular, que o tumor de origem deva ter sido inicialmente do tipo papilar (Saiselet *et al.*, 2012). Existe também a possibilidade de uma mistura de células com BRAF mutado e não mutado na amostra de tumor original. Pode também propor que esta linhagem celular adquiriu esta mutação *in vitro* durante as sucessivas divisões em um meio artificial de seleção. Cabe ressaltar que a mutação no BRAF^{V600E} não é específica do câncer da tireoide (Saiselet *et al.*, 2012); tem sido encontrada em vários tipos de câncer humano, como do ovário, colorectal, sendo

frequentemente observada em melanoma (Xing, 2005; Liu *et al.*, 2007), o que indica que este tipo de mutação oncogênica está associada a agressividade tumoral.

Muito se discute sobre qual seria o tratamento mais adequado quando a iodoterapia não é eficiente. Na tentativa de contornar esta situação dos pacientes com CDT com mutação no BRAF, foram propostos tratamentos mais agressivos, incluindo tireoidectomia mais radical que abrangesse maior parte dos tecidos remanescentes e terapia com radiação externa (Xing, 2007). Outras alternativas incluem aumento na atividade do ^{131}I para o tratamento inicial pós-operatória (Xing, 2007, 2010) e o aumento no nível de TSH antes da iodoterapia (Kleiman *et al.*, 2013). Mais recentemente, técnicas de genética molecular tem sido empregadas como silenciamento do gene BRAF mutado através de transfecção com siRNA tanto *in vitro* (Kleiman *et al.*, 2013) como em modelo animal (Liu *et al.*, 2007). Igualmente várias moléculas inibidoras da rota de sinalização MAPK, dirigidas para BRAF^{V600E} (PLX 4720, PLX 4032), MEK (CI-1040, VO126, PD-0325901) e RAF (AAL-881, LBT-613) tem sido desenvolvidas nestes últimos anos para uso terapêutico (“targeting therapy”) especialmente em melanomas e em câncer de tireoide (Leonardi *et al.*, 2012; Patranvala e Puzanov, 2012; Li *et al.*, 2013).

Com base nessas informações, determinamos primeiramente o tempo de duplicação celular da WRO, que foi 96h, mostrando um ciclo celular relativamente lento, o que corrobora os dados de Estour *et al.* (1989). De acordo com esses autores que descreveram pela primeira vez esta linhagem celular, a célula WRO retém ainda a capacidade de secretar tireoglobulina, mas perde a sua habilidade para concentrar o ^{131}I .

Tendo em vista que há poucos dados na literatura, pelo menos no nosso conhecimento, propusemos analisar efeitos citotóxicos, genotóxicos e captação do radioiodo, com pré-estimulação ou não com r-hTSH em células WRO *in vitro*, originárias de carcinoma metastático folicular da tireoide, com mutações nos genes RAS, BRAF e p53.

A análise citogenética pela técnica convencional de AC mostrou um cariótipo instável com presença de aneuploidia e *double minute*, característico de células neoplásicas (van Staveren *et al.*, 2007). De acordo com vários autores, os *double minutes* são indicativos de amplificação gênica e são

encontrados também em outros tipos de tumores, como os de cólon, pâncreas, mama, pulmão e também em leucemias (Nielsen *et al.*, 1993; van Staveren *et al.*, 2007; Movafagh *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2014).

Em decorrência do número variado de cromossomos resultante da instabilidade genômica das células WRO, dificultando, portanto, a análise citogenética mais precisa, passamos a utilizar técnica do MN, como uma alternativa à técnica convencional de AC.

Os dados obtidos com a técnica do MN mostraram uma radioresistência das células à ação do ^{131}I , não havendo diferença estatística significativa em relação ao controle ($p>0,05$) e entre as diferentes concentrações radioativas de ^{131}I (0,07 a 3,70 MBq/mL que correspondem a 0,17 a 8,3 Gy pelo programa Monte Carlo), com e sem estimulação com r-hTSH ($p>0,05$) (figura 20). Não houve diferença significativa ($p>0,05$) também no índice de proliferação celular, o que indica que o tratamento não influencia na cinética de proliferação em células WRO.

Já no ensaio citotóxico, utilizando a mesma faixa de concentração radioativa de radioiodo, foi possível verificar uma tendência à queda do número de células viáveis, com diferença estatística significativa nas concentrações radioativas mais alta de 1,85 MBq/mL (4,1 Gy) ($p<0,05$) e 3,70 MBq/mL (8,3 Gy), mas somente com pré-estimulação hormonal ($p<0,01$) (figura 16). Medidas de captação de ^{131}I 24h após a exposição mostraram uma incorporação significativa de radioiodo somente na concentração radioativa mais alta de 3,7 MBq/mL e que ocorreu mais captação na presença do r-hTSH ($p<0,05$) em relação a ausência de estímulo hormonal. O mesmo não ocorreu em amostras com concentrações radioativas mais baixas.

Estes dados sugerem a ocorrência de um nível adequado de radioiodo disponível no meio extracelular e a citotoxicidade resultante pode ter sido ocasionada primariamente pela emissão de partículas β do radioiodo. No entanto, é difícil explicar uma queda na viabilidade na amostra de 1,85 MBq/mL (figura 16), visto que o nível de captação do ^{131}I foi baixo e similar entre amostras com e sem r-hTSH (figura 22). Outros fatores ainda não identificados, por exemplo, um bloqueio na divisão celular é uma possibilidade que pode estar envolvida na queda da viabilidade das células WRO tratadas com radioiodo.

As células WRO mostraram também uma radiorresistência relativamente alta avaliada no quarto dia após irradiação externa com ^{60}Co (figura 17), não havendo diferença significativa ($p>0,05$) até a dose de 8,3 Gy em relação ao controle, com exceção nas doses mais baixas de 0,2 e 0,4 Gy, com um aparente crescimento celular. Esta aparente incongruência pode ser atribuída a um possível efeito hormético da radiação ionizante, fenômeno esse observado em diversos sistemas biológicos para diferentes agentes como uma reação benéfica à baixa dose de radiação, estimulando o mecanismo de reparo, melhorando o “status” antioxidante e favorecendo a proliferação celular.

Como mostra a figura 18, o número de células, no entanto, diminuiu posteriormente, a partir do sexto dia após as irradiações para doses mais altas de 20 a 40 Gy e a partir do oitavo e décimo dia, para doses de 10 e 4 Gy, respectivamente. Daí a importância de se fazer um acompanhamento de viabilidade em função do tempo, pelo menos para células proliferativas com ciclo celular mais lento para a análise de radiosensibilidade.

Os dados obtidos mostraram um resultado animador, no qual um aumento na concentração radioativa de ^{131}I de 3,7 MBq/mL na presença do r-hTSH, permitiu uma incorporação significativa de radioiodo com concomitante queda na viabilidade de células WRO. Este procedimento pode ser associado à irradiação externa com ^{60}Co , podendo vislumbrar uma aplicação terapêutica. No entanto, tanto a atividade do radioiodo como a dose absorvida de ^{60}Co envolvidas são relativamente altas, necessitando de investigações posteriores. A estratégia de examinar a resposta celular do tumor dos pacientes *in vitro* é um passo importante que pode servir de suporte para estudos posteriores, estendendo também para outras linhagens tumorais de tireoide.

6 CONCLUSÕES

Dados citogenéticos e dosimétricos obtidos de linfócitos periféricos de pacientes com CDT pré-estimulados com r-hTSH (grupo A) ou não (grupo B)(estudo *in vivo*) e dados citotóxicos, genotóxicos e captação de radioiodo obtidos de células tumorais tireoidianas (células WRO) com ou sem pré-estimulação hormonal (estudo *in vitro*) permitiram concluir que:

- Exposição terapêutica ao radioiodo (com ou sem r-hTSH) induziu um aumento no número de aberrações cromossômicas em linfócitos de pacientes, com valor máximo 24h após o tratamento com declínio gradativo ao longo do tempo;

- Pacientes do grupo A apresentaram linfócitos com menos danos cromossômicos, 30 dias e 1 ano após a iodoterapia ($p < 0,05$) em relação ao grupo B;

- Após 1 ano da administração do radioiodo, os níveis de danos citogenéticos em linfócitos circulantes atingiram valores comparáveis aos valores basais nos 2 grupos de pacientes;

- Danos cromossômicos em forma de dicêntricos induzidos pelo ^{131}I , 24h após o tratamento equivalem aos produzidos *in vitro*, correspondentes às doses absorvidas de $0,8 \pm 0,3$ e $0,7 \pm 0,3$ Gy para os grupos A e B, respectivamente, sem significância estatística entre eles;

- Nenhum efeito aneugênico mediado pelo radioiodo e r-hTSH foi encontrado nos linfócitos sanguíneos de 2 grupos de pacientes. Igualmente, nenhuma influência na cinética de proliferação celular foi observada nos linfócitos;

- Com base nos dados citogenéticos e dosimétricos pode-se considerar que a iodoterapia bem como a administração de r-hTSH são procedimentos seguros e eficazes para o tratamento de pacientes com CDT, com melhor qualidade de vida aos pacientes do grupo A;

- Células WRO mostraram um ciclo celular relativamente lento de 96,3 h com um cariótipo instável, contendo número variado de cromossomos e double-minutes;

- O teste do micronúcleo mostrou uma radiorresistência relativamente alta das células WRO ao ^{131}I (0,07 a 3,70 MBq/mL). O ensaio de viabilidade celular

mostrou, no entanto, uma ligeira queda nas concentrações radioativas de 1,85 ($p < 0,05$) e 3,70 MBq/mL ($p < 0,01$), mas somente tratadas com r-hTSH;

- O ensaio de captação do radioiodo mostrou uma incorporação significativa ($p < 0,05$) somente na concentração radioativa mais alta de 3,70 MBq/mL e na presença do r-hTSH, em relação a amostra sem hormônio;

- Ensaio de viabilidade celular mostrou uma radiorresistência relativamente alta de células WRO à irradiação externa de ^{60}Co (0,2 - 8,3 Gy) no quarto dia após o tratamento. No entanto, o declínio foi mais acentuado em função do tempo para as doses mais altas de 10, 20 e 40 Gy.

ANEXOS

Anexo 1 – Tabelas com dados individuais dos pacientes do grupo A

Pacientes grupo A (receberam TSH e ¹³¹ I)															
Pac	Amostra	N. Cél		Aberrações Cromossômicas					Frequência	Número de	Células	Centrômeros		Divisão celular	
		Analís.	Dice.	Anel	Ace.	Dm.	Gap	Queb.	dicêntrico/ célula	aberrações/ célula	com aberrações (%)	46	44 45	1 ^a	2 ^a e 3 ^a
P11	Basal TSH	200	01	00	00	00	00	00	01 (0,01)	01 (0,005)	01 (0,5)	174	26	181	19
	Basal ¹³¹ I	200	02	00	00	01	03	02	02 (0,01)	08 (0,040)	08 (4,0)	171	29	196	04
	24h	200	09	00	00	01	03	00	09 (0,05)	13 (0,065)	12 (6,0)	185	15	196	04
	7 dias	200	02	00	00	01	00	01	02 (0,01)	04 (0,020)	04 (2,0)	185	15	199	01
	30 dias	100	01	00	00	00	02	00	01 (0,01)	03 (0,030)	03 (3,0)	092	08	098	02
	1 ano	200	02	00	00	00	01	01	02 (0,01)	04 (0,020)	04 (2,0)	190	10	198	02
P13	Basal TSH	200	00	00	00	00	02	00	00 (0,00)	02 (0,010)	02 (1,0)	189	11	195	05
	Basal ¹³¹ I	200	01	00	00	00	00	00	01 (0,01)	01 (0,005)	01 (0,5)	196	04	189	11
	24h	200	04	00	01	00	02	01	04 (0,02)	08 (0,040)	07 (3,5)	197	03	171	29
	7 dias	200	02	00	01	00	00	00	02 (0,01)	03 (0,015)	03 (1,5)	196	04	199	01
	30 dias	200	01	00	01	00	00	00	01 (0,01)	02 (0,010)	02 (1,0)	197	03	197	03
	1 ano	200	00	00	00	00	00	01	00 (0,00)	01 (0,005)	01 (0,5)	183	17	198	02
P14	Basal TSH	200	01	00	00	02	02	00	01 (0,01)	05 (0,025)	05 (2,5)	177	23	194	06
	Basal ¹³¹ I	200	02	00	01	01	00	01	02 (0,01)	05 (0,025)	05 (2,5)	179	21	199	01
	24h	200	06	01	04	04	01	03	06 (0,03)	19 (0,095)	18 (9,0)	170	30	190	10
	7 dias	200	06	00	01	03	02	02	06 (0,03)	14 (0,070)	12 (6,0)	169	31	188	12
	30 dias (*)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1 ano	200	01	00	01	01	01	01	01 (0,01)	05 (0,025)	05 (2,5)	184	16	200	00

Pac	Amostra	N. Cél	Aberrações Cromossômicas						Frequência	Número de	Células com	Centrômeros		Divisão celular	
		Analís.	Dice.	Anel	Ace.	Dm.	Gap	Queb.	dicêntrico/ célula	aberrações/ célula	aberrações (%)	46	44 45	1 ^a	2 ^a e 3 ^a
P16	Basal TSH	200	02	00	01	02	00	02	02 (0,01)	07 (0,035)	06 (3,0)	187	13	198	02
	Basal ¹³¹ I	077	00	00	00	01	00	00	00 (0,00)	01 (0,013)	01 (1,3)	075	02	076	01
	24h	062	00	00	01	00	01	00	00 (0,00)	02 (0,032)	02 (3,2)	060	02	062	00
	7 dias	200	05	00	01	01	02	00	05 (0,03)	09 (0,045)	09 (4,5)	170	30	183	17
	30 dias	200	03	00	03	02	02	00	03 (0,02)	10 (0,050)	10 (5,0)	164	36	196	04
P18	1 ano	200	00	00	01	00	01	00	00 (0,00)	02 (0,010)	02 (1,0)	186	14	188	12
	Basal TSH	200	01	00	01	00	01	02	01 (0,01)	05 (0,025)	05 (2,5)	177	23	198	02
	Basal ¹³¹ I	200	02	00	00	02	01	00	02 (0,01)	05 (0,025)	05 (2,5)	172	28	191	09
	24h	200	05	00	01	03	03	02	05 (0,03)	14 (0,070)	13 (6,5)	176	24	193	07
	7 dias	200	05	00	01	02	02	00	05 (0,03)	10 (0,050)	09 (4,5)	175	25	176	24
P20	30 dias	200	03	00	05	02	01	01	03 (0,02)	09 (0,045)	08 (4,0)	171	29	197	03
	1 ano	200	02	00	01	00	01	02	02 (0,01)	06 (0,030)	06 (2,5)	180	20	199	01
	Basal TSH	200	01	00	01	01	00	01	01 (0,01)	04 (0,020)	04 (2,0)	177	23	200	00
	Basal ¹³¹ I	200	01	00	00	00	01	01	01 (0,01)	03 (0,015)	03 (1,5)	172	28	200	00
	24h	200	07	00	03	03	02	03	07 (0,04)	18 (0,090)	18 (9,0)	170	30	194	06
P20	7 dias	200	03	01	02	01	02	01	03 (0,02)	10 (0,050)	10 (5,0)	169	31	197	03
	30 dias	200	01	00	00	01	01	00	01 (0,01)	03 (0,015)	03 (1,5)	180	20	184	16
	1 ano	200	00	00	00	01	00	00	00 (0,00)	01 (0,001)	01 (0,5)	199	01	187	13

Pac	Amostra	N. Cél	Aberrações Cromossômicas						Frequência	Número de	Células com	Centrômeros		Divisão celular	
		Analís.	Dice.	Anel	Ace.	Dm.	Gap	Queb.	dicêntrico/ célula	aberrações/ célula	aberrações (%)	46	44 45	1 ^a	2 ^a e 3 ^a
P23	Basal TSH	200	00	00	01	00	03	00	00 (0,00)	04 (0,020)	04 (2,0)	197	03	195	05
	Basal ¹³¹ I (*)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	114	03	00	00	02	02	00	03 (0,03)	07 (0,061)	07 (6,1)	113	01	114	00
	7 dias	200	02	00	00	05	02	00	02 (0,01)	09 (0,045)	08 (4,0)	194	06	182	18
	30 dias	200	00	00	01	02	01	00	00 (0,00)	04 (0,020)	04 (2,0)	197	03	189	11
P25	1 ano	200	01	00	02	00	00	01	01 (0,01)	04 (0,020)	04 (2,0)	186	14	190	10
	Basal TSH	200	00	00	00	00	01	00	00 (0,00)	01 (0,005)	01 (0,5)	195	05	199	01
	Basal ¹³¹ I	200	00	00	00	00	01	00	00 (0,00)	01 (0,005)	01 (0,5)	198	02	200	00
	24h	200	02	00	02	02	04	00	02 (0,01)	10 (0,050)	10 (5,0)	198	02	200	00
	7 dias	200	00	00	03	01	00	00	00 (0,00)	04 (0,020)	04 (2,0)	194	06	199	01
P27	35 dias	200	00	00	01	00	02	00	00 (0,00)	01 (0,015)	03 (1,5)	197	03	197	03
	1 ano (*)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Basal TSH	200	02	00	01	00	01	01	02 (0,01)	05 (0,025)	05 (2,5)	181	19	186	14
	Basal ¹³¹ I	200	01	00	00	01	01	01	01 (0,01)	04 (0,020)	04 (2,0)	182	18	192	08
	24h	200	06	00	02	02	04	01	06 (0,03)	15 (0,075)	15 (7,5)	186	14	183	17
P27	7 dias	200	03	00	01	00	02	01	03 (0,02)	07 (0,035)	07 (3,5)	181	19	183	17
	30 dias	200	01	01	00	00	00	02	01 (0,01)	04 (0,020)	04 (2,0)	181	19	190	10
	1 ano	200	02	00	00	00	00	00	02 (0,01)	02 (0,010)	02 (1,0)	198	02	193	07

Pac	Amostra	N. Cél	Aberrações Cromossômicas						Frequência	Número de	Células com	Centrômeros		Divisão celular	
		Analís.	Dice.	Anel	Ace.	Dm.	Gap	Queb.	dicêntrico/ célula	aberrações/ célula	aberrações (%)	46	44 45	1 ^a	2 ^a e 3 ^a
P29	Basal TSH	200	01	00	01	01	00	02	01 (0,01)	05 (0,025)	05 (2,5)	182	18	187	13
	Basal ¹³¹ I	200	01	00	02	00	01	00	01 (0,01)	04 (0,020)	04 (2,0)	180	20	195	05
	24h	200	04	00	02	03	02	01	04 (0,02)	12 (0,060)	12 (6,0)	171	29	182	18
	7 dias	200	04	00	02	03	00	03	04 (0,02)	12 (0,060)	12 (6,0)	171	29	199	01
	30 dias	200	03	01	00	02	01	00	03 (0,04)	07 (0,035)	07 (3,5)	178	22	197	03
P30	1 ano	200	02	00	00	00	00	02	02 (0,01)	04 (0,020)	04 (2,0)	178	22	196	04
	Basal TSH	134	00	00	00	00	00	00	00 (0,00)	00 (0,000)	00 (0,0)	131	03	134	00
	Basal ¹³¹ I	163	00	00	00	01	01	00	00(0,00)	02 (0,012)	02 (1,2)	161	02	163	00
	24h	025	00	00	00	00	00	00	00 (0,00)	00 (0,000)	00 (0,00)	24	01	025	00
	7 dias	200	00	00	01	01	02	00	00 (0,00)	04 (0,020)	04 (2,0)	196	04	199	01
P25	35 dias	200	00	00	00	00	02	00	00 (0,00)	02 (0,01)	02 (1,0)	197	03	199	01
	1 ano	117	02	00	01	01	00	00	02 (0,02)	04 (0,034)	04 (3,4)	114	03	105	12

Dice: Dicêntrico; Anel: Anel cêntrico e acêntrico; Ace: Fragmento acêntrico; Dm: *Double minute*; Gap: *Gap* cromossômico ou cromatídico; Queb: Quebra cromossômica ou cromatídica. (*) As amostras sanguíneas dos pacientes P14 (30 dias), P23 (basal) e P25 (1 ano) não foram levadas em consideração devido ao problema de cultivo celular

Anexo 2 – Tabelas com dados individuais dos pacientes do grupo B

Pacientes grupo B (receberam somente I ¹³¹)															
Pac	Amostra	N. Cél		Aberrações Cromossômicas					Frequência	Número de	Células com	Centrômeros		Divisão celular	
		Analís.	Dice.	Anel	Ace.	Dm.	Gap	Queb.	dicêntrico/célula	aberrações/célula	aberrações (%)	46	44 45	1 ^a	2 ^a e 3 ^a
P4	Basal	200	02	00	03	00	02	00	02 (0,01)	07 (0,035)	07 (3,5)	175	25	191	09
	24h	200	06	00	02	03	03	00	06 (0,03)	14 (0,070)	14 (7,0)	178	22	200	00
	7 dias	200	04	00	02	03	04	01	04 (0,02)	14 (0,070)	12 (6,0)	169	31	161	39
	30 dias	200	03	00	02	01	05	00	03 (0,02)	11 (0,055)	11 (5,5)	174	26	191	09
	1 ano	200	01	00	00	01	02	00	01 (0,01)	04 (0,020)	04 (2,0)	181	19	195	05
P5	Basal	200	02	00	02	02	00	00	02 (0,01)	06 (0,030)	06 (3,0)	176	24	198	02
	24h	200	04	00	03	00	01	02	04 (0,02)	10 (0,050)	10 (5,0)	180	20	194	06
	7 dias	200	04	00	01	01	01	03	04 (0,02)	10 (0,050)	10 (5,0)	172	28	191	09
	30 dias	200	05	00	01	00	01	01	05 (0,03)	08 (0,040)	08 (4,0)	165	35	169	31
	1 ano	200	01	00	00	01	02	00	01 (0,01)	04 (0,020)	04 (2,0)	185	15	200	00
P7	Basal	200	00	00	01	00	01	00	00 (0,00)	02 (0,010)	02 (1,0)	170	30	200	00
	24h	200	07	00	02	03	02	00	07 (0,04)	14 (0,070)	14 (7,0)	172	28	200	00
	7 dias	200	07	00	03	03	01	00	07 (0,04)	14 (0,070)	14 (7,0)	172	28	199	01
	30 dias	200	04	00	02	01	01	04	04 (0,02)	12 (0,060)	11 (5,5)	173	27	200	00
	1 ano	200	03	00	01	00	01	00	03 (0,02)	05 (0,025)	05 (2,5)	182	18	197	03

Pac	Amostra	N. Cél	Aberrações Cromossômicas						Frequência	Número de	Células com	Centrômeros		Divisão celular	
		Analís.	Dice.	Anel	Ace.	Dm.	Gap	Queb.	dicêntrico/ célula	aberrações/ célula	aberrações (%)	46	44 45	1 ^a	2 ^a e 3 ^a
P10	Basal	200	00	00	00	00	00	01	00 (0,00)	01 (0,005)	01 (0,5)	190	10	199	01
	24h	200	03	00	01	02	01	03	03 (0,02)	10 (0,050)	10 (5,0)	179	21	195	05
	7 dias	200	00	00	00	00	01	01	00 (0,00)	02 (0,010)	02 (1,0)	192	08	198	02
	30 dias	300	02	00	01	00	01	00	02 (0,01)	04 (0,013)	04 (1,3)	288	12	299	01
	1 ano	200	01	00	02	00	01	00	01 (0,01)	04 (0,015)	03 (1,5)	185	15	194	06
P12	Basal	200	01	00	00	00	01	00	01 (0,01)	02 (0,010)	02 (1,0)	174	26	179	21
	24h	200	09	00	03	03	01	01	09 (0,05)	17 (0,085)	17 (8,5)	174	26	193	07
	7 dias	200	03	00	02	02	00	01	03 (0,02)	08 (0,040)	08 (4,0)	173	27	194	06
	30 dias	200	03	00	01	02	00	01	03 (0,02)	07 (0,035)	07 (3,5)	168	32	197	03
	1 ano	200	02	00	00	02	01	01	02 (0,01)	06 (0,030)	06 (3,0)	189	11	185	15
P15	Basal	200	03	00	00	00	03	03	03 (0,02)	09 (0,045)	09 (4,5)	173	27	199	01
	24h	200	04	00	03	05	01	02	04 (0,02)	15 (0,075)	15 (7,5)	182	18	195	05
	7 dias	200	03	00	02	03	00	02	03 (0,02)	10 (0,050)	10 (5,0)	169	31	173	27
	30 dias	200	04	00	01	01	01	00	04 (0,02)	07 (0,035)	06 (3,0)	176	24	182	18
	1 ano	200	00	00	00	01	01	00	00 (0,00)	02 (0,010)	02 (1,0)	189	11	200	00
P17	Basal	200	01	00	00	01	00	00	01 (0,01)	02 (0,010)	02 (1,0)	196	04	198	02
	24h	200	01	00	01	00	02	00	01 (0,01)	04 (0,020)	04 (2,0)	196	04	191	09
	7 dias	067	02	00	00	00	00	00	02 (0,03)	02 (0,030)	02 (3,0)	066	01	065	02
	30 dias	200	01	00	00	00	02	00	01 (0,01)	03 (0,015)	03 (1,5)	199	01	195	05
	1 ano	020	00	00	00	00	01	00	00 (0,00)	01 (0,050)	01 (5,0)	020	00	020	00

Pac	Amostra	N. Cél	Aberrações Cromossômicas						Frequência	Número de	Células com	Centrômeros		Divisão celular	
		Analís.	Dice.	Anel	Ace.	Dm.	Gap	Queb.	dicêntrico/ célula	aberrações/ célula	aberrações (%)	46	44 45	1 ^a	2 ^a e 3 ^a
P19	Basal	200	00	00	00	01	00	00	00 (0,00)	01 (0,005)	01 (0,5)	197	03	170	30
	24h	200	02	00	01	00	02	00	02 (0,01)	05 (0,025)	05 (2,5)	196	04	189	11
	7 dias	200	02	00	01	00	00	00	02 (0,01)	03 (0,015)	03 (1,5)	196	04	185	15
	30 dias	200	00	00	00	01	01	00	00 (0,00)	02 (0,010)	02 (1,0)	196	04	199	01
	1 ano	200	01	00	00	00	01	00	01 (0,01)	02 (0,010)	02 (1,0)	199	01	194	06
P26	Basal	200	01	00	00	01	01	01	01 (0,01)	04 (0,020)	04 (2,0)	167	33	197	03
	24h	200	06	00	03	02	03	01	06 (0,03)	15 (0,075)	15 (7,5)	176	24	190	10
	7 dias	200	04	00	02	03	01	02	04 (0,02)	12 (0,060)	12 (6,0)	178	22	179	21
	30 dias	200	02	00	02	00	01	01	02 (0,01)	06 (0,030)	06 (3,0)	183	17	194	06
	1 ano	161	00	00	01	01	00	02	00 (0,00)	04 (0,025)	04 (2,5)	147	14	161	00
P29	Basal	200	00	00	01	00	02	00	00 (0,00)	03 (0,015)	03 (1,5)	194	06	200	00
	24h	200	00	01	01	02	02	00	00 (0,00)	06 (0,030)	06 (3,0)	197	03	198	02
	7 dias	118	00	01	00	00	00	00	00 (0,00)	01 (0,008)	01 (0,8)	116	02	117	01
	30 dias	200	00	00	00	04	00	00	00 (0,00)	04 (0,020)	04 (2,0)	198	02	196	04
	1 ano	200	01	00	00	00	00	00	01 (0,01)	01 (0,005)	01 (0,5)	198	02	197	03

Dice: Dicêntrico; Anel: Anel cêntrico e acêntrico; Ace: Fragmento acêntrico; Dm: *Double minute*; Gap: Gap cromossômico ou cromatídico; Queb: Quebra cromossômica ou cromatídico

Anexo 3 -Dados do ensaio do micronúcleo em células WRO expostas somente a ^{131}I .

1o. EXP.	Atividade (MBq)	Total CB	Total MN	1MN	2MN	3MN	4MN	5MN	MN/CB	CB comMN	%CBMN	Brotos	Pontes
IODO	0,00	503	7	7	0	0	0	0	0,014	7	1,4	5	3
	0,07	543	7	7	0	0	0	0	0,013	7	1,3	5	6
	0,18	521	8	8	0	0	0	0	0,015	8	1,5	2	5
	0,37	505	8	8	0	0	0	0	0,016	8	1,6	3	3
	0,55	396	7	7	0	0	0	0	0,018	7	1,8	3	2
	0,74	503	7	7	0	0	0	0	0,014	7	1,4	6	3
	1,85	502	8	6	1	0	0	0	0,016	7	1,4	2	3
	3,70	505	6	6	0	0	0	0	0,012	6	1,2	0	5
2o. EXP.	Atividade (MBq)	total CB	total MN	1MN	2MN	3MN	4MN	5MN	MN/CB	CB comMN	%CBMN	Brotos	Pontes
IODO	0,00	509	3	3	0	0	0	0	0,006	3	0,6	1	2
	0,07	506	5	5	0	0	0	0	0,010	5	1,0	2	2
	0,18	526	3	3	0	0	0	0	0,006	3	0,6	0	1
	0,37	521	4	4	0	0	0	0	0,008	4	0,8	0	3
	0,55	501	4	4	0	0	0	0	0,008	4	0,8	1	1
	0,74	504	3	3	0	0	0	0	0,006	3	0,6	2	1
	1,85	504	4	4	0	0	0	0	0,008	4	0,8	2	0
	3,70	501	3	3	0	0	0	0	0,006	3	0,6	0	3
3o. EXP.	Atividade (MBq)	total CB	total MN	1MN	2MN	3MN	4MN	5MN	MN/CB	CB comMN	%CBMN	Brotos	Pontes
IODO	0,00	502	4	4	0	0	0	0	0,008	4	0,8	0	0
	0,07	503	6	6	0	0	0	0	0,012	6	1,2	0	1
	0,18	525	3	3	0	0	0	0	0,006	3	0,6	0	3
	0,37	512	5	5	0	0	0	0	0,010	5	1,0	3	0
	0,55	501	5	5	0	0	0	0	0,010	5	1,0	1	3
	0,74	501	3	3	0	0	0	0	0,006	3	0,6	1	4
	1,85	503	3	3	0	0	0	0	0,006	3	0,6	3	3
	3,70	518	3	3	0	0	0	0	0,006	3	0,6	0	1

Anexo 4 – Dados do ensaio do micronúcleo em células WRO expostas a ^{131}I e r-hTSH.

1o. EXP.	Atividade (MBq)	Total CB	Total MN	1MN	2MN	3MN	4MN	5MN	MN/CB	CB comMN	%CBMN	Brotos	Pontes
IODO +	0,00	506	3	3	0	0	0	0	0,006	3	0,6	3	2
	0,07	501	5	5	0	0	0	0	0,010	5	1,0	5	3
	0,18	522	4	4	0	0	0	0	0,008	4	0,8	2	1
	0,37	510	4	4	0	0	0	0	0,008	4	0,8	0	3
	0,55	500	3	3	0	0	0	0	0,006	3	0,6	5	4
	0,74	501	5	5	0	0	0	0	0,010	5	1,0	3	1
	1,85	502	3	3	0	0	0	0	0,006	3	0,6	2	2
	3,70	508	3	3	0	0	0	0	0,006	3	0,6	3	4
2o. EXP.	Atividade (MBq)	Total CB	Total MN	1MN	2MN	3MN	4MN	5MN	MN/CB	CB comMN	%CBMN	Brotos	Pontes
IODO +	0,00	503	4	4	0	0	0	0	0,008	4	0,8	5	2
	0,07	501	5	5	0	0	0	0	0,010	5	1,0	3	5
	0,18	517	4	4	0	0	0	0	0,008	4	0,8	0	1
	0,37	505	6	6	0	0	0	0	0,012	6	1,2	2	1
	0,55	502	5	5	0	0	0	0	0,010	5	1,0	3	4
	0,74	513	5	5	0	0	0	0	0,010	5	1,0	1	0
	1,85	506	4	4	0	0	0	0	0,008	4	0,8	5	3
	3,70	507	6	6	0	0	0	0	0,012	6	1,2	2	4
3o. EXP.	Atividade (MBq)	Total CB	Total MN	1MN	2MN	3MN	4MN	5MN	MN/CB	CB comMN	%CBMN	Brotos	Pontes
IODO +	0,00	501	4	4	0	0	0	0	0,008	4	0,8	3	2
	0,07	500	4	4	0	0	0	0	0,008	4	0,8	3	1
	0,18	503	5	5	0	0	0	0	0,010	5	1,0	5	2
	0,37	505	4	4	0	0	0	0	0,008	4	0,8	4	3
	0,55	501	3	3	0	0	0	0	0,006	3	0,6	2	1
	0,74	500	4	4	0	0	0	0	0,008	4	0,8	0	2
	1,85	507	5	5	0	0	0	0	0,010	5	1,0	3	0
	3,70	503	4	4	0	0	0	0	0,008	4	0,8	2	1

Anexo 5– Termo de outorga e aceitação de auxílio FAPESP

Processo : 2010/51417-0

Folha : _____

Volume : _____

Rubrica : _____

TERMO DE OUTORGA E ACEITACAO DE AUXÍLIO

PROCESSO Nº 2010/51417-0

O Conselho Técnico-Administrativo da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, doravante denominada **OUTORGANTE**, usando das atribuições que lhe confere o Artigo 14, letra "b", da lei Estadual no 5.918, de 18 de outubro de 1960, e de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que são parte integrante deste Termo, concede:

OUTORGADO
PAOLO BARTOLINI
CPF: 874.972.478-91

INSTITUIÇÃO
04 005 004 - INST PESQUISAS ENERGETICAS NUCLEARES/SDSP

LINHA DE FOMENTO
AUXILIO PESQUISA - REGULAR

PROJETO
ESTUDO DOSIMETRICO E DO EFEITO CITOGENETICO DO 131-I EM PACIENTES COM
CANCER DIFERENCIADO DA TIREOIDE: COMPARACAO ENTRE TERAPIA DE
ESTIMULACAO COM R-HTSH E TERAPIA DE SUSPENSAO DO HORMONIO TIREOIDIANO.

ÁREA
04010000 - MEDICINA

PERÍODO
01/10/2010 a 30/09/2012

RELATÓRIOS CIENTÍFICOS ATÉ:
30/09/2011, 30/10/2012

PRESTAÇÃO DE CONTAS ATÉ:
30/09/2011, 30/10/2012

OBSERVAÇÕES

- 1) Qualquer alteracao na distribuicao dos recursos entre os elementos de despesa, deve ser previamente autorizada pela Outorgante.
 - 2) Os recursos concedidos neste Termo de Outorga devem ser utilizados na vigencia do projeto.
 - 3) Os prazos para apresentacao de prestacao de contas e relatorios cientificos deverao ser rigorosamente observados; caso contrario, a Outorgante nao liberara qualquer recurso existente em nome do Outorgado.
 - 4) Material de consumo (se houver): Caso sejam adquiridos materiais que nao sejam manifestamente necessarios a realizacao deste projeto, a Outorgante podera impugnar as despesas correspondentes na prestacao de contas.
 - 5) O Outorgado reconhece que o auxilio concedido, nos termos aqui descritos, viabilizam plenamente a execucao do projeto, salvo circunstancias imprevisiveis no ato da assinatura. Solicitacoes de qualquer alteracao de orcamento, exceto em casos emergenciais, poderao ser apresentadas por ocasio da apresentacao do(s) relatorio(s) cientifico(s).
 - 6) As instrucoes para a prestacao de contas e liberacao de verba deverao ser consultadas atraves do portal da FAPESP no endereco: www.fapesp.br/formularios.
 - 7) Havendo concessao em moeda estrangeira, a aquisicao de bens ou pagamento de servicos no exterior, sera realizada pela FAPESP, devendo o Outorgado encaminhar a solicitacao de agendamento para o endereco eletronico agendaimportacao@trieste.fapesp.br.
- Continua no anexo...

Anexo 6– Carta de aprovação da CAPPesq

Recebido por: Sônia
 Nome legível
 Data: 24/2/2011

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23/02/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 0741/10, intitulado: **"DESENVOLVIMENTO DE CÁLCULOS DOSIMÉTRICOS PARA PACIENTES COM CÂNCER DIFERENCIADO DE TIREÓIDE COM TERAPIA COM 131I (NAI) PRECEDIDA DE REC-HTSH E CORRELAÇÃO ENTRE DOSE ABSORVIDA E EFEITOS DELETÉRIOS DA RADIAÇÃO NO ORGANISMO HUMANO"** apresentado pelo Departamento de **RADIOLOGIA E RADIOTERAPIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, Inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Carlos Alberto Buchpiguel**
 Pesquisador (a) Executante: **Julia Armillato Gonzalez**

CAPPesq, 24 de Fevereiro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
 Coordenador
 Comissão de Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 8442 Fax: 011 3069 8492
 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Anexo 7– Termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pela CAPPesq**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

1.NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº..... APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE:(.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:..... Nº..... APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE:(.....).....

PESQUISADOR : Carlos Alberto Buchpiguel

CARGO/FUNÇÃO: Diretor

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL

51371

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Medicina Nuclear do InRad.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☒

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Este termo de consentimento é dirigido a pacientes ou responsáveis por pacientes portadores de carcinoma de tireóide que farão tratamento com ^{131}I e permanecerão sem tratamento hormonal substitutivo (estado hipotireóideo) ou permanecerão com tratamento hormonal substitutivo e receberão estímulo com TSH recombinante (rhTSH) (estado eutireóideo).

Essas informações serão fornecidas para sua participação voluntária nesse estudo que visa averiguar os efeitos do tratamento com ^{131}I . Já se reconhece o valor do iodo-131 como modalidade complementar de tratamento após retirada cirúrgica do tumor de tireóide, pois o seu uso diminui a taxa de recidiva da doença e permite um acompanhamento mais preciso da doença através de exames laboratoriais que são realizados de rotina. Sabe-se que a quantidade radiação é alta, porém suficiente para produzir os efeitos de tratamento desejados e com mínimas repercussões no corpo humano. Um destes efeitos é a produção de alterações em algumas células do sangue e de alguns órgãos (alterações cromossômicas), que com o tempo serão eliminadas do corpo sem maiores repercussões. O desenvolvimento de uma técnica de estímulo com TSH recombinante (rhTSH), que é um medicamento que aumenta a concentração de TSH (hormônio estimulador de tecido tireoideano) no sangue dos pacientes para sensibilizar o tratamento com iodo-131, permitiu que esse tratamento fosse realizado

sem que o paciente tenha que suspender a terapia com hormônios, essencial para o funcionamento de vários órgãos do corpo humano e também para o bem estar do paciente. Há ainda controvérsias se o uso do rhTSH reduz a dose de radiação que o paciente absorve nos órgãos. O presente estudo tem por objetivo avaliar e comprovar se há efetivamente redução no grau de exposição à radiação comparado com o método convencional de suspensão da terapia hormonal. O desenho do estudo consiste na análise de alterações nas células do sangue (aberrações cromossômicas) obtidas através de coleta simples de amostra de sangue e urina dos pacientes com carcinoma tireoidiano, tratados com iodo-131 sob forma convencional (hipotireoidismo) e sob forma estimulada com rhTSH (eutireoidismo).

Como já foi comentado acima, o tratamento com iodo-131 é utilizado há aproximadamente 50 anos e é considerado eficaz e seguro. Os pacientes serão divididos em dois grupos conforme a técnica de estímulo de TSH empregada. Os pacientes que apresentarem história de intolerância à falta de terapia hormonal, pacientes com idade > 65 anos, pacientes com outras doenças graves associadas (cardíacas, renais, neurologias e psiquiátricas), pacientes com contra-indicações para suspensão da terapia hormonal substitutiva serão obrigatoriamente inseridos no grupo de pacientes que receberão rhTSH.

Antes de receber o tratamento será coletada uma amostra de sangue para estudo. Isso se repetirá dentro de 24 horas, uma semana, um mês e um ano após você ter recebido a dose. As amostras de sangue serão coletadas no Hospital das Clínicas da FMUSP e enviadas ao IPEN-CNEN/SP, onde serão feitos os testes para a identificação de eventuais aberrações cromossômicas que possam aparecer em decorrência do tratamento administrado. Essas amostras de sangue serão utilizadas única e exclusivamente para análise cromossômica pela Dra. Márcia Augusta da Silva, no Laboratório de Cultura Celular do Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/CNEN/SP.

Para a coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço, todo o material utilizado será descartável, sem risco para sua saúde. Apesar da coleta de sangue não provocar dor, após a coleta poderá surgir um pequeno hematoma (a área do braço poderá ficar com a coloração roxa) e você sentir uma leve dor no local. Essa dor é momentânea e o hematoma desaparecerá em poucos dias. Isso não irá atrapalhar ou prejudicar o seu tratamento.

Além da coleta de sangue, haverá coleta de urina durante as primeiras 24 horas. Toda a urina produzida deverá ser coletada em um frasco que estará a sua disposição.

Não há benefício direto para você, entretanto essa coleta se destina a um estudo experimental na tentativa de estabelecer condutas de acompanhamento dos indivíduos tratados com ^{131}I e a persistência de anormalidades nas células do sangue (aberrações cromossômicas) após 1 ano de tratamento. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício que poderá ajudar futuramente outras pessoas doentes e que deverão receber tratamento assim como você recebeu. O seu tratamento será conduzido de forma padronizada e não sofrerá nenhum prejuízo pela sua participação no estudo. A sua participação poderá contudo favorecer, conforme os resultados obtidos, outros pacientes no futuro. Igualmente, caso não queira participar no projeto, o tratamento será realizado da mesma forma e cuidado, não ocorrendo qualquer prejuízo para você ao se recusar em participar neste projeto de pesquisa.

Como se trata de um estudo de acompanhamento de efeitos tardios do ^{131}I em nível celular não há procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para você.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são: a *Dra Márcia Augusta da Silva* que pode ser encontrado no endereço *Av. Professor Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária* Telefone(s) 3133-9701 e o *Dr. Carlos Alberto Buchpiguel* que pode ser encontrado no endereço *Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 – Cerqueira César* Telefone(s) 3069-6442. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – *Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar* – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente, mantendo o sigilo e privacidade das informações. Você terá direito de ser mantido atualizado

sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas pessoais para você em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Nós nos comprometemos a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "*Estudo dosimétrico e efeito citogenético do ¹³¹I em pacientes com câncer diferenciado da tireóide: comparação entre terapia de estimulação com rec-htsh e terapia de suspensão com hormônio tireoidiano*". Eu discuti com o Dr. Carlos Alberto Buchpiguel sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante
legal

Data ____ / ____ / ____

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo
estudo

Data ____ / ____ / ____

Anexo 8– Orientação para internação

C. Orientações para internação e tratamento com iodo-131

Seu tratamento está marcado para:

____/____/____ às ____ : ____ h.

- Almoçar às 11 horas da manhã e manter jejum a seguir
- Comparecer no Prédio dos Ambulatórios (PAMB), no 4º andar, sala 2, com a guia AIH para a internação. Você será encaminhado ao Instituto Central do Hospital das Clínicas, na enfermaria da Endocrinologia – 7º andar
- Se não puder comparecer na hora marcada, informe com antecedência pelo fone: 3069-8058
- Trazer roupas e objetos de uso pessoal (toalha, escova, sabonete,...)
- Se quiser, pode trazer balas, chicletes, sucos, refrigerantes e frutas
- Paciente menor de 18 anos deve estar acompanhado por um dos pais ou responsável legal na internação e na alta hospitalar.

Exames solicitados– colher no Serviço de Medicina Nuclear (2º andar) no dia ____/____/____

() TSH, Tireoglobulina, Anti-tireoglobulina

() β -hCG

Preparo para o tratamento:

Suspender as medicações antes do tratamento:

- Interromper uso de T4 (Puran-T4, Tetroid, Synthroid, Euthyrox) em: ____/____/____

- por 30 dias = Medicamentos iodados (ex: xarope para tosse);

- por 3 meses = Amiodarona (Atlansil, Ancoron, Miodaron)

Evitar alimentos e substâncias que contenham iodo antes do tratamento:

Evitar o máximo possível os seguintes alimentos por 15 dias:

Peixe e frutos do mar	Leite e derivados	Enlatados	Chocolate
Sal (diminuir a quantidade)	Alimentos com corantes vermelhos		
Verduras de folhas verdes (agrião, rúcula, brócolis, repolho, etc.)			

Não usar por 15 dias:

Esmalte (nas unhas das mãos e pés) e Maquiagem (base, pó-de-arroz, batom)

Não fazer por 1 mês:

Tintura para cabelo	Exame ginecológico
Tintura de iodo (uso tópico)	Tratamento dentário cirúrgico ou de canal

Não fazer por 3 meses: Raio-X ou Tomografia com contraste

Após a alta hospitalar:

- será orientado a evitar por 3 dias contatos próximos prolongados com outras pessoas, em especial crianças até 18 anos e gestantes (dormir em quarto separado, se possível usar banheiro separado).

- deverá retornar ao Centro de Medicina Nuclear para realizar cintilografia no dia: ____/____/____

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE (etiqueta)

Nome _____

Sexo _____

Data nascimento _____

RGHC _____

Anexo 9– Orientação após alta hospitalar

PROCEDIMENTOS TERAPÊUTICOS - 10

D. Orientações após tratamento do câncer de tireoide com iodo-131

Roupas: Coloque as roupas que foram utilizadas durante o tratamento e que foram liberadas, de molho por 24 horas, mexendo bem e trocando a água e o sabão a cada 4 horas. As roupas devem ser lavadas na mão com bastante água e sabão, devem ser torcidas e penduradas para secar.

Quarto: Dormir em quarto separado (sozinha/sozinho) por _____ semanas ou _____ dias, após a alta hospitalar.

Banheiro: Utilizar, se possível, o banheiro sozinho(o), urinando bem dentro do vaso sanitário e não deixando pingar urina no chão. Caso isso aconteça, jogar detergente, esfregar e enxaguar.

O papel higiênico deve ser jogado no vaso e dar 03 descargas cada vez que usar o mesmo.

Urinar antes de tomar banho.

Ao escovar os dentes, cuspir bem dentro da pia e deixar cair bastante água. De vez em quando jogue um pouco de detergente. Esses cuidados deverão ser tomados por 48 horas.

Cozinha: Não há necessidade de separar pratos, talheres e copos, basta lavar bem com bastante água e detergente. Pode preparar os alimentos, lavando constantemente as mãos.

Permanecer durante 48 horas a 1 metro dos adultos da casa.

Higiene: Lave bem os cabelos todos os dias até a data do exame PCI (pesquisa de corpo inteiro), que será realizado na data escrita no lembrete entregue pelo médico.

Não venha fazer o exame (PCI), com nenhuma das peças de roupa que você usou durante a internação no quarto de iodoterapia.

NÃO manter contato com crianças (até 18 anos) e grávidas durante UMA SEMANA após a alta hospitalar.

Beber muito líquido por mais 48 horas.

Você está liberado da dieta alimentar, como e beba o que gostar e achar melhor.

Dúvidas sobre os cuidados com radiação: Dra. Maria Inês, tel: 3069-8136

Acompanhamento médico e seguimento após a alta:

- Será necessário fazer acompanhamento clínico e reposição dos hormônios da tireoide.
- Retornar para Cintilografia (PCI) no Centro de Medicina Nuclear, dia ____/____/____ às ____:____h (não precisa de jejum)
- Medicação a ser tomada:
 - REPOSIÇÃO HORMONAL: _____
 - LAXANTE: _____ (no dia ____/____/____, véspera da PCI)
- No caso de aparecimento ou piora de sintomas clínicos, procurar os médicos da Medicina Nuclear ou, na ausência destes, o serviço de Pronto-Socorro.

Anexo 10– Ficha

Ficha

Protocolo: "DESENVOLVIMENTO DE CÁLCULOS DOSIMÉTRICOS PARA PACIENTES COM CÂNCER DIFERENCIADO DE TIREÓIDE COM TERAPIA COM ¹³¹I (NaI) PRECEDIDA DE rec-hTSH E CORRELAÇÃO ENTRE DOSE ABSORVIDA E EFEITOS DELETÉRIOS DA RADIAÇÃO NO ORGANISMO HUMANO"

Nome do paciente:	
Telefone de contato: ()	
Grupo:	☐ Hipotireoidismo (Grupo A) ☐ rec-hTSH (Grupo B)
Número do paciente no protocolo:	RGHC:
Idade:	
Sexo:	☐ F ☐ M
Dose administrada:	mCi (medida no calibrador de dose na data da administração)
Data e hora da administração de iodo:	

Data/Horário	Taxa de exposição (mR/h)	
	1m	2m

URINA

[illegible]

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bahn, R. S. C.; Burch, H. B.; Cooper, D. S.; Garber, J. R.; Greenlee, M. C.; Klein, I.; Laurberg, P.; McDougall, I. R.; Montori, V. M.; Rivkees, S. A.; Ross, D. S.; Sosa, J. A.; Stan, M. N. Hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis: management guidelines of the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologists. **Thyroid**, 21(6):593-646, 2011.
2. Ballardin, M.; Gemignani, F.; Bodei, L.; Mariani, G.; Ferdeghini, M.; Rossi, A. M.; Migliore, L.; Barale, R. Formation of micronuclei and of clastogenic factor(s) in patients receiving therapeutic doses of iodine-131. **Mutat. Res.**, 514(1-2):77-85, 2002.
3. Borget, I.; Corone, C.; Nocaudie, M.; Allyn, M.; Lacobelli, S.; Schlumberger, M.; De Pouvourville, G. Sick leave for follow-up control in thyroid cancer patients: comparison between stimulation with Thyrogen and thyroid hormone withdrawal. **Eur. J. Endocrinol.**, 156(5):531-8, 2007.
4. Borget, I.; Remy, H.; Chevalier, J.; Ricard, M.; Allyn, M.; Schlumberger, M.; De Pouvourville, G. Length and cost of hospital stay of radioiodine ablation in thyroid cancer patients: comparison between preparation with thyroid hormone withdrawal and thyrogen. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**. 35 (8):1457-1463, 2008.
5. Buckton, K.E., & Evans, H.J. Methods for the analysis of human chromosome aberrations. **World Health Organization**, Geneva. 1973.
6. Carvalho, M.R.; Ferreira, T.C.; Leite, V. Evaluation of whole-body retention of iodine-131 (¹³¹I) after postoperative remnant ablation for differentiated thyroid carcinoma-thyroxine withdrawal versus r-hTSH administration: A retrospective comparison. **Oncology Letters**, 3 (3): 617-620, 2012.
7. Catena, C.; Conti, D.; Trenta, G.; Righi, E.; Breuer, F.; Melacrinis, F. F.; Montesano, T.; Ventroni, G.; Ronga, G. Micronucleus yield and colorimetric test as indicators of damage in patients' lymphocytes after ¹³¹I therapy. **J. Nucl. Med.**, 41(9):1522-4, 2000.

8. Cerutti, J. M.; Delcelo, R.; Amadei, M. J.; Nakabashi, C.; Maciel, R. M. B.; Peterson, B.; Iggins, G. J. A preoperative diagnostic test that distinguishes benign from malignant thyroid carcinoma based on gene expression. **J. Clin. Investigation**, 113(8):1234–1242, 2004.
9. Chen, A. Y.; Jemal, A.; Ward, E. M. Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988-2005. **Cancer**, 115(16):3801-7, 2009.
10. Chevillard, S.; Ugolin, N.; Vielh, P.; Ory, K.; Levalois, C.; Elliott, D.; Clayman, G. L.; El-Naggar, A. K. Gene expression profiling of differentiated thyroid neoplasms: diagnostic and clinical implications. **Clin. Cancer Res.**, 10(19):6586-97, 2004.
11. Cole, E. S.; Lee, K.; Lauziere, K.; Kelton, C.; Chappel, S.; Weintraub, B.; Ferrara, D.; Peterson, P.; Bernasconi, R.; Edmunds, T.; *et al.* Recombinant human thyroid stimulating hormone: development of a biotechnology product for detection of metastatic lesions of thyroid carcinoma. **Biotechnology (NY)**, (9):1014-24, 1993.
12. Countryman, P. I.; Heddle; J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutat. Res.**, (2-3):321-32, 1976.
13. Cooper, D.S.; Doherty, G.M.; Haugen, B.R.; Kloos, R.T., Lee, S.L.; Mandel S.J.; Mazzaferri, E.L.; Mclver, B.; Pacini F.; Schlumberger, M.; Sherman, S.I.; Steward, D.L.; Tuttle, R.M. Revised American Thyroid Association (ATA) management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. **Thyroid**, 19 (11): 1167-1214, 2009.
14. Cory, A. H.; Owen, T. C.; Barltrop, J. A.; Cory, J. G. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Communication**, 3 (7): 207-212, 1991.
15. Cramer, J. D.; Fu, P.; Harth, K. C.; Margevicius, S.; Wilhelm, S. M. Analysis of the rising incidence of thyroid cancer using the Surveillance, Epidemiology and End Results national cancer data registry. **Surgery**, 148(6):1147-52, 2010.

16. Da Silva, M.A.; Guimarães, M.I.C.C.; Yoriyaz, H.; Ribela, M.T.C.P.; Buchpiguel, C.A.; Bartolini, P.; Okazaki, K. Evaluation of the cytogenetic effects of ^{131}I preceded by recombinant human thyrotropin (r-hTSH) in peripheral lymphocytes of Wistar rats. **Radiat. Environ. Biophys.**, 47 (4):453-461, 2008.
17. Damiani, R.; Oliveira, J. E. ; Vorauer-Uhl, K.; Peroni, C.N.; Vianna, E.G.; Bartolini, P.; Ribela, M.T. Stable expression of a human-like sialylated recombinant thyrotropin in a Chinese hamster ovary cell line expressing $\alpha 2,6$ -sialyltransferase. **Prot. Expr. Purification**, 67 (1): 7-14, 2009.
18. de Keizer, B.; Hoekstra, A.; Konijnenberg, M. W.; de Vos, F.; Lambert, B.; van Rijk, P. P.; Lips, C. J.; de Klerk, J. M. Bone marrow dosimetry and safety of high ^{131}I activities given after recombinant human thyroid-stimulating hormone to treat metastatic differentiated thyroid cancer. **J. Nucl. Med.**, 45(9):1549-54, 2004.
19. de Keizer B.; Koppeschaar, H. P.; Zelissen; P. M.; Lips, C. J.; van Rijk, P. P.; van Dijk, A.; de Klerk, J. M. Efficacy of high therapeutic doses of iodine-131 in patients with differentiated thyroid cancer and detectable serum thyroglobulin. **Eur. J. Nucl. Med.**, 28(2):198-202, 2001
20. Duntas, L. H.; Biondi, B. Short-term hypothyroidism after Levothyroxine-withdrawal in patients with differentiated thyroid cancer: clinical and quality of life consequences. **Eur. J. Endocrinol.**, 156(1):13-9, 2007.
21. El-Refaei, S. M.; Yassin, S. W.; Salman, K.; Al Munshy, T.; Al-Ezzi, M.; Al-Sayed, Y. M.; Abd Elkareem Husseni, M. Comparison between low and high radioactive iodine (^{131}I) reablation dose in patients with papillary thyroid cancer. **Nucl. Med. Commun.**, 36(2):114-9, 2015.
22. Erselcan, T.; Sungu, S.; Ozdemir, S.; Turgut, B.; Dogan, D.; Ozdemir, O. Iodine-131 treatment and chromosomal damage: in vivo dose-effect relationship. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**, 31(5):676-84, 2004.
23. Estour, B.; Van Herle, A. J.; Juillard, G. J.; Totanes, T. L.; Sparkes, R. S.; Giuliano, A. E.; Klandorf, H. Characterization of a human follicular thyroid carcinoma cell line (UCLA RO 82 W-1). **Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.**, 57(3):167-74, 1989.

24. Fenech, M.; Holland, N.; Chang, W. P.; Zeiger, E.; Bonassi, S. The HUman MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat. Res.** 428(1-2):271-83, 1999.
25. Fenech, M.; Morley, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat. Res.**, 147(1-2):29-36, 1985.
26. Fenech, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat. Protoc.**,2(5):1084-104, 2007.
27. Frasca, F.; Nucera, C.; Pellegriti, G.; Gangemi, P.; Attard, M.; Stella, M.; Loda, M.; Vella, V.; Giordano, C.; Trimarchi, F.; Mazzon, E.; Belfiore, A.; Vigneri, R. BRAF(V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer. **Endocr. Relat.Câncer**,15(1):191-205, 2008.
28. Frigo, A.; Dardano, A.; Danese, E.; Davi, M.V.; Moghetti, P.; Colato, C.; Francia, G.; Bernardi, F.; Traino, C.; Monzani, F.; Ferdeghini, M. Chromosome translocation frequency after radioiodine thyroid remnant ablation: a comparison between r-hTSH stimulation and prolonged levothyroxine withdrawal. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 94(9): 3472-3476, 2009.
29. Gauchotte, G.; Philippe, C.; Lacomme, S.; Léotard, B.; Wissler, M. P.; Allou, L.; Toussaint, B.; Klein, M.; Vignaud, J. M.; Bressenot, A. BRAF, p53 and SOX2 in anaplastic thyroid carcinoma: evidence for multistep carcinogenesis. **Pathology**, 43(5):447-52, 2011.
30. Gil, O. M.; Oliveira, N. G.; Rodrigues, A. S.; Laires, A.; Ferreira, T. C.; Limbert, E.; Léonard, A.; Gerber, G.; Rueff, J. Cytogenetic alterations and oxidative stress in thyroid cancer patients after iodine-131 therapy. **Mutagenesis**,15(1):69-75, 2000.
31. Grodski, S.; Delbridge, L. An update on papillary microcarcinoma. **Curr. Opin. Oncol.**, 21(1):1-4, 2009.

32. Gutiérrez, S.; Carbonell, E.; Galofré, P.; Creus, A.; Marcos, R. Application of the single cell gel electrophoresis (SCGE) assay to the detection of DNA damage induced by ^{131}I treatment in hyperthyroidism patients. **Mutagenesis**,13(1):95-8, 1998.
33. Gutiérrez, S.; Carbonell, E.; Galofré, P.; Creus, A.; Marcos, R. Cytogenetic damage after 131-iodine treatment for hyperthyroidism and thyroid cancer. A study using the micronucleus test. **Eur. J. Nucl. Med.**,26(12):1589-96, 1999.
34. Hänscheid,H.; Lassmann, M.; Luster, M.; Thomas, S.R.; Pacini, F.; Ceccarelli, C.; Ladenson, P.W.; Wahl, R.L.; Schlumberger, M.; Ricard, M.; Driedger, A.; Kloos, R.T.; Sherman, S; Haugen, B.R.; Carriere, V.; Corone, C.; Reiners, C. Iodine biokinetics and dosimetry in radioiodine therapy of thyroid cancer: procedures and results of a prospective international controlled study of ablation after r-hTSH or hormone withdrawal. **J. Nucl. Med.**, 47 (4): 648-654, 2006.
35. INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA/PRO-ONCO) – Ministério da Saúde, Rio de Janeiro 2014.
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>. Acesso em 04/07/2014.
36. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A manual. Technical Report Series n° 405. Vienna, IAEA; 2001.
37. IPEN – INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES, 2012. Disponível em
<https://www.ipen.br/conteudo/upload/201002191132320.IODO%20%20131%20I.pdf>. Acesso em 23/07/2014.
38. Jemal, A.; Siegel, R.; Xu, J.; Ward, E. Cancer statistics, 2010. **CA Cancer J. Clin.**, 60(5):277-300, 2010.

39. Ji, W.; Bian, Z.; Yu, Y.; Yuan, C.; Liu, Y.; Yu, L.; Li, C.; Zhu, J.; Jia, X.; Guan, R.; Zhang, C.; Meng, X.; Jin, Y.; Bai, J.; Yu, J.; Lee, K. Y.; Sun, W.; Fu, S. Expulsion of micronuclei containing amplified genes contributes to a decrease in double minute chromosomes from malignant tumor cells. **Int. J. Cancer**, 134(6):1279-88, 2014.
40. Kent, W. D.T.; Hall, S. F.; Isotalo, P. A.; Houlden, R. L.; George, R. L.; Groome, P. A. Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and detection of subclinical disease. **Canad. Med. Ass. J.**, 177(11):1357-1361, 2007.
41. Kim, C. S. & Zhu, X. Lessons from Mouse Models of Thyroid Cancer. **Thyroid**, 19(12), 1317–1331, 2009.
42. Kleiman, D. A.; Sporn, M. J.; Beninato, T.; Crowley, M. J.; Nguyen, A.; Uccelli, A.; Scognamiglio, T.; Zarnegar, R.; Fahey, T. J. Preoperative BRAF(V600E) mutation screening is unlikely to alter initial surgical treatment of patients with indeterminate thyroid nodules. **Cancer**, 119: 1495–1502, 2013.
43. Lacroix, L.; Lazar, V.; Michiels, S.; Ripoche, H.; Dessen, P.; Talbot, M.; Bidart, J. M. Follicular Thyroid Tumors with the PAX8-PPAR γ 1 Rearrangement Display Characteristic Genetic Alterations. **The American J. of Pathology**, 167(1), 223–231, 2005.
44. Ladenson, P. W.; Kristensen, J. D.; Ridgway, E. C.; Olsson, A. G.; Carlsson, B.; Klein, I.; Baxter, J. D.; Angelin, B. Use of the thyroid hormone analogue eprotirome in statin-treated dyslipidemia. **N. Engl. J. Med.** 362(10):906-16, 2012.
45. Lassmann, M.; Reiners, C.; Luster, M. Dosimetry and thyroid cancer: the individual dosage of radioiodine. **Endocr. Relat. Cancer.**, 17(3):R161-72, 2010.
46. Latini, F. R. M.; Hemerly, J. P.; Oler, G.; Riggins, G. J.; Cerutti, J. M. Re-expression of ABI3BP Suppresses Thyroid Tumor Growth by Promoting Senescence and Inhibiting Invasion. **Endocrine-Related Cancer**, 15(3), 787–799, 2008.

47. Leonardi, G. C.; Candido, S.; Carbone, M.; Raiti, F.; Colaianni, V.; Garozzo, S.; Cinà, D.; McCubrey, J. A.; Libra, M. BRAF mutations in papillary thyroid carcinoma and emerging targeted therapies (review). **Mol. Med. Rep.**, (4):687-94, 2012.
48. Li, C.; Aragon, Han, P.; Lee, K. C.; Lee, L. C.; Fox, A. C.; Beninato, T.; Thiess, M.; Dy, B. M.; Sebo, T. J.; Thompson, G. B.; Grant, C. S. Giordano, T. J.; Gauger, P. G.; Doherty, G. M.; Fahey, T. J.; Bishop, J.; Eshleman, J. R.; Umbricht, C. B.; Schneider, E. B.; Zeiger, M. A. Does BRAF^{V600E} mutation predict aggressive features in papillary thyroid cancer? Results from four endocrine surgery centers. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, (98):3702-12, 2013.
49. Lippi, F.; Capezzone, M.; Angelini, F.; Taddei, D.; Molinaro, E.; Pinchera, A.; Pacini, F. Radioiodine treatment of metastatic differentiated thyroid cancer in patients on L-thyroxine, using recombinant human TSH. **Eur. J. Endocrinol.**, 144(1):5-11, 2001.
50. Liu, J.; Suresh Kumar, K. G.; Yu, D.; Molton, S. A.; McMahon, M.; Herlyn, M.; Thomas-Tikhonenko, A.; Fuchs, S. Y. Oncogenic BRAF regulates beta-Trcp expression and NF-kappaB activity in human melanoma cells. **Oncogene**, 26(13):1954-8, 2007.
51. Luster, M. Present status of the use of recombinant human TSH in thyroid cancer management. **Acta Oncologica**, 45 (8): 1018-1030, 2006.
52. Luster, M.; Lippi, F.; Jarzab, B.; Perros, P.; Lassmann, M.; Reiners, C.; Pacini, F. r-hTSH-aided radioiodine ablation and treatment of differentiated thyroid carcinoma: a comprehensive review. **Endocrine-Related Cancer**, 12 (1): 49-64, 2005.
53. Martins, L. G. A.; Monteiro, L. H. A. Usando redes neurais diretas e regras de produção no controle da concentração de hormônios tireoideanos. **Sba Controle & Automação**, 18 (3): 292-300, 2007.
54. McHenry, C. R. & Phitayakorn, R. Follicular Adenoma and Carcinoma of the Thyroid Gland. **The Oncologist**, 16(5), 2011.

55. Melmed, S.; Polonsky, K.S.; Larsen, P.R.; Kronenberg, H. M.; **Williams textbook of endocrinology**. Ed. 11;
56. M'Kacher, R.; Legal, J.D.; Schlumberger, M.; Voisin, P.; Aubert, B.; Gaillard, N.; Parmentier, C. Biological dosimetry in patients treated with iodine-¹³¹ for differentiated thyroid carcinoma. **J. Nucl. Med.**, 7(11):1860-1864, 1996.
57. M'Kacher, R.; Légal, J. D.; Schlumberger, M.; Aubert, B.; Beron-Gaillard, N.; Gaussen, A.; Parmentier, C. Sequential biological dosimetry after a single treatment with iodine-131 for differentiated thyroid carcinoma. **J. Nucl. Med.**, 38(3):377-80, 1997.
58. Movafagh, A.; Tavirani, M. R.; Heidari, M. H. Double Minute Chromosomes Associated with Philadelphia Chromosome in Myeloid Leukemia. A Case Study. **J. Cancer Sci.**, (4):144-145, 2012.
59. Moka, D.; Dietlein, M.; Schicha, H. Radioiodine therapy and thyrostatic drugs and iodine. **Eur. J. Nucl. Med.**, 29 (2): 486-491, 2002.
60. Monsieurs, M. A.; Thierens, H. M.; van de Wiele, C. V.; Vral, A. M.; Meirlaen, I.A.; de Winter, H.A.; de Sadeleer, C.J.; de Ridder, L.I.; Kaufman, J.M.; Dierckx, R.A. Estimation of risk based on biological dosimetry for patients treated with radioiodine. **Nucl. Med. Commun.**, 20(10):911-917, 1999.
61. Morris, L. G. & Myssiorek, D. Improved detection does not fully explain the rising incidence of well-differentiated thyroid cancer: a population-based analysis. **American J. Surgery**, 200(4), 454–461, 2010.
62. Murakami, A.; Tanaka, T.; Lee, J. Y.; Surh, Y. J.; Kim, H. W.; Kawabata, K.; Nakamura, Y.; Jiwajinda S, Ohigashi H. Zerumbone, a sesquiterpene in subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice. **Int. J. Cancer**, 110(4):481-90, 2004.
63. Nielsen, J. L.; Walsh, J. T.; Degen, D. R.; Drabek, S. M.; McGill, J. R.; von Hoff, D. D. Evidence of gene amplification in the form of double minute chromosomes is frequently observed in lung cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, (2):120-4.1993.

64. Nikiforov, Y. E.; Nikiforova, M. N. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. **Nat. Rev. Endocrinol.**, 7(10):569-80, 2011.
65. Nucera, C.; Porrello, A.; Antonello, Z. A.; Mekel, M.; Nehs, M. A.; Giordano, T. J.; Gerald, D.; Benjamin, L. E.; Priolo, C.; Puxeddu, E.; Finn, S.; Jarzab, B.; Hodin, R. A.; Pontecorvi, A.; Nose, V.; Lawler, J.; Parangi, S. B-Raf(V600E) and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, 107(23):10649-54, 2010.
66. Pacini F.; Castagna, M. G.; Brilli, L.; Pentheroudakis, G. ESMO Guidelines Working Group. Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann. Oncol.**,7:110-9, 2012.
67. Pacini, F.; Castagna, M.G. Diagnostic and therapeutic use of recombinant human TSH (r-hTSH) in differentiated thyroid cancer. **Best Practice & Res. Clinical Endocrinol. & Metabolism**,22(6): 1009-1021, 2008.
68. Patrawala, S.; Puzanov, I. Vemurafenib (RG67204, PLX4032): a potent, selective BRAF kinase inhibitor. **Future Oncol.**, 8(5):509-23, 2012
69. 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.**, 965212, 2013.
70. Peroni, C. N.; Soares, C. R.; Gimbo, E.; Morganti, L.; Ribela, M. T.; Bartolini, P. High-level expression of human thyroid-stimulating hormone in Chinese hamster ovary cells by co-transfection of dicistronic expression vectors followed by a dual-marker amplification strategy. **Biotechnol Appl. Biochem.**,(1):19-26, 2002.
71. Pinto, M.; Amaral, A. Biological dose assessment after low-dose overexposures in nuclear medicine. **Radiat. Prot. Dosimetry**, 162(3):254-9, 2014.

72. Reiners, C.; Biko, J.; Haenscheid, H.; Hebestreit, H.; Kirinjuk, S.; Baranowski, O.; Marlowe, R. J.; Demidchik, E.; Drozd, V.; Demidchik, Y. Twenty-five years after Chernobyl: outcome of radioiodine treatment in children and adolescents with very high-risk radiation-induced differentiated thyroid carcinoma. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 98(7):3039-48, 2013.
73. Remy, H.; Borget, I.; Leboulleux, S.; Guilabert, N.; Lavielle, F.; Garsi, J.; Bournaud, C.; Gupta, S.; Schlumberger, M.; Ricard, M. ¹³¹I effective half-life and dosimetry in thyroid cancer patients. **J. Nucl. Med.**, 49(9):1445-50, 2008.
74. Roberts, C. G.; Ladenson, P. W. Hypothyroidism. **Lancet.**, 363(9411):793-803, 2004.
75. Rosario, P. W.; Salles, D. S.; Purisch, S. Area under the curve of TSH after levothyroxine withdrawal versus administration of recombinant human TSH (r-hTSH): possible implications for tumor growth. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, 53(6):767-70, 2009.
76. Saiselet, M.; Floor, S.; Tarabichi, M.; Dom, G.; Hébrant, A.; van Staveren, W. C. G.; Maenhaut, C. Thyroid cancer cell lines: an overview. **Frontiers in Endocrinol.**, 3, 133, 2012.
77. Sapienza, M. T. Tratamento do carcinoma diferenciado da tireoide com iodo-131: intervenções para aumentar a dose absorvida de radiação. **Arq Bras. Endocrinol. Metab.**, 49 (3), 2005.
78. Schmid, W. The micronucleus test. **Mutat. Res.**, 31(1):9-15, 1975.
79. Schroeder, P. R.; Haugen, B. R.; Pacini, F.; Reiners, C.; Schlumberger, M.; Sherman, S. I.; Cooper, D. S.; Schuff, K. G.; Braverman, L. E.; Skarulis, M. C.; Davies, T.F.; Mazzaferri, E. L.; Daniels, G. H.; Ross, D. S.; Luster, M.; Samuels, M. H.; Weintraub, B. D.; Ridgway, E. C.; Ladenson, P. W. A comparison of short-term changes in health-related quality of life in thyroid carcinoma patients undergoing diagnostic evaluation with recombinant human thyrotropin compared with thyroid hormone withdrawal. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 91(3):878-84, 2006.

80. Seidlová-Wuttke, D.; Christoffel, J.; Rimoldi, G.; Jarry, H.; Wuttke, W. Comparison of effects of estradiol with those of octylmethoxycinnamate and 4-methylbenzylidene camphor on fat tissue, lipids and pituitary hormones. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 214(1):1-7, 2006.
81. Serna, A.; Alcaraz, M.; Navarro, J. L.; Acevedo, C.; Vicente, V.; Canteras, M. Biological dosimetry and Bayesian analysis of chromosomal damage in thyroid cancer patients. **Radiat. Prot. Dosimetry**, 129(4):372-380, 2008.
82. Siegel, R.; DeSantis, C.; Virgo, K.; Stein, K.; Mariotto, A.; Smith, T.; Cooper, D.; Gansler, T.; Lerro, C.; Fedewa, S.; Lin, C.; Leach, C.; Cannady, R. S.; Cho, H.; Scoppa, S.; Hachey, M.; Kirch, R.; Jemal, A.; Ward, E. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. **CA Cancer J. Clin.**, 62(4):220-41, 2012.
83. Sisson, J. C.; Freitas, J.; McDougall, I. R.; Dauer, L. T.; Hurley, J.R.; Brierley, J.D.; Edinboro, C.H.; Rosenthal, D.; Thomas, M.J.; Wexler, J.A.; Asamoah, E.; Avram, A.M.; Milas, M.; Greenlee, C. Radiation safety in the treatment of patients with thyroid diseases by radioiodine ¹³¹I: Practice recommendations of the American Thyroid Association. **Thyroid**, 21 (4), 2011.
84. Son, J. I., & Woo, J. Response: Insufficient Experience in Thyroid Fine-Needle Aspiration Leads to Misdiagnosis of Thyroid Cancer. **Endocrinol. Metabolism**, 29(4): 592–593, 2014.
85. Sundaram, P.S.; Padma S.; Sudha S.; Sasikala K. Transient cytotoxicity of ¹³¹I beta radiation in hyperthyroid patients treated with radioactive iodine. **Indian. J. Med. Res.**, 133 (4): 401-406, 2011.
86. Taïeb, D.; Sebag, F.; Farman-Ara, B.; Portal, T.; Baumstarck-Barrau, K.; Fortanier, C.; Bourrelly, M.; Mancini, J.; De Micco, C.; Auquier, P.; Conte-Devolx, B.; Henry, J. F.; Mundler, O. Iodine biokinetics and radioiodine exposure after recombinant human thyrotropin-assisted remnant ablation in comparison with thyroid hormone withdrawal. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 95(7):3283-90, 2010.
87. Tuttle, R. M. Risk-adapted management of thyroid cancer. **Endocr. Pract.**, 14(6):764-74, 2008.

88. van Staveren, W. C.; Solís, D. W.; Delys, L.; Duprez, L.; Andry, G.; Franc, B.; Thomas, G.; Libert, F.; Dumont, J. E.; Detours, V.; Maenhaut, C. Human thyroid tumor cell lines derived from different tumor types present a common dedifferentiated phenotype. **Cancer Res.**, 67(17):8113-20, 2007.
89. Watanabe, N.; Yokoyama, K.; Kinuya, S.; Shuke, N.; Shimizu, M.; Futatsuya, R.; Michigishi, T.; Tonami, N.; Seto, H.; Goodwin, D. A. Radiotoxicity after iodine-131 therapy for thyroid cancer using the micronucleus assay. **J. Nucl. Med.**, 39(3):436-40, 1998.
90. Watanabe, M.; Yamamoto, N.; Matsuzuka, F.; Miyachi, A.; Iwatani, Y. Decrease of CD154 intensity on peripheral CD4⁺ T cells in autoimmune thyroid disease. **Clin. Exper. Immunol.**, 136(3): 555–558, 2004.
91. Weintraub, B. D.; Szkudlinski, M. W. Development and in vitro characterization of human recombinant thyrotropin. **Thyroid**, 9(5):447-50, 1999.
92. Wiseman, S. M.; Masoudi, H.; Niblock, P.; Turbin, D.; Rajput, A.; Hay, J.; Bugis, S.; Filipenko, D.; Huntsman, D.; Gilks, B. Anaplastic thyroid carcinoma: expression profile of targets for therapy offers new insights for disease treatment. **Ann. Surg. Oncol.**, 14(2):719-29, 2007.
93. Xing, M. BRAF mutation in thyroid cancer. **Endocr. Relat. Cancer**, 12(2):245-62, 2005.
94. Xing, M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. **Endocr. Rev.**, 28(7):742-62, 2007.
95. Xing, M. Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. **Thyroid**, 20(7):697-706, 2010.
96. Zanutti-Fregonara, P.; Hindié, E.; Faugeron, I.; Moretti, J. L.; Ravasi, L.; Rubello, D.; Toubert, M. E. Update on the diagnosis and therapy of distant metastases of differentiated thyroid carcinoma. **Minerva Endocrinol.**, 33:313-327, 2008.

97. Zanzonico, P. B. Radiation dose to patients and relatives incident to ^{131}I therapy. **Thyroid**, 7(2):199-204, 1997.
98. Zarnegar, R.; Brunaud, L.; Kanauchi, H.; Wong, M.; Fung, M.; Ginzinger, D.; Duh, Q. Y.; Clark, O. H. Increasing the effectiveness of radioactive iodine therapy in the treatment of thyroid cancer using Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor. **Surgery**, 132(6):984-90, 2002.