

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

RENATA ESCHER PEREIRA

**Caracterização do perfil de acetilação de histonas
H3K27 em Adenomas de Paratireoide**

RIBEIRÃO PRETO

2023

RENATA ESCHER PEREIRA

**Caracterização do perfil de acetilação de histonas
H3K27 em Adenomas de Paratireoide**

Versão corrigida

Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-
Graduação

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Morfofisiologia de
Estruturas Faciais.

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos
Conti de Freitas**

RIBEIRÃO PRETO

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Renata Escher

Caracterização do perfil de acetilação de histonas H3K27 em Adenomas de Paratireoide. / Renata Escher Pereira; orientador, Luiz Carlos Conti de Freitas. - Ribeirão Preto, 2023.

165f.: 71il. 30 cm.

Tese (Doutorado) - Programa de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP. Ribeirão Preto. 2023.

1 Adenoma de paratireoide. 2. Epigenética. 3. Hiperparatireoidismo. 4. Histonas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: PEREIRA, Renata Escher

Título: Caracterização do perfil de acetilação de histonas H3K27 em Adenomas de Paratireoide.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

*Aos meus avós, Dina e Tone!
Vocês sempre foram para mim exemplos de virtudes!
Trabalhadores, honestos, fortes e sensíveis,
você mostraram à família com exemplos diários
os melhores valores humanos!
Por tudo que fizeram por mim, dedico a vocês esta homenagem!*

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos Conti de Freitas, que, além de professor dedicado, desde os tempos da residência, foi também idealizador deste projeto. Alguém que sempre admirei por nunca medir esforços em compartilhar o seu conhecimento e impulsionar minha carreira. Meu sincero agradecimento por todas as oportunidades, tanto ensino e imensa paciência!

Agradeço ao Prof. Dr. Fabiano Saggioro, Prof. Dr. Joel e à Deise Chesca, pelas contribuições no campo da patologia, sem as quais a pesquisa não teria sido possível.

Ao Prof. Rogério Castilho e à Profa. Cristiane Squarize, do Laboratório de Biologia Epitelial da Escola de Odontologia da Universidade do Michigan - EUA, por sua inestimável colaboração.

Aos queridos funcionários do Banco de Tumores, Fermino Neto e José Carlos, pelas inúmeras vezes que me ajudaram!

Às estimadas do Laboratório de Biologia Molecular da Endocrinologia: Ana Carolina, Wendy e Renata, que tanto me ajudaram nas fases iniciais do projeto.

À Maria Cecília Onofre, secretária da Pós-Graduação, pelo suporte e esclarecimentos em diversos momentos.

Ao meu amigo Pedro Polastri Lima, que tantas vezes me ajudou! Te desejo muita sorte no seu projeto!

Ao meu colega Dr. Ricardo Iwakura, pelas vastas e proveitosas horas de cirurgias juntos.

Aos meus amigos e colegas de trabalho pelo incentivo e apoio, em especial Dra. Loraine e seu esposo Dr. Rafael, além dos estimados Dr. Thiago Roberto e Dr. Romério.

A toda minha família: o carinho e suporte de vocês foram essenciais!

Ao meu amado Marco Antônio, por sua paciência, presença e, principalmente, pelas palavras de ânimo! Elas foram essenciais nesta fase final.

Ao meu pai de coração, Ademar, que sempre acreditou em mim e me deu suporte para seguir nos momentos difíceis.

Ao meu irmão Ricardo, pelo companheirismo e pela motivação de sempre.

Ao meu pai Manoel, pelo exemplo de médico humano e vocacionado, a quem sempre admirei!

À minha mãe Maysa, por ser o esteio dos meus sonhos projetados e minha melhor amiga.

Só tenho a agradecer pelo imenso apoio, carinho e créditos depositados.

Amo muito vocês!

Agradeço a todos que colaboraram, direta e indiretamente, para a concretização deste estudo.

Apoio Financeiro

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, cujo apoio financeiro foi imprescindível para a execução deste projeto.

Epígrafe

*“Sísifo ensina a fidelidade superior que nega os deuses e ergue as rochas.
Também ele acha que está tudo bem.
Esse universo, doravante sem dono, não lhe parece estéril nem fútil.
Cada grão dessa pedra, cada fragmento mineral dessa montanha cheia de
noite forma por si só um mundo.
A própria luta para chegar ao cume basta para encher o coração de um
homem.
É preciso imaginar Sísifo feliz.”*

Albert Camus

Resumo

PEREIRA, R. E. **Caracterização do perfil de acetilação de histonas H3K27 em Adenomas de Paratireoide**. 165 f. 2023. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2023.

Introdução: Os adenomas de paratireoide são os tumores endócrinos mais comuns e a principal causa de hiperparatireoidismo, mas os mecanismos moleculares envolvidos são pouco compreendidos. Mutações de genes supressores tumorais estão envolvidas no desenvolvimento de tumores familiares e esporádicos de paratireoide; no entanto as características epigenéticas desses tumores ainda são pouco exploradas. **Objetivos:** Caracterizar o perfil de acetilação da histona H3K27 em adenomas de paratireoide de pacientes portadores de hiperparatireoidismo primário submetidos à paratireoidectomia, bem como correlacionar a acetilação de histona às características clínicas dos pacientes. **Material e Métodos:** Foram selecionadas, aleatoriamente, 24 amostras de paratireoides do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, coletadas de pacientes submetidos à paratireoidectomia, no período de 2015 a 2020. Foram incluídas amostras de pacientes cujo diagnóstico clínico estabelecido foi de hiperparatireoidismo primário e a análise histopatológica confirmou a existência de adenoma (19 amostras), além de amostras de glândulas paratireoides normais como controle (5 amostras). A detecção da histona acetiladas H3K27 na imunofluorescência foi realizada com anticorpos primários anti-H3K27 e o controle de tonalidades para detecção de núcleos marcados em azul e verde foi feito por meio de canais RGB em programa de edição de imagens, o mesmo utilizado para contagem de células e posteriores análises das lâminas. Informações clínicas foram coletadas do prontuário médico dos pacientes. **Resultados:** A maioria dos portadores de adenoma de paratireoide deste estudo era do sexo feminino e a média de idade de $56 \pm 16,2$ anos. Os indicadores clínicos avaliados: níveis de cálcio, paratormônio, fósforo e creatinina foram normalizados no período pós-paratireoidectomia. Observou-se grande variação no perfil de acetilação entre os adenomas, não sendo confirmada diferença entre adenomas e glândulas normais. Foram confirmadas nas correlações estatisticamente significativas entre níveis de cálcio séricos e H3K27ac, entre idade e paratormônio e entre volume do adenoma e paratormônio. **Conclusões:** A acetilação da histona H3K27 demonstrou perfil variável nos adenomas de paratireoide, podendo apresentar tumores intensamente acetilados enquanto outros mostraram baixa acetilação. Não foi observada diferença entre adenomas e tecidos de paratireoides normais. Observou-se correlação entre a acetilação de histonas e a medida de cálcio sérico, evidenciando que a progressão do hiperparatireoidismo pode estar associada à maior acetilação da histona H3K27.

Palavras-chave: Adenoma de paratireoide. Epigenética. Hiperparatireoidismo. Histonas.

Abstract

PEREIRA, R. E. **Characterization of histones H3K27 acetylation profile in Parathyroid Adenomas.** 165f. 2023. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2023.

Introduction: Parathyroid adenomas are the most common endocrine tumors and are the main cause of hyperparathyroidism, but the molecular mechanisms involved are poorly understood. Tumor suppressor gene mutations are involved in the development of familial and sporadic parathyroid tumors; however, the epigenetic characteristics of these tumors are still little explored. **Objectives:** To characterize the H3K27 histone acetylation profile in parathyroid adenomas of patients with primary hyperparathyroidism undergoing parathyroidectomy and also search for relations between the acetylation of the histones with clinical features of the patients.

Material and Methods: We randomly selected 24 samples of parathyroids from the Pathology Service of Hospital of Clinics Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo collected from patients who underwent parathyroidectomy in the period from 2015 to 2020. Samples from patients whose established clinical diagnosis was primary hyperparathyroidism and the Histopathological analysis confirmed the existence of adenoma (19 samples), in addition to samples of normal parathyroid glands as a control (5 samples). The detection of H3K27 acetylated histone in immunofluorescence was performed with primary anti-H3K27 antibodies and the shade control for detection of nuclei marked in blue and green was performed through RGB channels in an image editing program, the same used for cell counting and subsequent analyzes of the slides. Clinical information of the patients were collected from the medical records. **Results:** Most patients with parathyroid adenoma in this study were female and the mean age was $56 \pm 16,2$ years. The evaluated clinical indicators – calcium, parathyroid hormone, phosphorus and creatinine levels were normalized in the post-parathyroidectomy period. We observed a great variation in acetylation profile, not being possible to confirm the difference between the adenomas and the normal glands. We observed statistical confirmation only in the correlations between calcium and H3K27ac, between age and parathyroid hormone, between volume and parathyroid hormone. **Conclusions:** The acetylation profile of the histone H3K27 is variable in parathyroid adenomas, presenting high acetylated tumors and also with low acetylation. We could not observe difference between the adenomas and the normal glands. We observed relationship between the acetylation of the histones and the measures of blood calcium suggesting that the progression of the hyperparathyroidism can be associated with higher levels of histone H3K27 acetylation.

Keywords: Parathyroid adenoma. Epigenetics. Hyperparathyroidism. Histones.

Lista de Figuras

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figura 1 - | Ivar Sandström..... | 36 |
| Figura 2 - | Localização das glândulas paratireoides no pescoço | 38 |
| Figura 3 - | Paratireoides ectópicas..... | 39 |
| Figura 4 - | Células das paratireoides..... | 40 |
| Figura 5 - | Ilustração da relação sigmoidal entre a liberação de paratormônio e o nível de cálcio ionizado sérico..... | 43 |
| Figura 6 - | Homeostase do cálcio. Regulação do cálcio extracelular pelo PTH..... | 45 |
| Figura 7 - | Adenoma de paratireoide composto por células oxifílicas. (A) Células oxifílicas com tecido paratireoide normocelular residual identificado fora da cápsula de adenoma (Hematoxilina & eosina, 200x). (B) Arquitetura microcística ou cística pode ser observada no interior do adenoma (Hematoxilina & eosina, 400x)..... | 50 |
| Figura 8 - | Lipoadenoma. Hematoxilina & eosina, 200x | 51 |
| Figura 9 - | Carcinoma de Paratireoide. (A) Cápsula fibrótica espessa com células da paratireoide infiltrando em tecidos moles circundantes. Hematoxilina & eosina, 200x. (B) Invasão vascular evidenciando característica-chave de carcinoma de paratireoide. Hematoxilina & eosina, 200x. (C) Padrão de crescimento microcístico em carcinoma de paratireoide com características citológicas indicativas de processo maligno. Hematoxilina & eosina, 400x | 54 |
| Figura 10 - | β -Catenina: o eixo na tumorigênese em paratireoide | 59 |
| Figura 11 - | Mecanismos epigenéticos e RNA não-codificante | 63 |
| Figura 12 - | Desparafinização das lâminas para imunofluorescência..... | 78 |
| Figura 13 - | Tratamento das lâminas com soluções aquosas e etanol..... | 78 |
| Figura 14 - | Processo de recuperação antigênica em ácido cítrico | 79 |
| Figura 15 - | Imagem com marcação Hoechst original para contagem de núcleos..... | 81 |
| Figura 16 - | Tratamento da imagem com o <i>software Image J</i> para contagem automática..... | 81 |
| Figura 17 - | Tratamento da imagem com o <i>software Image J</i> com definição de limites nucleares para proceder à contagem automática | 82 |

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figura 18 - | Contagem manual dos núcleos das células para dupla- checagem, após contagem automática..... | 83 |
| Figura 19 - | Contagem manual dos núcleos das células com marcação FITC: positivas para H3K27 | 84 |
| Figura 20 - | Paciente 01: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós- operatório | 89 |
| Figura 21 - | Paciente 02: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós- operatório | 89 |
| Figura 22 - | Paciente 03: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós- operatório | 90 |
| Figura 23 - | Paciente 04: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós- operatório | 90 |
| Figura 24 - | Paciente 05: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós- operatório | 91 |
| Figura 25 - | Paciente 06: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós- operatório | 91 |
| Figura 26 - | Paciente 07: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós- operatório | 92 |
| Figura 27 - | Paciente 08: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós- operatório | 92 |
| Figura 28 - | Paciente 09: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós- operatório | 93 |
| Figura 29 - | Paciente 10: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós- operatório | 93 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Figura 30 - | Paciente 11: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório..... | 94 |
| Figura 31 - | Paciente 12: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório..... | 94 |
| Figura 32 - | Paciente 13: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório..... | 95 |
| Figura 33 - | Paciente 14: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório..... | 95 |
| Figura 34 - | Paciente 15: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório..... | 96 |
| Figura 35 - | Paciente 16: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório..... | 96 |
| Figura 36 - | Paciente 17: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório..... | 97 |
| Figura 37 - | Paciente 18: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório..... | 97 |
| Figura 38 - | Paciente 19: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório..... | 98 |
| Figura 39 - | Paciente 01: (A) Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. (B) Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação dos núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). (C) Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação nuclear (azul). (D) Imagem gerada após seleção RGB (Image J), mostrando células com marcação H3K27ac (verde). (E) Contagem manual das células em verde. (F) Separação automatizada das células em azul. (G) Contagem automatizada das células em azul..... | 102 |

- Figura 40 -** Paciente 02: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem automatizada das células marcadas em azul (Image J): **(E)** Separação. **(F)** Contagem..... 103
- Figura 41 -** Paciente 03: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional mostrando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) revelando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul 104
- Figura 42 -** Paciente 04: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), mostrando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J). **(E)** Separação. **(F)** Contagem..... 105
- Figura 43 -** Paciente 05: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional mostrando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul 106
- Figura 44 -** Paciente 06: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional mostrando células com marcação em

imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) demonstrando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul 107

Figura 45 - Paciente 07: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), mostrando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) demonstrando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul 108

Figura 46 - Paciente 08: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul..... 109

Figura 47 - Paciente 09: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul..... 110

Figura 48 - Paciente 10: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação

em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul..... 111

Figura 49 - Paciente 11: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul..... 112

Figura 50 - Paciente 12: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Separação. **(F)** Contagem..... 113

Figura 51 - Paciente 13: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Separação. **(F)** Contagem..... 114

Figura 52 - Paciente 14: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando

células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Separação. **(F)** Contagem..... 115

Figura 53 - Paciente 15: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul..... 116

Figura 54 - Paciente 16: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Separação. **(F)** Contagem..... 117

Figura 55 - Paciente 17: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul..... 118

Figura 56 - Paciente 18: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Separação. **(F)** Contagem 119

- Figura 57 -** Paciente 19: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul..... 120
- Figura 58 -** Controle 01: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul 121
- Figura 59 -** Controle 02: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul 122
- Figura 60 -** Controle 03: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Separação. **(F)** Contagem..... 123
- Figura 61 -** Controle 04: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia

| | | |
|--------------------|---|-----|
| | convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). (C) Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). (D) Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): (E) Contagem manual das células em verde. (F) Separação automatizada das células em azul. (G) Contagem automatizada das células em azul 124 | 124 |
| Figura 62 - | Controle 05: (A) Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. (B) Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). (C) Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). (D) Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): (E) Separação. (F) Contagem..... 125 | 125 |
| Figura 63 - | Distribuição da marcação da histona (H3K27ac) nos Grupos Caso e Controle 126 | 126 |
| Figura 64 - | Análise da correlação entre os níveis de cálcio e histona H3K27ac 127 | 127 |
| Figura 65 - | Análise da correlação entre os níveis de PTH e histona H3K27ac .. 127 | 127 |
| Figura 66 - | Análise da correlação entre idade e histona H3K27ac..... 128 | 128 |
| Figura 67 - | Análise da correlação entre o volume do adenoma e a histona H3K27ac 129 | 129 |
| Figura 68 - | Análise da correlação entre o volume do adenoma e os níveis de cálcio 130 | 130 |
| Figura 69 - | Análise da correlação entre o volume do adenoma e os níveis de PTH..... 130 | 130 |
| Figura 70 - | Análise da correlação entre o volume do adenoma e a idade..... 131 | 131 |
| Figura 71 - | Análise da correlação entre a idade e o paratormônio..... 131 | 131 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 - Dados demográficos dos participantes do estudo | 86 |
| Tabela 2 - Resultados de exames laboratoriais pré-operatórios, dados de topografia e dimensão do adenoma no intraoperatório | 87 |
| Tabela 3 - Variação média dos exames pré e pós-operatórios dos participantes do estudo | 88 |
| Tabela 4 - Marcações DAPI, FITC e de relação FITC/DAPI das amostras de adenoma (Grupo Caso) e amostras normais (Grupo Controle)..... | 100 |

Lista de Siglas, Símbolos e Abreviaturas

| | |
|--------------------|---|
| 5hmC- | 5-Hidroximetilcitosina |
| ACTP- | Ambulatório de Cirurgia de Tireoide e Paratireoide |
| AP- | Adenoma de Paratireoide |
| APA- | Adenoma de Paratireoide Atípico |
| CDC73- | Proteína 73 do Ciclo de Divisão Celular |
| CDKI- | Inibidores de Quinases Independentes de Ciclina |
| CGS2- | Células Gliais Ativadoras da Linhagem Germinativa sem Fator de Transcrição 2 (GCM2) |
| CP- | Carcinoma de Paratireoide |
| DAB- | Tetrahydrocloreto de Diaminobenzidina |
| DAPI- | 4',6-diamidino-2-fenilindo |
| DNA- | Ácido Desoxirribonucleico |
| DRC- | Doença Renal Crônica |
| EDTA- | Ácido Etilenodiaminotetracético |
| EUA- | Estados Unidos da América |
| EZH2- | Lisina Metiltransferase de Zeste 2 |
| FDA- | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FGF23- | Fator de Crescimento Fibroblástico 23 |
| FITC- | Isotiocianato de Fluoresceína |
| FMRP-USP- | Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo |
| H&E- | Hematoxilina e Eosina |
| H3K27me2/3- | H3 lisina 27 Dimetilação e Trimetilação |
| H3K4- | Histona H3 Lisina 4 |
| HC- | Hormônio de crescimento |

| | |
|--------------------|---|
| HCFMRP-USP- | Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo |
| HDAC- | Inibidores de Enzimas de Desacetilação de Histonas |
| HHF1- | Hipercalcemia Hipocalciúrica tipo 1 |
| HIC1- | Gene hipermetilado no câncer 1 |
| HPRT- | Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase |
| HPT- | Hiperparatireoidismo |
| HPTFI- | Hiperparatireoidismo Familiar Isolado |
| HPT-JT- | Síndrome de HPT Associado a Tumor de Mandíbula ou Maxila |
| lncRNAs- | RNAs Longos, não codificantes |
| KDM6A- | Demetilase 6A Específica de Lisina |
| LOH- | Perda de Heterozigose |
| miRNA- | Micro RNA |
| mtDNA- | Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial |
| NADH- | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo |
| ND1,4,5- | Gene Mitocondrial do Complexo da Cadeia Respiratória NADH desidrogenase |
| NEM- | Neoplasia Endócrina Múltipla |
| NLR- | Nervo Laríngeo Recorrente |
| OMS- | Organização Mundial de Saúde |
| PCG- | Complexo <i>Polycomb</i> |
| PCR- | Reação em Cadeia da Polimerase |
| PCR1- | Complexo <i>Polycomb</i> -repressiva 1 |
| pHPT- | Hiperparatireoidismo primário |
| piRNA- | RNA de interação com <i>Piwi</i> |

| | |
|---------------------------|---|
| PTH- | Paratormônio |
| PTs- | Paratireoides |
| qPCR- | Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real |
| RET- | Rearranjado Durante Transfecção (gene) |
| RNA- | Ácido Ribonucleico |
| RSCa- | Receptor Sensível ao Cálcio |
| RVD- | Receptores de Vitamina D |
| S-Ca²⁺- | Cálcio Ionizado Sérico |
| sHPT- | Hiperparatireoidismo secundário |
| siRNA- | RNA interferente |
| SPECT/CT- | Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único |
| WNT- | Via do tipo <i>Wingless</i> |

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| 1. INTRODUÇÃO | 30 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 34 |
| 2.1. Breve histórico sobre a glândula paratireoide | 35 |
| 2.2. Embriologia, anatomia e histologia | 37 |
| 2.3. Anatomia cirúrgica..... | 41 |
| 2.4. Fisiologia | 42 |
| 2.5. Tumores de paratireoide | 47 |
| 2.5.1. Adenoma de paratireoide..... | 48 |
| 2.5.2. Adenoma atípico..... | 52 |
| 2.5.3. Carcinoma de paratireoide..... | 53 |
| 2.6. Genética do adenoma de paratireoide..... | 55 |
| 2.7. Alterações somáticas de adenomas | 57 |
| 2.8. Alterações epigenéticas do adenoma de paratireoide | 60 |
| 2.9. Histonas | 62 |
| 2.10. Doenças associadas à histona H3K27 | 67 |
| 2.11. Potencial de histonas em terapêutica | 69 |
| 2.12. Justificativa..... | 72 |
| 3. OBJETIVOS | 73 |
| 3.1. Objetivo geral | 74 |
| 3.2. Objetivos específicos..... | 74 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 75 |
| 4.1. Aspectos éticos | 76 |
| 4.2. Características da amostra..... | 76 |
| 4.3. Imunofluorescência | 77 |
| 4.4. Tratamento das imagens..... | 79 |
| 4.5. Análise estatística | 84 |
| 5. RESULTADOS | 85 |
| 5.1. Dados demográficos e caracterização da amostra | 86 |
| 5.2. Evolução de indicadores laboratoriais pré e pós-cirurgia..... | 87 |
| 5.3. Histopatologia..... | 98 |
| 5.4. Imunofluorescência | 99 |
| 5.5. Análise estatística: imunofluorescência | 126 |
| 6. DISCUSSÃO | 132 |
| 7. CONCLUSÕES | 140 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 142 |
| 9. ANEXO | 157 |

1- Introdução

As paratireoides (PTs), quatro minúsculas glândulas localizadas próximas aos polos superior e inferior da glândula tireoide, produzem o paratormônio (PTH), hormônio essencial na regulação dos níveis séricos de cálcio (PATRINOS *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2016). Mesmo uma ligeira redução ou elevação dos níveis de cálcio pode estimular ou suprimir a secreção de PTH (CONTI DE FREITAS; CASTILHO; SQUARIZE, 2022).

Os distúrbios da PT estão entre as doenças endócrinas de maior incidência, sendo a terceira mais frequente, atrás apenas de doenças da tireoide e diabetes. Em relação aos tumores, os das PTs aparecem como o segundo tumor endócrino mais comum, logo atrás dos tumores da tireoide (BILEZIKIAN *et al.*, 2014).

As doenças mais relevantes que afetam as PTs incluem condições clínicas com níveis séricos elevados de PTH, como hiperparatireoidismo primário (pHPT) e hiperparatireoidismo secundário (sHPT). A incidência populacional de pHPT, no período de 1995 a 2010 foi de 65,5 por 100.000 mulheres e 24,7 por 100.000 homens (YEH *et al.*, 2013), enquanto a prevalência de sHPT em pacientes com doença renal variou entre 20% e 80% (XU *et al.*, 2021). O pHPT é um distúrbio intrínseco da glândula com elevação na secreção hormonal, e o sHPT é um distúrbio extrínseco, uma desordem geralmente causada por insuficiência renal ou de vitamina D (BILEZIKIAN *et al.*, 2018), que estimula a secreção e a hipertrofia da glândula (CONTI DE FREITAS; CASTILHO; SQUARIZE, 2022).

O pHPT pode ser causado por um adenoma único, doença múltipla da PT ou por um carcinoma da PT (CP). Aproximadamente 80% a 85% do pHPT é causado por um único adenoma em uma das quatro PTs (GIDDINGS; RIMMER; WEIR, 2009), enquanto os casos restantes envolvem todas as quatro PTs, que podem ser dos tipos esporádico ou familiar. As síndromes familiares são principalmente neoplasias endócrinas múltiplas (NEM) dos tipos 1 e 2A (hiperparatireoidismo/tumor da mandíbula e hiperparatireoidismo familiar isolado) (CONTI DE FREITAS; CASTILHO; SQUARIZE, 2022).

Embora as lesões malignas da PT sejam incomuns, elas geralmente levam à hipercalcemia grave e sintomas clínicos perturbadores, como fadiga, fraqueza, perda de peso, anorexia e dor óssea (WERMERS *et al.*, 2006).

O adenoma de PT (AP) é a forma mais comum de neoplasia esporádica de PTs, representando cerca de 85% de todos os casos, ocorrendo preferencialmente em adultos acima 50 anos e do sexo feminino (2:1). A hiperplasia difusa (hiperplasia), em múltiplas glândulas é observada em aproximadamente 15% dos casos. O CP, ao contrário, é uma causa rara de pHPT, representando menos de 1% dos casos, mas frequentemente associado com manifestações clínicas graves e mortalidade significativa. A distinção entre AP e carcinoma é notoriamente difícil por razões puramente histopatológicas. Na ausência de invasão de estruturas vizinhas e/ou metástase, características histopatológicas incluindo bandas fibrosas, figuras mitóticas e invasão capsular, são fortemente sugestivas, mas não patognomônica de carcinoma (COSTA-GUDA; ARNOLD, 2014).

A maioria dos pacientes com AP apresenta aumento discreto do nível de PTH e do cálcio sérico, e são assintomáticos. Assim sendo, a história clínica e o exame físico raramente fornecem indícios de hiperparatireoidismo (HPT). Em menos da metade dos casos, o HPT pode apresentar-se em diversas manifestações clínicas decorrentes da hipercalcemia sérica, podendo ocorrer litíase renal e nefrocalcinose, além de hipertensão arterial sistêmica, arritmias, diabetes *mellitus*, úlcera péptica, constipação, alterações psiquiátricas como a depressão e alterações cognitivas (SHINJO *et al.*, 2009). Geralmente, níveis de PTH cima dos valores de referência são encontrados em casos de osteopenia/osteoporose em pacientes idosos, especialmente no sexo feminino. É justamente neste último grupo que se encontra a maioria dos casos de pHPT; é também nos idosos, em geral, que se observa frequentemente o sHPT relacionado à carência de vitamina D (FARIAS, 2010).

A prevalência desproporcionalmente esmagadora de AP esporádico típico em comparação com carcinoma implica que a transformação progressiva de AP típico para carcinoma deve ser extremamente rara (COSTA-GUDA; ARNOLD, 2014).

As modificações epigenéticas desempenham importante papel na formação do AP, com exemplos bem descritos de silenciamento de genes supressores de tumor por metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) ou por modificações de histonas. As histonas são proteínas que regulam o mecanismo de condensação do DNA, cuja fita completa duas voltas em torno de um octâmero de histonas para formar o nucleossomo, estabilizando a cromatina (CONTI DE FREITAS; CASTILHO;

SQUARIZE, 2022). Portanto, este estudo visa caracterizar o perfil de acetilação de histonas em AP para contribuir com a compreensão dos mecanismos epigenéticos envolvidos, aprimorar o manejo de futuros portadores da doença, aperfeiçoar o diagnóstico e identificar alvos específicos para novas terapias.

2. Revisão de Literatura

2.1 Breve histórico sobre a glândula paratireoide

As PTs foram os últimos órgãos identificados e descritos no corpo humano. Isso pode ser atribuído à posição anatômica, bem como ao pequeno tamanho dessas glândulas, que foram observadas pela primeira vez em necropsia de um rinoceronte indiano por Richard Owen em 1850, no entanto Owen não fez nenhuma descrição da natureza dessas glândulas e nem mesmo as nomeou. Em seu artigo publicado em *Transactions* em 1852, Owen descreveu as glândulas como “pequeno corpo glandular amarelo, compacto, ligado a tireoide até o ponto onde a veia se funde”. Seguindo o autor, o cirurgião Robert Remark e o patologista Rudolf Virchow observaram as glândulas, mas novamente não fizeram nenhuma descrição além de nomear a localização anatômica. Foi em 1852 que o estudante de medicina Ivar Sandström (Figura 1) da Universidade de Uppsala, na Suécia, fez a primeira descrição detalhada das PTs e as nomeou como *Glandulae Parathyroideae* (DELELLIS, 1993). Ivar descreveu a origem das PTs como remanescentes embrionários não desenvolvidos da tireoide. Sua descoberta foi, posteriormente, publicada no jornal local Uppsala, o *Läkareförenings Förhandlingar* (SEIPEL, 1938).

Os primeiros relatos sobre o PTH secretado pelas PTs são atribuídos a Moussu, em 1898, que com sucesso tratou a tetania resultante da paratireoidectomia em cães utilizando por via subcutânea e intravenosa injeções de extratos de PTs de cavalo diluídos em água ou glicerina. Em 1909, MacCallum e Voeghin propuseram que o principal efeito do PTH estava no nível de cálcio no plasma, uma vez que a remoção dessas glândulas resultou em perda de cálcio na excreção, resultando em queda nos níveis de cálcio no sangue e o subsequente desenvolvimento de tetania. No mesmo ano (1909), Berkeley e Beebe foram os primeiros a mostrar que o extrato dessas glândulas poderia aliviar a hipocalcemia e a tetania em humanos. Eles prepararam um extrato de PT bovina do qual separaram uma nucleoproteína que lhes parecia ter propriedades curativas quando administrada em animais paratireoidectomizados. Uma contribuição considerável para o conhecimento sobre o tratamento do hipoparatireoidismo em humanos foi fornecida por Collip (1892-1965), que em 1925 afirmou que - “A injeção do extrato de PTH prevenia ou controlava a tetania de PT e regulava o nível de cálcio no sangue” (COLLIP, 1925).

Figura 1 - Ivar Sandström

Fonte: Adaptada de Delellis (1993).

Em 1915, Schlagenhauser, um médico vienense, argumentou que em pacientes com osteíte fibrosa cística, apenas uma PT estava aumentada, sugerindo que a doença óssea seria o resultado e não a causa da hiperplasia da PT e que a paratireoidectomia poderia aliviar a doença óssea desses pacientes. Este conceito foi testado em 1925, quando o cirurgião vienense Felix Mandl removeu uma das PTs de um paciente com osteíte fibrosa cística, resultando em alívio dramático da doença óssea. Infelizmente, a doença voltou a ocorrer sete anos depois e, apesar de repetidas cirurgias o paciente de Mandl foi a óbito (KAFETZIS *et al.*, 2011).

Rasmussen e Gravy, em 1959, conseguiram purificar e isolar o PTH. A pureza da substância foi suficientemente alta, assim sendo pode ser caracterizada e analisada estruturalmente. Essas pesquisas confirmaram que o PTH é um complexo hormônio polipeptídico (KAFETZIS *et al.*, 2011).

A primeira operação sem sucesso para tratar lesões esqueléticas foi realizada por Oscar Hirsch, em Viena, em abril de 1925. Ele tentou localizar e remover

cirurgicamente um tumor da PT, mas não obteve sucesso. Durante o mesmo período, em Viena, o famoso patologista Erdheim expressou sua opinião de que, uma vez que os tumores das PTs são compensações da doença óssea, portanto a operação seria contraindicada (KAFETZIS *et al.*, 2011).

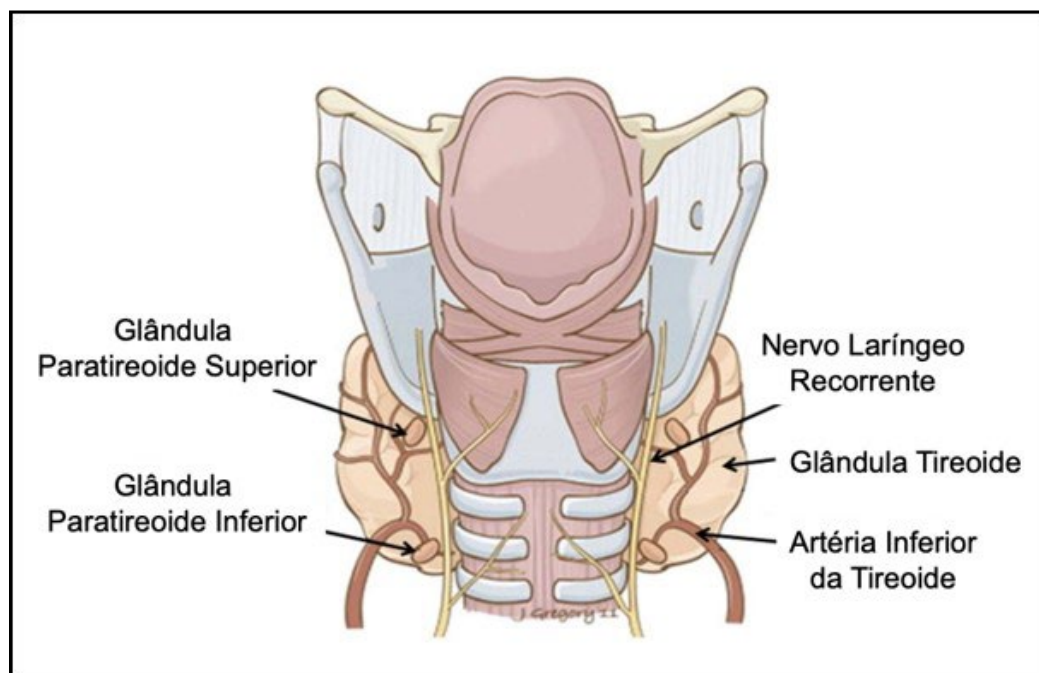
O capitão Charles Martell é certamente o mais famoso exemplo de um paciente com HPT: seu caso foi descrito por Fuller Albright em um discurso proferido enquanto era Presidente da *American Society of Endocrinology*, no *Massachusetts General Hospital*, em Boston. Martell foi operado duas vezes em 1926, mas sem sucesso. Em 1932, Churchill Cope, realizando sua quinta operação neste paciente conseguiu remover um tumor de PT medindo 3 cm de diâmetro do mediastino, após ter dividido o esterno. Infelizmente, o paciente morreu um mês após o procedimento operatório devido a complicações renais resultantes de sua longa batalha contra a doença. Desde então, milhares de paratireoidectomias têm sido realizadas em todo o mundo, empregando diferentes técnicas cirúrgicas. A partir de 1990, cada vez mais operações conservadoras têm sido aplicadas para tratar pHPT com resultados muito satisfatórios (KAFETZIS *et al.*, 2011).

2.2 Embriologia, anatomia e histologia

As PTs se desenvolvem durante a quarta semana de gestação e têm origem no endoderma das bolsas parafaríngeas, com contribuição da crista neural, onde possuem receptores sensíveis ao cálcio, e começam a migração caudal por volta da sétima semana (PEISSIG; CONDIE; MANLEY, 2018). As células da PT fetal respondem aos níveis de cálcio, podendo resultar em hipoparatiroidismo relativo, no feto secundário, aos seus níveis elevados de cálcio iônico, que são maiores do que os níveis de cálcio materno (FANCY; GALLAGHER; HORNIG, 2010; FIGUEIREDO; NEVES, 2018). As PTs superiores estão classicamente localizadas perto da região posterolateral do polo superior da tireoide, 1 cm acima da junção do nervo laríngeo recorrente (NLR) e da artéria tireoidiana inferior. Localizam-se profundamente no plano do nervo laríngeo recorrente. As PTs inferiores estão classicamente localizadas perto dos polos inferiores da tireoide, dentro de 1-2 cm da inserção da artéria tireoidiana inferior no polo inferior da tireoide. Classicamente

ficam superficiais ao plano do NLR. Sua localização é muito mais variável (Figura 2) (ILAH, A.; MUCO; ILAH, T. B., 2022).

Figura 2 - Localização das glândulas paratireoides no pescoço



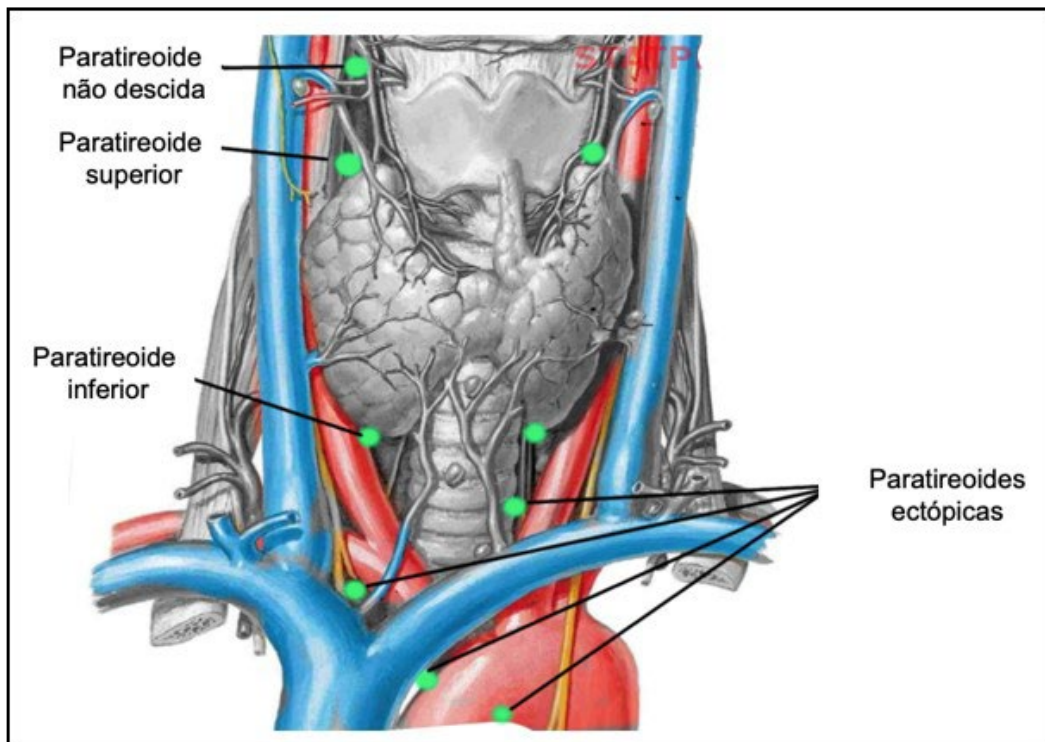
Fonte: Adaptada de Policeni; Smoker; Reede (2012).

Glândulas supranumerárias não são incomuns e foram relatadas em cerca de 13% dos casos (AKERSTRÖM; MALMAEUS; BERGSTRÖM, 1984). As PTs são ovais, leves, com padrão de cor que vai do amarelo ao castanho avermelhado, tamanho pequeno, com peso médio de 40 a 60 mg (FANCY; GALLAGHER; HORNIG, 2010). As glândulas inferiores têm origem comum com o timo, pois são ambos derivados da terceira bolsa faríngea. Elas começam a migrar junto com o timo inferior, medialmente no pescoço e se separam do timo antes que ele se encaixe no mediastino anterior (POLICENI; SMOKER; REEDE, 2012).

As glândulas superiores têm um caminho de migração mais curto no pescoço. Elas surgem da quarta bolsa faríngea e migram com a tireoide. Elas se localizam na parte posterior da porção média do lobo da tireoide (WENIG, 2008). O suprimento de sangue para as regiões superior e o inferior das PTs vem principalmente da artéria

tireóidea inferior (MOHEBATI; SHAHA, 2012). A localização ectópica das PTs e especialmente das glândulas inferiores não é incomum (GOMES *et al.*, 2007) (Figura 3).

Figura 3 - Paratireoides ectópicas

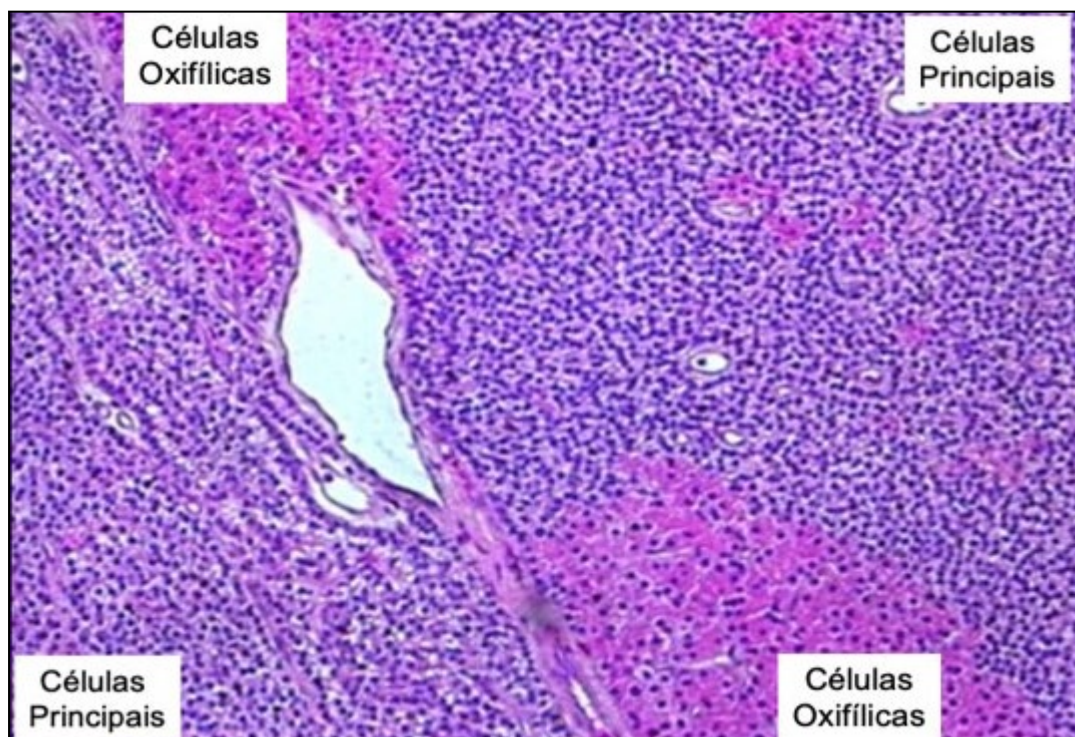


Fonte: Adaptada de Rosen; Bordoni (2022).

A variação na localização anatômica pode ser simplesmente explicada por sua origem e pelo caminho de migração no pescoço. Elas podem ser encontradas em qualquer lugar entre o ângulo da mandíbula e o mediastino superior. Em cerca de 5% dos casos ectópicos, as PTs inferiores são encontradas no mediastino anterior. Como as PTs superiores têm um caminho de migração muito mais curto no pescoço, elas são muito raramente encontradas em locais ectópicos no pescoço (POLICENI; SMOKER; REEDE, 2012). O tecido das PTs é circundado por uma fina cápsula de tecido conjuntivo e consiste principalmente de dois tipos de células - células principais (predominantes) e oxifílicas (WENIG, 2008). As células oxifílicas

são maiores (12-20 μm) que as células principais (6-8 μm), com maior conteúdo e citoplasma eosinofílico devido ao alto teor de mitocôndrias (Figura 4) (RITTER *et al.*, 2012). Em uma fase de transição entre células principais e oxifílicas, as células principais adquirem um citoplasma claro, sendo referidas como células claras (VAN DER WALT, 2012). As células principais são as células funcionais das PTs, responsáveis pela síntese e secreção de PTH. Durante estados de baixo teor de cálcio sérico, um receptor sensível ao cálcio (RSCa) na superfície da glândula ativa uma via mensageira da proteína G, levando à síntese/secreção de PTH. Durante estados hipercalcêmicos, esta via se torna inibida, conduzindo à diminuição da síntese/secreção de PTH (ROSEN; BORDONI, 2022).

Figura 4 - Células das paratireoides



Fonte: Adaptada de Ritter *et al.* (2012).

As células oxifílicas são mal compreendidas e sua função não é clara. Pesquisas sugerem que elas produzem/secretam PTH em casos de sHPT, tornando-se mais abundantes com a idade (TANAKA *et al.*, 1996). Elas estão marcadamente

aumentadas na doença renal crônica (DRC); em geral, a proporção de células oxifílicas aumenta em paralelo com o peso total das PTs em pacientes urêmicos, sugerindo que este tipo de célula é sensível à estimulação. Existe associação entre tratamento para sHPT com calcitriol e/ou cinacalcete e o conteúdo oxifílico ainda maior nas PTs (DELELLIS, 2011).

2.3 Anatomia cirúrgica

As PTs estão em estreita relação anatômica com a tireoide, pois estão localizadas na face posterior desta. Devido à sua relação anatômica e suprimento vascular comum, existem algumas considerações a respeito das PTs em cirurgias de tireoide. Ao dividir os ramos da artéria tireoidiana inferior além das PTs na cápsula da tireoide, a ruptura da artéria terminal deve ser evitada. No entanto, havendo ressecção inadvertida desta, ou em caso de lesão vascular, o transplante para uma bolsa “seca” no músculo esternocleidomastoideo, uma área subcutânea ou antebraço pode ser realizado para fins de manutenção funcional desta (ALLEN; FINGERET, 2023).

A tireoide e as PTs compartilham o mesmo suprimento de sangue por meio da via colateral da artéria tireóidea superior e artéria tireóidea ima (artéria de Neubauer), artérias laríngea, traqueal e esofágica. As artérias tireoidianas inferiores suprem as PTs por meio de seus ramos (suprem as PTs inferiores e superiores, na maioria dos casos). As veias das PTs drenam para o plexo venoso da tireoide. Os vasos linfáticos das PTs drenam nos linfonodos cervicais profundos e paratraqueais. A inervação da PT deriva dos ramos dos gânglios cervicais da tireoide. O suprimento nervoso para as PTs é vasomotor (ILAHI, A.; MUCO; ILAHI, T. B., 2022).

As PTs podem ter localizações incongruentes entre os indivíduos e essas localizações podem variar amplamente. Devido a essas variantes, podem ocorrer danos às glândulas durante a cirurgia do pescoço, especialmente na tireoidectomia. Um componente essencial de uma tireoidectomia segura é a identificação e preservação de todas as paratireoides. Embora, em teoria, uma porção de uma única PT deva ser suficiente para manter a homeostase do cálcio sérico, é prudente identificar e preservar todas as glândulas. Se isso não for possível, como na cirurgia

de câncer de tireoide para doença muito avançada, em que a segurança oncológica requer uma ressecção abrangente e em bloco, os pacientes devem ser aconselhados no pré-operatório de que pode ser necessária a suplementação vitalícia de cálcio e vitamina D. Felizmente, isso é muito raro, e cirurgiões experientes podem identificar e preservar as glândulas rotineiramente. A remoção de ambos os pares da PT é extremamente incomum e causaria diminuição nos níveis séricos de cálcio, levando ao desenvolvimento de tetania, arritmias cardíacas e uma série de outros efeitos adversos se não houver tratamento adequado (ILAHI, A.; MUCO; ILAHI, T. B., 2022).

A remoção inadvertida de uma ou mais das PTs pode ocorrer durante a tireoidectomia e a inspeção do tecido ressecado deve ser considerada para identificar essas glândulas e reimplantá-las, conforme previamente descrito. Com relação à tireoidectomia total, Allen e Fingeret (2023) documentaram a ocorrência de 21,4% de hipocalcemia transitória e 0% de hipocalcemia permanente após transplante de pelo menos uma das PTs durante a tireoidectomia total.

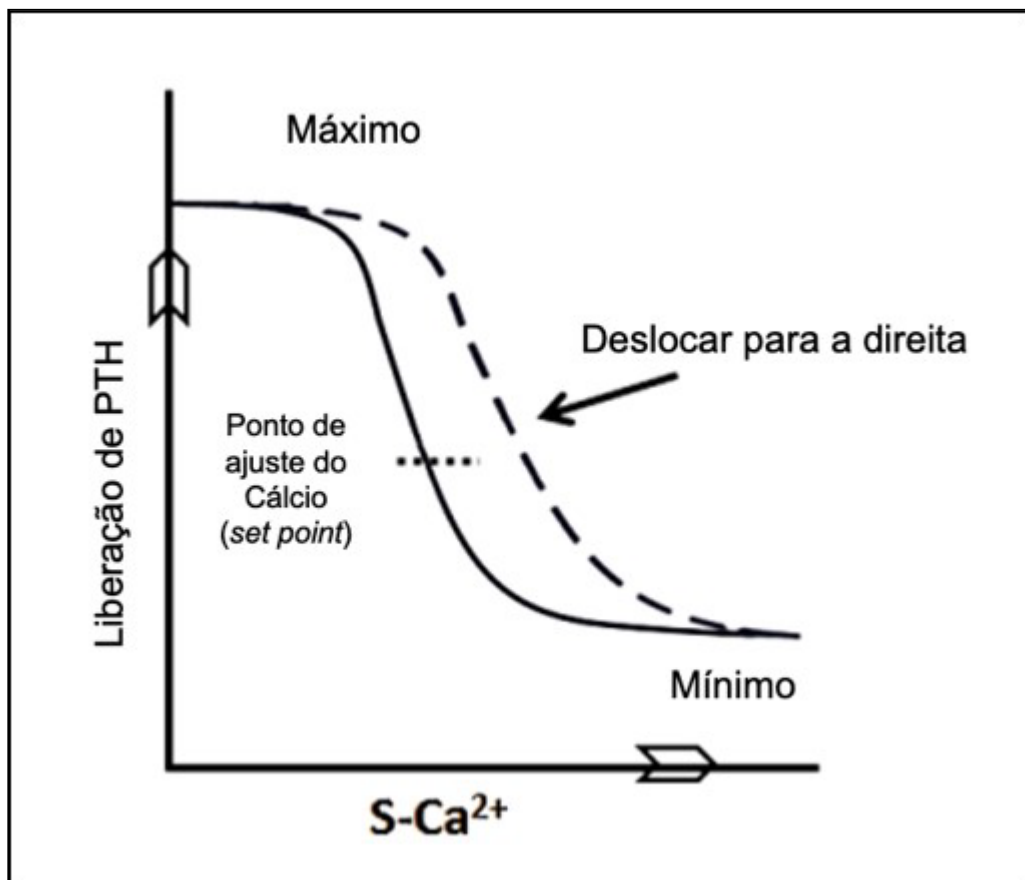
2.4 Fisiologia

A principal função das PTs é secretar o PTH, hormônio responsável pela homeostase do cálcio. O cálcio extracelular é considerado o principal determinante da secreção de PTH e as PTs são muito sensíveis até mesmo a pequenas variações no soro do nível basal de cálcio ionizado ($S\text{-Ca}^{2+}$). A secreção de PTH tem relação sigmoide inversa com o nível de $S\text{-Ca}^{2+}$, e o ponto médio entre a secreção mínima e máxima de PTH é o ponto de cálcio que se altera nas doenças da PT (Figura 5) (MALBERTI; FARINA; MBASCIATI, 1999).

Semelhante a outros órgãos endócrinos, as PTs não possuem ductos e liberam o PTH diretamente na corrente sanguínea. O PTH regula o $S\text{-Ca}^{2+}$, principalmente por meio de sua ação em três órgãos principais: rins, esqueleto e intestino delgado (Figura 6). Qualquer queda no nível normal de $S\text{-Ca}^{2+}$ será detectado pelo RSCa expresso na superfície das células das PTs. Isso levará à sinalização a jusante e ativação das PTs para secretar ou aumentar a secreção de PTH no fluxo sanguíneo. O PTH atua por meio dos rins, aumentando a reabsorção

de cálcio nos túbulos da porção distal e reduzindo a absorção de fosfato dos túbulos proximais (TFELT-HANSEN; BROWN, 2005).

Figura 5 - Ilustração da relação sigmoidal entre a liberação de paratormônio e o nível de cálcio ionizado sérico.

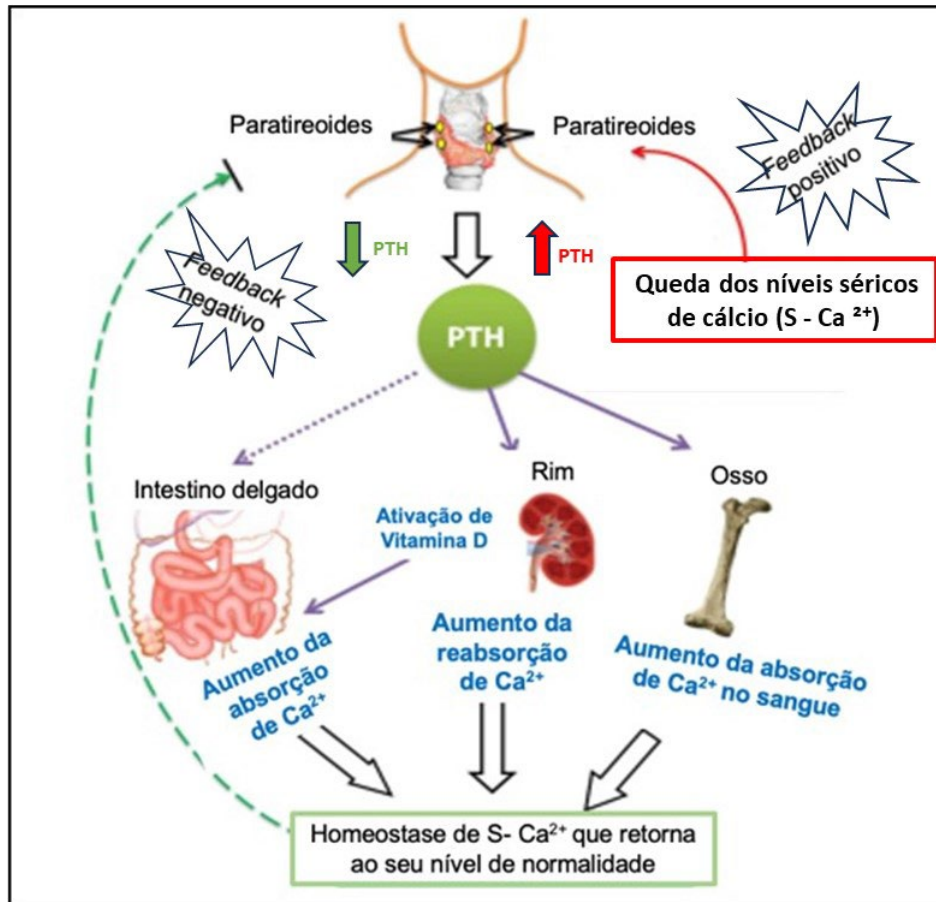


S-Ca²⁺: Cálcio ionizado sérico.

Fonte: Adaptada de Malberti; Farina; Mbasciati (1999).

O PTH e a vitamina D são os dois principais reguladores do metabolismo mineral. Eles desempenham papéis críticos na manutenção da homeostase do cálcio e do fosfato, bem como no desenvolvimento e na manutenção da saúde óssea. O PTH e a vitamina D formam um ciclo de *feedback* estritamente controlado, sendo o PTH um importante estimulador da síntese de vitamina D no rim, enquanto a vitamina D exerce *feedback* negativo sobre a secreção de PTH. A principal função do PTH é agir como principal regulador fisiológico de cálcio ionizado circulante. Os

efeitos do PTH no intestino, nos rins e ossos servem para manter o cálcio sérico dentro de uma faixa estreita. O PTH propicia efeito recíproco no metabolismo do fosfato. Em contraste, a vitamina D causa efeito estimulador na homeostase do cálcio e do fosfato, desempenhando papel fundamental no fornecimento de minerais adequados para a formação óssea normal. Ambos os hormônios atuam em conjunto com os mais recentemente descobertos: fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF23) e klotho, hormônios envolvidos predominantemente no metabolismo do fosfato, que também participam desse circuito de *feedback* estreitamente unidos. De grande interesse são os estudos recentes que demonstram os efeitos do PTH e da vitamina D no sistema cardiovascular. O HPT e a deficiência de vitamina D têm sido implicados em uma variedade de distúrbios cardiovasculares, incluindo hipertensão, aterosclerose, calcificação vascular e insuficiência renal. Ambos os hormônios têm efeitos diretos no endotélio, coração e outras estruturas vasculares (KHUNDMIRI; MURRAY; LEDERER, 2016).

Figura 6 - Homeostase do cálcio. Regulação do cálcio extracelular pelo PTH

PTH: Paratormônio, **S-Ca²⁺:** Cálcio ionizado sérico, **Ca²⁺:** Íon cálcio.
 Fonte: Adaptada de Tfelt-Hansen e Brown (2005).

O PTH aumenta a conversão da forma inativa da vitamina D (25-hidroxivitamina D) para o metabólito ativo, 1, 25-di-hidroxivitamina D₃ por meio da ativação da enzima 1 α -hidroxilase nos túbulos proximais dos rins e a vitamina D ativa, por sua vez, atua no intestino delgado para aumentar a absorção intestinal de cálcio. O efeito do PTH no esqueleto ocorre principalmente por meio da indução de reabsorção que leva ao aumento da liberação de cálcio na corrente sanguínea e causa elevação imediata do cálcio extracelular. O efeito do PTH secretado sobre rins, ossos e intestino delgado é o aumento no nível de S-Ca²⁺ que será percebido pelas PTs por meio do RSCa como um sinal de *feedback* negativo para reduzir a secreção de PTH e manter o S-Ca²⁺ em nível fisiológico de normalidade (KHUNDMIRI; MURRAY; LEDERER, 2016).

O cálcio, fosfato (fósforo inorgânico) e a vitamina D interagem em vários processos fundamentais, dentre eles: fornecer material de construção dos ossos e dentes. No esqueleto, o cálcio e o metabolismo de fosfato trabalham em conjunto com osteoblastos, osteócitos e proteínas da matriz extracelular para mineralizar o osteoide (matriz óssea formada a partir de osteoblastos ativos e que ainda não foi calcificada). Por outro lado, em tecidos com estruturas não esqueléticas, existe um sistema regulador menos compreendido que impede a deposição prejudicial de complexos cálcio-fosfato em tecidos moles (KIRSCH, 2006).

O fósforo está presente principalmente em combinação com oxigênio na forma de fosfatos (PO_4). A presença de cálcio e vitamina D intensifica a atividade de fosfatos encontrados nos alimentos; assim sua insuficiência no organismo é rara. A deficiência duradoura pode levar ao raquitismo e descalcificação dos ossos. O cálcio e o fósforo podem exercer papel regulador positivo no crescimento e na proliferação celular. O cálcio é necessário para a contração muscular, liberação de hormônios, concatenação da coagulação sanguínea e excitação neuronal; o fósforo, por sua vez, está envolvido no metabolismo energético do corpo, na síntese de ácido nucleico, na condução de sinalização celular e na estabilização da membrana celular (SUN *et al.*, 2020).

A regulação do cálcio e a concentração de fosfatos no soro dependem da atividade combinada de PTH, vitamina D e calcitonina. O hormônio de crescimento (HC), prolactina, glicocorticoides, hormônios tireoidianos, prostaglandinas e somatomedinas têm influência adicional sobre o cálcio e metabolismo de fosfatos (CALVO; URIBARRI, 2013). A questão da insuficiência de vitamina D preocupa muitos países, tanto aqueles com menor nível de assistência médica quanto aqueles com prevenção adequada da insuficiência de vitamina D. Os primeiros pródromos de sua escassez ocorrem aos dois anos de idade e durante a puberdade (KOLLATAJ *et al.*, 2015).

A vitamina D₃, produzida no sistema tegumentar por estímulo de raios solares, é uma pró-vitamina que se ativa após duas etapas (HOEL *et al.*, 2016). A primeira parte do processo, chamada hidroxilação, ocorre no fígado pela ação de uma enzima, a 25-hidroxilase, para produzir a 25-hidroxivitamina D(25(OH)D₃), forma parcialmente hidrossolúvel que apresenta semivida curta e é transportada para a

circulação sanguínea associada às proteínas de ligação. A outra etapa da hidroxilação ocorre nos rins, sob a influência de 1 alfa-hidroxilase para ativar o hormônio 1,25(OH)₂D, que apresenta atividade característica de vitamina D (THEODORATOU *et al.*, 2014). A hidroxilação nos rins é controlada por PTH, cálcio e fósforo, além de outros hormônios. Os receptores de vitamina D (RVD) participam da atividade da vitamina D e agem como fatores de transcrição. O mecanismo do receptor permite que esta regule a homeostase mineral no organismo. Devido à vitamina 1,25(OH)₂D, a absorção de cálcio e fósforo nos intestinos é possível. Se houver deficiência de vitamina D, a absorção de cálcio é consideravelmente maior do que a de fósforo (AUTIER *et al.*, 2014).

2.5 Tumores de paratireoide

Os tumores de PT são neoplasias endócrinas raras que afetam 0,1-0,3% da população geral (HENDY; COLE, 2013), compreendendo adenomas benignos secretores de PTH de crescimento lento em quase 100% dos casos, adenomas atípicos de PT em cerca de 1,2 a 1,3% dos casos e carcinoma, extremamente raro, em menos de 1% dos casos (GALANI *et al.*, 2021).

Ao contrário dos AP, os CP apresentam sinais de invasão local e/ou metástases à distância e são caracterizados por hiperprodução de quantidades maciças de PTH (até cerca de 100 vezes maior do que em adenomas) e uma hipercalcemia grave, comumente intratável, responsável pela morte na maioria dos casos. Adenomas de PT atípicos (APA) são um grupo de tumores de PT, que apresentam características histológicas atípicas específicas (ou seja, padrão de crescimento sólido, bandas fibrosas e atipia celular) e com malignidade potencial incerta, que difere dos CPs, principalmente pela ausência de sinais evidentes de invasão local e metástases (HENDY; COLE, 2013).

Os tumores de PT e o pHPT relacionado se manifestam principalmente como uma doença esporádica de uma única glândula em mais de 90% dos casos, enquanto apenas cerca de 1 em 10 casos é forma familiar hereditária, que pode afetar de 1 a 4 PTs (ALVELOS; MENDES; SOARES, 2011). As formas herdadas incluem tumores familiares isolados de PT e quatro formas sindrômicas

autossômicas dominantes, nas quais as neoplasias estão associadas a outras doenças endócrinas e anormalidades não endócrinas (MARINI *et al.*, 2021).

Os tumores de PT apresentam grande heterogeneidade em seu *background* genético e características moleculares, tanto para formas hereditárias como esporádicas. Infelizmente, nenhuma das características histológicas é específica ao ponto de permitir distinção pré-operatória entre AP, APA e CP. Portanto, é de vital importância aumentar o conhecimento sobre genética, epigenética e assinaturas moleculares, que caracterizam diferentes subtipos de tumores de PT, diferentes tumorigêneses para identificar potenciais biomarcadores diagnósticos capazes de permitir a distinção entre os diferentes tipos de neoplasias de PT, bem como fornecer novas opções de alvos terapêuticos e estratégias para essas raras neoplasias, que ainda são um desafio clínico e terapêutico (MARINI *et al.*, 2021).

2.5.1 Adenoma de paratireoide

Os AP são geralmente lesões solitárias. Na patologia macroscópica, os adenomas benignos são principalmente de forma oval, de tonalidade marrom-avermelhada e consistência macia (DUAN; GOMEZ HERNANDEZ; METE, 2015). Os tumores malignos são geralmente maiores, com diâmetro médio em torno de 3 cm e coloração branca acinzentada ou marrom mais pálida. Frequentemente, se infiltram nos tecidos adjacentes e invadem as estruturas vizinhas: glândula tireoide ipsilateral, nervo laríngeo recorrente, músculos infra-hioideos, traqueia e esôfago. O CP parece ter predisposição para as glândulas PTs inferiores (APAYDIN; YAVUZ, 2021).

Microscopicamente, os AP benignos são lesões bem circunscritas compostas por células da PT em proporções variadas: em sua maioria são adenomas de células principais, mas também podem ocorrer adenomas de células oxifílicas, bem como adenomas de células transparentes e lipoadenomas. Esses adenomas são frequentemente caracterizados por uma borda de tecido atrófico justaposto à parte saudável da PT (DUAN; METE, 2015).

Os APs são responsáveis por aproximadamente 85% dos casos de pHPT (MARCOCCI; CETANI, 2011) e podem ocorrer em todas as faixas etárias, com pico de incidência entre a quinta e sexta décadas e com leve predileção pelo sexo

feminino à proporção de 2:1 feminino/masculino (SILVA; CUSANO; BILEZIKIAN, 2018). O início da doença é assintomático, no entanto pode ser determinada por exames laboratoriais rotineiros. A evolução clínica é progressiva, lenta, e o paciente pode apresentar náuseas, diarreias, úlceras gastrointestinais, cálculos urinários ou biliares de repetição, fratura óssea sem causa aparente ou traumatismo leve. As alterações psíquicas não são raras e podem estar associadas à fadiga e fraqueza neuromuscular. Os sintomas podem persistir por meses e anos sem o devido diagnóstico e tratamento (ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 1996).

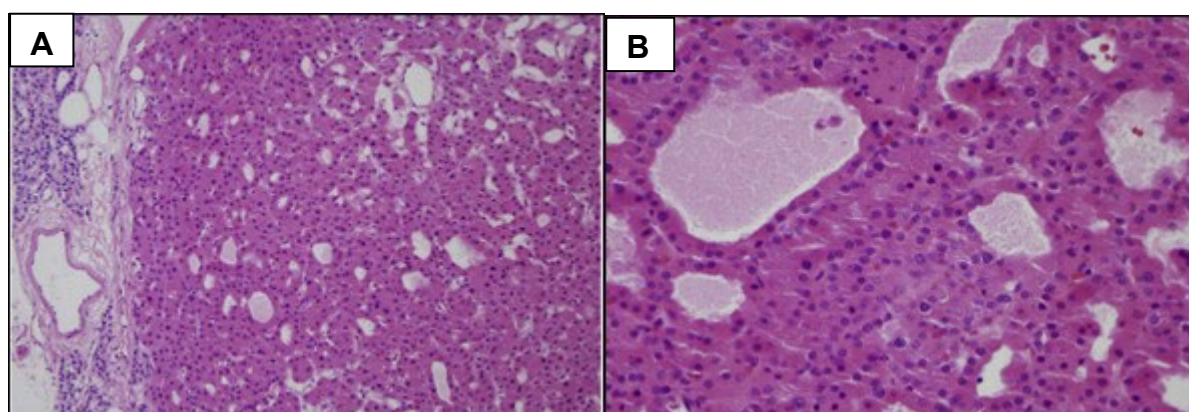
O AP é mais frequente nas glândulas inferiores do que nas superiores, embora estudos possam ser conflitantes (HAMIDI *et al.*, 2007). Além disso, essas neoplasias benignas podem surgir em qualquer glândula, seja ela ectópica ou supranumerária, com casos descritos ocorrendo na região do espaço retroesofágico, timo, janela aortopulmonar vestigial, mediastino e tireoide (FANCY; GALLAGHER; HORNIG, 2010; SPINELLI *et al.*, 2012).

Os APs têm pesos que variam de aproximadamente 300 mg a vários gramas, com tamanhos variando de alguns milímetros até, em alguns casos, a mais de 10 cm (WIENEKE; SMITH, 2008). Grosseiramente, essas lesões são caracterizadas como nódulos bem circunscritos, lisos, marrom-avermelhados, ocasionalmente encapsulados. As maiores lesões frequentemente substituem o tecido paratireoidiano e podem mostrar áreas de hemorragia e degeneração cística (VAN DER WALT, 2012). Na histologia, os APs são tipicamente bem circunscritos ou encapsulados por uma fina cápsula fibrosa e composto por células principais (núcleo redondo, escasso citoplasma) e dispostos em delicada rede capilar. Lóbulos e nódulos podem ser observados no interior de adenomas, com alguma alteração celular oncocítica reveladora, citoplasma rosa proeminente, de granularidade variável (GUILMETTE; SADOW, 2019).

Aqueles adenomas compostos inteiramente por células oxifílicas ou oncocíticas ocorrem e podem ser funcionais (Figura 7) (PAUL *et al.*, 2015). Essa variante é incomum e responsável por menos de 6% dos APs (HOWSON *et al.*, 2015). Se não estiver ausente, a gordura estromal geralmente é esparsa. Uma borda normal ou atrófica de tecido paratireoidiano é tipicamente identificada adjacente ao AP em mais da metade dos casos, contudo pode ser mais difícil ou impossível de

detectar em lesões maiores. A ausência de uma borda normocelular não exclui o diagnóstico de AP, porque grandes adenomas podem ter superado a PT pré-existente ou a borda pode ter sido simplesmente perdida durante o corte (AKERSTRÖM; MALMAEUS; BERGSTRÖM, 1984).

Figura 7 - Adenoma de paratireoide composto por células oxifílicas. **(A)** Células oxifílicas com tecido paratireoide normocelular residual identificado fora da cápsula de adenoma (Hematoxilina & eosina, 200x). **(B)** Arquitetura microcística ou cística pode ser observada no interior do adenoma (Hematoxilina & eosina, 400x)



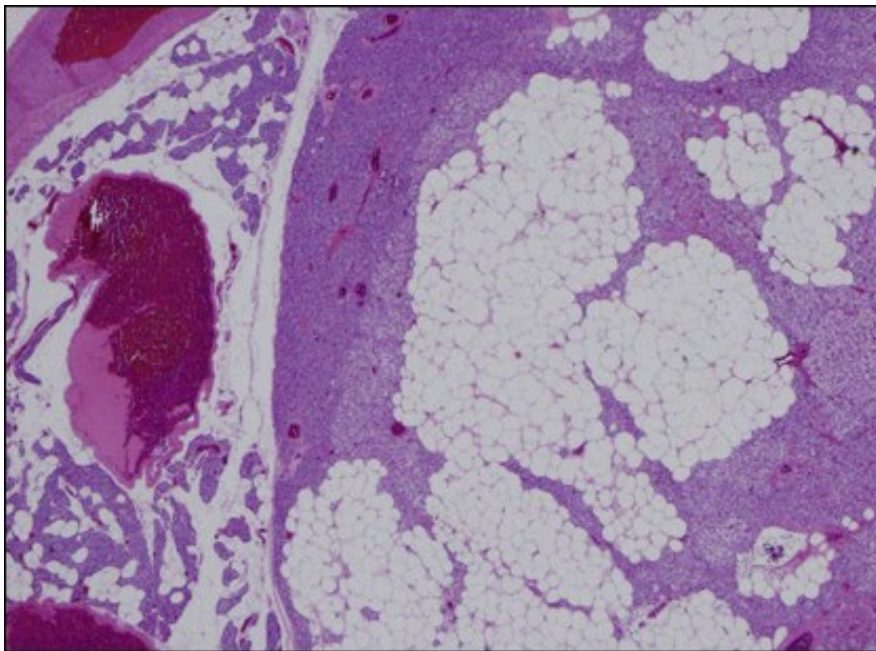
Fonte: Adaptada de Guilmette; Sadow (2019).

Em grandes tumores, áreas de fibrose, calcificação, fendas de colesterol e/ou hemorragia com deposição de hemossiderina podem ser observadas. Em sua maioria, as células em AP são pequenas, uniformes e suaves, com núcleos centrais hiper cromáticos. No entanto, áreas de acentuada atipia nuclear endócrina, incluindo células com núcleos aumentados, manchados, irregulares ou múltiplos núcleos, podem ser observadas (STOJADINOVIC *et al.*, 2003). Os APs não são mitoticamente ativos, mas podem ser levemente proliferativos, geralmente mostrando menos de uma a 10 mitoses por campo de grande aumento (SNOVER; FOUCAR, 1981). O aumento da atividade mitótica e/ou necrose são características preocupantes que devem aumentar a possibilidade de malignidade (AKERSTRÖM; MALMAEUS; BERGSTRÖM, 1984).

Outras variantes incomuns de AP consistem em lipoadenoma e adenoma de células claras. Os lipoadenomas de PT são tumores benignos compostos por células

estromais e elementos parenquimatosos, com adipócitos maduros compreendendo mais de 50% do tumor (JOHNSON *et al.*, 2015) (Figura 8). Pequenos ninhos de células parenquimatosas da PT, principalmente células principais e, raramente, células principais e células oncocíticas (oxifílicas), são encontradas espalhadas por todo o tumor. Os lipoadenomas desviam-se da distribuição típica de gordura observada na hiperplasia e neoplasia de PT (CETANI; TORREGROSSA; MARCOCCI, 2016).

Figura 8 - Lipoadenoma. Hematoxilina & eosina, 200x



Fonte: Adaptada de Guilmette; Sadow (2019).

Adenomas de células claras são tumores raros com poucos casos relatados na literatura (ARIK *et al.*, 2019). Esses adenomas são compostos por células de tamanho intermediário a grande, com citoplasma claro contendo pequenas vesículas e glicogênio (MURAKAMI *et al.*, 2014). O lipoadenoma e adenoma de células claras estão ocasionalmente associados ao pHPT (ÖZDEN *et al.*, 2018).

Ao longo dos anos, o diagnóstico de AP duplo perdeu popularidade entre a comunidade médica. Muitos pacientes diagnosticados com adenoma duplo, eventualmente retornam com HPT associado a glândulas residuais. Contudo, o

diagnóstico de duplo adenoma requer a identificação de certos critérios. Inicialmente, o paciente precisa apresentar duas PTs hipercelulares aumentadas e histologicamente anormais. As duas glândulas restantes devem ser estrutural e sorologicamente normais. Após a excisão de ambas as glândulas anormais, o acompanhamento em longo prazo deve permanecer sem intercorrências porque o paciente deve ser curado do HPT. Além disso, o paciente deve ter uma família com história negativa de doença de PT. Com esses critérios rigorosos, apenas alguns casos de AP duplo são descritos na literatura (OGUS; MAYIR; DINCKAN, 2006).

A remoção cirúrgica de PTs poderá curar definitivamente o paciente com regressão das alterações, contudo em repercussões ósseas e alterações renais pela nefrocalcinose muito graves, o quadro pode ser irreversível culminando com o óbito (PROSPERO *et al.*, 2009).

2.5.2 Adenoma atípico

Algumas neoplasias de PT apresentam características preocupantes para malignidade, incluindo bandas de fibrose, atipia nuclear, figuras mitóticas conspícuas, necrose e quadro de resposta desmoplásica estromal. No entanto, características inequívocas de malignidade, incluindo infiltração direta de tecido adjacente, invasão vascular ou envolvimento neural, não são identificados (DELELLIS, 2011). Esses tumores limítrofes não preenchem os requisitos histológicos para o diagnóstico de carcinoma e geralmente são classificados como APs, tumores considerados com potencial maligno incerto. Estudos avaliando a imunorreatividade da parafibromina têm provado serem valiosos para prever o potencial de recorrência em APs. Entre a parafibromina (CDC73)-deficiente, 10% dos APs recorreram, enquanto nenhum dos parafibromina (CDC73)-positivo o fez. Porém, são necessários mais estudos de longo prazo para avaliar a malignidade potencial e determinar o risco de doença metastática entre essas lesões (KRUIJFF *et al.*, 2014). É importante não fazer o diagnóstico de carcinoma sem evidências inequívocas de malignidade. O tratamento (ou seja, cirurgia e acompanhamento clínico) é, muitas vezes, equivalente ao preconizado para o CP localizado e, desde

que haja acompanhamento clínico adequado, há pouca necessidade de traumatizar emocionalmente o paciente em casos limítrofes (GUILMETTE; SADOW, 2019).

2.5.3 Carcinoma de paratireoide

O carcinoma que surge em uma glândula PT é raro e corresponde a menos de 1% dos casos de pHPT (DUAN; METE, 2015). A incidência de CP entre as mulheres parece predominar, os pacientes são tipicamente jovens e quase sempre apresentam sintomas relacionados ao aumento dos níveis séricos de cálcio, que podem chegar a 15 mg/dL (valores de referência 8,5-10,2 mg/dL). A maioria dos CP ocorre de forma esporádica, mas os casos em pacientes com endocrinopatias familiares estão bem documentados (CETANI *et al.*, 2019).

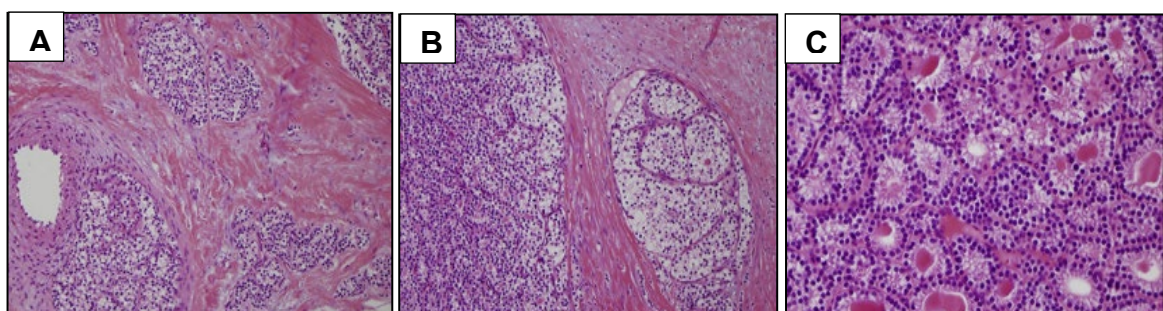
Os CP tendem a ser grandes, com peso médio de cerca de 12 g (*versus* peso normal típico de 50 mg) (CETANI *et al.*, 2019). No pré-operatório, os carcinomas podem apresentar aderência aos tecidos moles adjacentes ou mesmo ao esôfago. Morfologicamente, há uma constelação de achados histológicos que procura confirmar o diagnóstico de CP. De acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS), um diagnóstico de CP requer invasão linfovascular ou perineural inequívoca, ou invasão em áreas adjacentes ou doença metastática. Caracteristicamente, os CP são neoplasias hipercelulares com crescimento trabecular, bandas fibrosas espessas e uma cápsula tumoral fibrosa espessa. Mitoses, praticamente ausentes tanto na AP quanto na hiperplasia, podem ser frequentes e atípicas no CP. No entanto, é interessante notar que a presença de figuras mitóticas não é patognomônica de malignidade, mas deve pelo menos levar à suspeita de malignidade em tais neoplasias (SNOVER; FOUCAR, 1981).

A invasão capsular por processos neoplásicos tem sido observada em CPs que sofreram degeneração hemorrágica seguida de fibrose e aprisionamento de células tumorais no interior da cápsula (Figura 9) (KAMEYAMA *et al.*, 2002). Outras características relatadas sobre os CPs incluem necrose tumoral, fuso de células tumorais, macronúcleolos proeminentes e figuras mitóticas atípicas (GUILMETTE; SADOW, 2019).

Embora as metástases sejam incomuns no momento do diagnóstico, a doença metastática tem sido relatada em mais de 30% dos casos e é comumente encontrada em linfonodos regionais, ossos, pulmão e fígado. Na doença metastática avançada, a gravidade dos sintomas é diretamente proporcional à carga tumoral, que é concordante com os níveis de PTH produzidos. O prognóstico geral para essa doença é geralmente favorável, com estimativa de cinco anos de sobrevida global anual de 78% a 85%. É comum que os pacientes apresentem múltiplas recorrências da doença ao longo de 15 a 20 anos (ASARE *et al.*, 2015).

As manifestações clínicas do CP são diversas, o que dificulta seu diagnóstico. Quando a cirurgia inicial consegue remover completamente o tumor, pode ser indicativo de bom prognóstico, no entanto a alta taxa de recorrência e as metástases a distância são outro desafio do CP, sendo pulmões e fígado os órgãos geralmente afetados (ASARE *et al.*, 2019).

Figura 9 - Carcinoma de Paratireoide. **(A)** Cápsula fibrótica espessa com células da paratireoide infiltrando em tecidos moles circundantes. Hematoxilina & eosina, 200x. **(B)** Invasão vascular evidenciando característica-chave de carcinoma de paratireoide. Hematoxilina & eosina, 200x. **(C)** Padrão de crescimento microcístico em carcinoma de paratireoide com características citológicas indicativas de processo maligno. Hematoxilina & eosina, 400x



Fonte: Adaptada de Guilmette; Sadow (2019).

Deve-se suspeitar no pré-operatório se qualquer uma dessas condições estiver presente: hipercalcemia grave, níveis muito altos de PTH (> 5 vezes o nível normal), hipercalcemia associada com massa cervical ou paralisia das cordas vocais. Os carcinomas não funcionantes da PT (menos de 10%) e, geralmente, estão presentes

em estágio mais avançado com sintomas de compressão/invasão de estruturas adjacentes, massa cervical e/ou disfagia, rouquidão ou dispneia. Linfonodos e metástases distantes no momento do diagnóstico são incomuns, ocorrendo em 1-6% e 2-4% dos casos, respectivamente (FERRARO *et al.*, 2019).

Cerca de metade dos pacientes apresenta recaída de dois a cinco anos após a ressecção inicial, geralmente apresentando aumento lento dos níveis séricos de cálcio e PTH. A progressão da doença é, geralmente, marcada principalmente por manifestação clínica da hipercalcemia e suas complicações relacionadas. O intervalo livre de doença até o aparecimento de doença metastática pode ser de até 20 anos (FERRARO *et al.*, 2019).

2.6 Genética do adenoma de paratireoide

A maioria dos casos de AP é localizada no pré-operatório usando combinações de várias técnicas de imagem, como ultrassom do pescoço, tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT/CT) e/ou cintilografia Tecnécio-99m Sestamibi (99mTc), e o cirurgião pode, assim, planejar uma paratireoidectomia focada (PATEL *et al.*, 2019). Embora a maior parte dos casos de pHPT seja de tumores esporádicos decorrentes da aquisição somática de aberrâncias genéticas em genes condutores, aproximadamente 5% dos casos estão associados a doenças familiares. Se houver suspeita de uma síndrome familiar, a exploração de quatro glândulas com paratireoidectomia subtotal ou paratireoidectomia total com reimplante intramuscular costuma ser a estratégia preferida, pois esses pacientes podem desenvolver doença metacrônica multiglandular, e alguns também correm o risco de desenvolver CP (NASTOS *et al.*, 2021).

Muito do que se sabe hoje sobre eventos condutores mutacionais na tumorigênese de PT decorre de estudos realizados com parentes de portadores de pHPT familiar, muito antes do aparecimento de técnicas de sequenciamento de última geração. Por análises de ligação genética de membros da família com herança autossômica dominante para o pHPT, foram identificados *loci* de genes afetados pela doença, seguidos de eventos mutacionais pelo complicado método de

sequenciamento de Sanger de grande número de genes candidatos nessas regiões. Por meio dessa metodologia, mutações germinativas do gene MEN1 (para a neoplasia endócrina múltipla tipo 1), RET (rearranjado durante transfecção) e CDC73 (proteína 73 do ciclo de divisão celular), originalmente intitulado gene HPT tipo 2 (HRPT2), ocorrem como eventos subjacentes ao desenvolvimento de múltiplas neoplasias endócrinas; tipo 1 (MEN1), tipo 2A (MEN2A) e HPT-JT (CARPTEN *et al.*, 2002).

As três mutações anteriores exibem alta prevalência para pHPT, ocorrendo em aproximadamente 90% da família MEN1, 20-30% da família MEN2A e em 80% da família HPT-JT. Em pacientes MEN1, o pHPT é a manifestação da doença mais comum, seguido por tumores hipofisários (30-40% dos pacientes), neuroendócrinos duodenais e pancreáticos (mais frequentemente gastrinoma, insulinooma e/ou glucagonoma, 40% dos pacientes) e lesões adrenocorticais (20-45% dos pacientes) (LLOYD *et al.*, 2017). Em MEN2A, a maioria dos pacientes (> 90%) desenvolve carcinoma medular de tireoide e feocromocitoma (50%), considerando que o pHPT é a manifestação clínica mais incomum, ocorrendo em 15-30% de pacientes (ENG, 2019; LLOYD *et al.*, 2017). Para parentes HPT-JT, 70-80% desenvolvem pHPT, enquanto aproximadamente 10% dos pacientes também desenvolvem fibromas ossificantes da mandíbula ou maxila (LLOYD *et al.*, 2017; TORRESAN; IACOBONE, 2019).

O pHPT em MEN1 geralmente se apresenta como doença multiglandular que pode se desenvolver em configurações síncronas ou metacrônicas e pode ser assimétrico. Para a síndrome MEN2A, o pHPT pode se apresentar como doença multiglandular ou de glândula única, existem poucos relatos de CP inequívocos surgindo em parentes MEN1 ou MEN2A (OSPINA *et al.*, 2016). O HPT na síndrome HPT-JT geralmente está associado a um AP; no entanto 15-40% dos pacientes portadores de mutações CDC73 ou deleções de genes podem desenvolver CP (BRICAIRE *et al.*, 2013; LLOYD *et al.*, 2017). Além dessas três síndromes, o HPT também é visto como a única característica no HPT familiar isolado (HPTFI). Essas famílias, muitas vezes, apresentam mutações germinativas em MEN1, CDC73 ou o RSCa, sendo que este último também está associado ao desenvolvimento de doenças familiares de hipercalcemia hipocalciúrica tipo 1 (HHF1) (MARX;

GOLTZMAN, 2019). A razão pela qual alguns pacientes com mutações germinativas desenvolvem síndromes MEN1, HPT-JT e HHF1, enquanto outros desenvolvem HPTFI, não é claramente compreendida, pois não há correlação aparente de genótipo para fenótipo em termos de tipos de mutação e localização de exons. Recentemente, mutações genéticas em células gliais ativadoras da linhagem germinativa sem fator de transcrição 2 (CGS2) também foram acopladas ao HPTFI, adicionando mais um candidato à crescente paleta de genes subjacentes ao desenvolvimento de HPT familiar (GUAN *et al.*, 2016). Além disso, foram encontradas mutações de inativação da linhagem germinativa em genes inibidores de quinases dependentes de ciclina (CDKI) em famílias raras com síndromes do tipo MEN1 (com mutações em CDKN1A, CDKN2B ou CDKN2C) ou MEN4, uma síndrome MEN1 fenotípica caracterizada por mutações em CDKN1B (MARX; GOLTZMAN, 2019).

2.7 Alterações somáticas de adenomas

Diante da identificação das aberrâncias dos genes MEN1, RET e CDC73 como principais responsáveis pelo desenvolvimento do pHPT familiar, seguiram-se numerosos estudos nos quais se avaliou o envolvimento desses genes em tumores esporádicos de PT. Aproximadamente 25-40% de todos os APs esporádicos abrigam a perda de heterozigose (LOH) do *locus* do gene MEN1 em 11q13, e metade desses casos também exibe uma mutação MEN1 inativadora do alelo restante. Curiosamente, foi observada associação entre mutações somáticas do MEN1 e sintomas leves de pHPT, possivelmente defendendo eventos em estágio inicial na tumorigênese de PT (CARLING *et al.*, 1998). Além disso, embora as mutações somáticas do gene CDC73 tenham sido relatadas em pequenos subconjuntos de AP esporádicos, não foram observados relatos de mutações somáticas do gene RET no AP (JUHLIN *et al.*, 2006).

O silenciamento mutacional e/ou epigenético de outros genes predisponentes para HPTFI e síndromes semelhantes a MEN1 também foi detectado em pequenos subconjuntos de aparentes AP esporádicos, incluindo CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C e GCM2 (COSTA-GUDA; ARNOLD, 2014; RICCARDI *et al.*,

2019). De particular interesse, o CDKN1B codifica p27 e a regulação negativa de p27 foi descrita em APs, tanto no nível de ácido ribonucleico (RNA) quanto de proteína (BUCHWALD; AKERSTRÖM; WESTIN, 2004). Além disso, as mutações de CDKN1B também foram funcionalmente ligadas ao desenvolvimento de tumores de PT, solidificando assim o papel da regulação aberrante do ciclo celular no desenvolvimento de AP (PELLEGATA *et al.*, 2006).

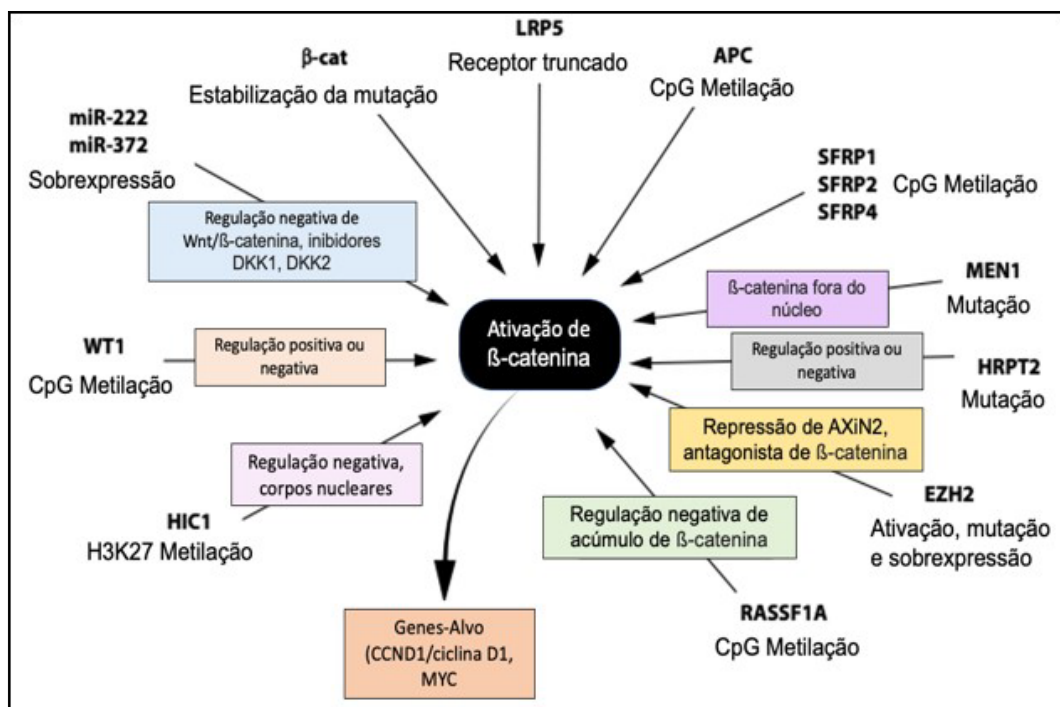
Continuando no tópico do ciclo celular, uma inversão cromossômica recorrente envolvendo a porção pericentromérica do cromossomo 11 foi observada em subconjuntos excessivamente pequenos de APs esporádicos. Esse rearranjo causa a justaposição da região reguladora do PTH 5' à região codificadora do oncogene CCND1, causando uma expressão constitutiva da proteína ciclina D1 correspondente ao CCND1. Embora rara no AP esporádico, a superexpressão da ciclina D1 é um evento comum e, portanto, espera-se que outros mecanismos, além das raras inversões cromossômicas envolvendo CCND1 ou mutações nos CDKIs reguladores da ciclina D1, desempenhem algum papel na doença. Em vez disso, a hipermetilação do promotor e a regulação negativa de vários CDKIs provavelmente poderiam explicar a regulação positiva de ciclina D1, comumente observada em APs (ARYA *et al.*, 2017).

Além da descoberta de alterações somáticas em genes estabelecidos de suscetibilidade em AP, discutidos acima, o advento de técnicas de sequenciamento de última geração levou à descoberta de mutações genéticas adicionais de possível importância para o desenvolvimento de AP. Por sequenciamento de todo o exoma de APs, uma mutação de ativação *missense* no intensificador do gene metiltransferase do homólogo zeste 2 (EZH2) foi detectada em um dos oito adenomas interrogados, e o sequenciamento direcionado adicional de 185 adenomas revelou um caso adicional com a mesma mutação (CROMER *et al.*, 2012). O gene EZH2 é um regulador epigenético da acessibilidade da cromatina com associação à tumorigênese em geral, fornecendo validade adicional a esse gene, constituindo um possível contribuinte para o desenvolvimento de AP, o que também foi verificado usando experimentos funcionais em uma linhagem de células da PT (KIM; ROBERTS, 2016).

Desde então, estudos adicionais de sequenciamento completo do exoma corroboraram baixas frequências de mutações EZH2 em APs esporádicos (WEI *et al.*, 2018). Eventos mutacionais adicionais que ocorrem em baixas frequências em AP incluem mutações ativadoras de CTNNB1, das quais algumas foram relatadas como homozigóticas em pequeno número (BJÖRKLUND *et al.*, 2008), embora não reproduzidas por outras (HAGLUND *et al.*, 2010).

O gene CTNNB1 codifica a β -catenina, uma oncoproteína central que regula a via do tipo *Wingless* (Wnt), e os dados sugerem que o acúmulo nuclear de β -catenina pode ser um fator importante no desenvolvimento de APs, seja por meio de mutações ativadoras ou por correceptores Wnt expressos de forma aberrante (BJÖRKLUND; AKERSTRÖM; WESTIN, 2007). A atividade da β -catenina como um regulador está presente em diferentes tipos de células e com várias abordagens experimentais. De fato, parece possível que muitos dos potenciais oncoproteínas/microRNAs (miRNAs) de PT podem interferir na regulação da β -catenina (WESTIN, 2016) (Figura 10).

Figura 10 - β -Catenina: o eixo na tumorigênese em paratireoide



Fonte: Adaptada de Westin (2016).

Em relação aos subtipos específicos de AP, existe também uma correlação estabelecida entre AP oncocíticos e mutações somáticas em genes codificados por ácido desoxirribose (DNA) mitocondrial (mtDNA), especialmente o gene mitocondrial do complexo da cadeia respiratória NADH desidrogenase 1, 4 e 5 (ND1, ND4 e ND5). Como os tumores oncocíticos, em geral, exibem quantidades proeminentes de mitocôndrias, a associação é intrigante (McGREGOR *et al.*, 1978). No entanto, como não foram observadas mutações recorrentes, esses achados exigem verificação funcional antes que um verdadeiro *status* do *driver* possa ser atribuído a qualquer uma dessas alterações (JUHLIN; ERICKSON, 2021).

2.8 Alterações epigenéticas do adenoma de paratireoide

No nível epigenético, além da hipermetilação dos CDKIs, mencionada anteriormente, a metilação aberrante também foi relatada para vários genes relacionados a tumores, incluindo WT1, SFRP1, SFRP2, SFRP4, RIZ1, APC e RASSF1A. Mais notavelmente, a hipermetilação de RASSF1A foi fortemente associada à *downregulation* ao nível de mRNA em praticamente todos os APs; constituindo, assim, uma das aberrâncias genéticas mais comumente conhecidas nesta doença. Além disso, em nível global, adenomas parecem exibir níveis semelhantes de metilação como tecidos PTs não tumorais, sugerindo que as desregulações epigenéticas são impulsionadas por eventos específicos do gene e não devido a um padrão geral de hipo ou hipermetilação (JUHLIN *et al.*, 2010).

A metilação do DNA é uma das modificações epigenéticas mais bem estabelecidas, com consequências para a expressão gênica, estrutura da cromatina, estabilidade do genoma e expressão alélica. Variações de metilação do DNA em células cancerígenas incluem hipometilação em todo o genoma de elementos de DNA repetitivos, hipometilação de genes ribossomais, que aumentam a função nucleolar e hipermetilação específica do promotor gênico das ilhas CpG (UEMURA *et al.*, 2012).

A metilação global do DNA, medida por meio do sequenciamento de bissulfito, em sítios CpG, não difere daquelas detectadas em PTs normais (JUHLIN *et al.*, 2010). No entanto, a 5-hidroximetilcitosina (5hmC) global, medida por ensaio

Imunoblot semiquantitativo de DNA, apresentou-se reduzida em APs e mais severamente em CPs, em comparação com amostras normais de PT, semelhante ao observado em vários tipos de cânceres. Níveis de expressão reduzidos concomitantes da enzima de translocação 1 t(10;11) foram bem documentados em PT (BARAZEGHI *et al.*, 2016). Essa enzima de translocação 1 t(10;11) funciona como uma demetilase ativa pela oxidação de 5-metilcitosina para gerar 5hmC e, em seguida, 5-formilcitosina e 5-carboxilcitosina. Esses intermediários de oximetilcitosina facilitam a desmetilação do DNA em posição 5 da citosina, o que ocorre frequentemente em cânceres humanos, embora seu papel no desenvolvimento do câncer ainda não esteja claro (VERDELLI; CORBETTA, 2017).

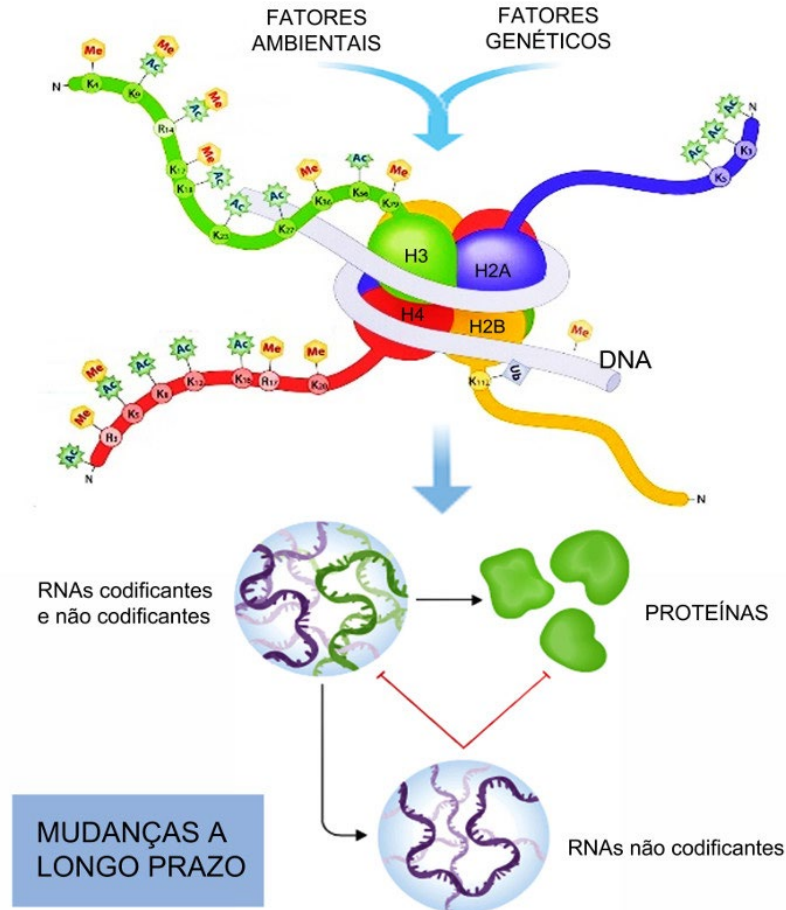
A hipermetilação de ilhas CpG específicas tem sido detectada em tumores de PT. A análise de metilação com base no genoma pelo *Infinium Human Methylation 27 BeadChip* identificou perfis distintos de genes metilados entre tumores de PT e glândulas normais, e entre tumores benignos e malignos (STARKER *et al.*, 2011); considerando as 100 melhores ilhas CpG diferencialmente metiladas, as PTs normais apresentaram baixos níveis de hipermetilação, enquanto os AP foram caracterizados por níveis intermediários e os CPs apresentaram os maiores níveis de hipermetilação de todas as Ilhas CpG examinadas. Estudos com foco no estado de metilação dos genes promotores, selecionados em AP, relataram hipermetilação de RIZ1/PRDM2 (CARLING *et al.*, 2003), CDKN2A/p16, CDKN2B/p15, RASSF1A, SFRP1, SFRP2, SFRP4 e o promotor gênico APC (JUHLIN *et al.*, 2010).

A hipermetilação da região 1A do promotor gênico APC também foi detectada em CPs em associação com níveis reduzidos de mRNA, além da fosforilação do APC que cursa com inibição da proteína β -catenina (SVEDLUND *et al.*, 2010). Portanto, a hipermetilação afeta genes envolvidos nos controles do ciclo celular, via de sinalização Wnt/ β -catenina. Vale a pena notar que os genes específicos de PT, cuja expressão é reduzida na tumorigênese da glândula, ou seja, MEN1 (SULAIMAN *et al.*, 2013), CDC73 (HAHN *et al.*, 2010), CASR e VDR (SULAIMAN *et al.*, 2013; VARSHNEY *et al.*, 2013), não apresentaram padrão de metilação (VERDELLI; CORBETTA, 2017).

2.9 Histonas

As histonas são proteínas que regulam o mecanismo de condensação do DNA. A fita de DNA completa duas voltas em torno de um octâmero de histonas para formar o nucleossomo, estabilizando a cromatina. Cada histona é composta por duas cópias dos dímeros H2A/H2B, uma cópia do tetrâmero H3/H4 e tem um grupo N-terminal que é suscetível a ligações covalentes, especialmente de grupos metil (metilação) e acetil (acetilação), o que pode levar a variações na estabilidade do DNA. Outras reações, como fosforilação, ubiquitinação, biotilação, sumoilação e isomerização da prolina podem ocorrer, levando à modificação das histonas (CONTI DE FREITAS; CASTILHO; SQUARIZE, 2022) (Figura 11).

A ativação de um grupo N-terminal suscetível à ligação covalente pode levar à modificação na estabilidade do DNA que afeta a transcrição. A remodelação da cromatina é afetada principalmente por posicionamento do nucleossomo ao redor do local de início da transcrição, então a posição do nucleossomo também é ligada à transcrição do DNA (MAZZIO; SOLIMAN, 2012). Diferentes mecanismos epigenéticos podem interferir em cada uma das outras funções que também são controladas por moléculas reguladoras, como a histona variante, RNA não codificante e outros. O efeito final sobre a transcrição do DNA é a soma da interação desses diferentes mecanismos (PORTELA; ESTELLER, 2010) (Figura 11).

Figura 11 - Mecanismos epigenéticos e RNA não-codificante

Fonte: Adaptada de Paschon, Alcaraz e Kihara (2014).

A desregulação dos modificadores da cromatina é associada ao aparecimento e à progressão do câncer. Modificações pós-traducionais da histona (metilação, ubiquitilação, acetilação, sumoilação, fosforilação, homocisteinilação, crotonilação e glicosilação) são importantes para estabelecer e manter o estado da cromatina. As modificações pós-traducionais das histonas são adicionadas e removidas por enzimas específicas com funções essenciais, também chamadas de leitoras e apagadoras. Histonas acetiltransferases, histonas metiltransferases e histonas quinases adicionam os grupos acetil, metil e fosforil, respectivamente. Histonas desacetilases, histonas demetilases e histonas fosfatases removem grupos acetil, metil e fosforil, respectivamente. Modificações pós-transcricionais de proteínas histonas interferem em suas interações intra e internucleossomais, bem como em

sua ligação ao DNA. Além disso, elas podem inibir ou facilitar a ligação de várias proteínas não histonas à cromatina (AHUJA; SHARMA; BAYLIN, 2016).

A codificação genética de enzimas capazes de modificar histonas, ou seja (metilases, demetilases, acetilases e deacetilases), muitas vezes está interessada em inativar mutações em cânceres, alguns dos quais são restritos a linhagens de câncer e outras sofrem mutações em várias linhagens de câncer. Nos tumores de PT, expressões desreguladas das seguintes histonas e modificadores de cromatina foram detectadas:

- I. Os transcritos H1.2 são regulados positivamente em cerca de 80% dos tumores de PT com mutação CDC73, incluindo CP esporádicos, familiares e os HPT-JT. As células que expressam H1.2 são mais de 60% em cerca de metade dos tumores (HAVEN *et al.*, 2004). A histona H1 interage com o DNA de ligação entre nucleossomos e age no silenciamento global de genes (KIM *et al.*, 2015).
- II. O complexo *Polycomb* (PcG) consiste em fatores multiproteicos que medeiam a repressão de vários genes no corpo. As proteínas PcG são divididas em duas; proto-oncogene IMC1, um membro do complexo polycomb-repressiva 1 (PCR1), é altamente expresso em AP (SÁNCHEZ-BEATO *et al.*, 2006).
- III. O gene hipermetilado no câncer 1 (HIC1) em 17p13 é um gene oncosupressor, cujo produto proteico interage com a sirtuína1, uma desacetilase dependente de NAD⁺ que cliva o acetil, bem como outros grupos acil, do grupo e-amino de lisinas em histonas (SCHIEDEL *et al.*, 2018). Níveis elevados de metilação (média 56%) do sítio de iniciação da transcrição associado à expressão reduzida do gene HIC1 foram detectados em CP e em um pequeno subconjunto de AP (SVEDLUND *et al.*, 2012). O HIC1 exerce papel repressor de crescimento de células tumorais de PT *in vitro*, e o gene aparece geralmente subexpresso em AP, tumores múltiplos do mesmo

paciente, CP e hiperplasia secundária em tumores. Independentemente do estado da doença de PT, a repressão da expressão de HIC1 envolve a histona H3 lisina 27 dimetilação e trimetilação (H3K27me_{2/3}), em vez da metilação do DNA (SVEDLUND *et al.*, 2014).

- IV. O intensificador de histona, a lisina metiltransferase de zeste 2 (EZH2), uma subunidade catalítica do gene PRC2, é superexpresso em um subconjunto de AP e em todos os CPs devido à amplificação do gene (SVEDLUND *et al.*, 2014). Mutações do gene EZH2, comuns em muitos cânceres, são raras em tumores da PT (SANPAOLO *et al.*, 2016). O gene EZH2 funciona como repressor de transcrição por meio da deposição de H3K27me₃ nas regiões promotoras dos genes-alvo PRC2 e demonstrou, claramente, possuir propriedades oncogênicas (BRACKEN *et al.*, 2003); é comumente superexpresso em uma variedade de malignidades; e apresenta, de modo geral, sobrevida global ruim (VERDELLI; CORBETTA, 2017).
- V. O promotor do gene que codifica o gene supressor de tumor, PRDM2/RIZ1, um H3K9 lisina metiltransferase, é hipermetilado em um terço dos tumores da PT (CARLING *et al.*, 2003), embora nenhuma redução dos níveis de proteína RIZ1 pode ser detectado (STEELE-PERKINS *et al.*, 2001).
- VI. Menin, o produto proteico do gene MEN1 no cromossomo 11q13, perdido ou inativado em tumores de PT, está relacionado à MEN1 e a um subconjunto de tumores esporádicos de PT, é um componente integral de complexos histona-metiltransferase (DREIJERINK *et al.*, 2006). A proteína Menin coativa o gene de transcrição recrutando histona metiltransferase para lisina 4 de histona 3 (H3K4) (DREIJERINK *et al.*, 2009). No entanto, em APs relacionados à

MEN1, os níveis globais de H3K4me3 não são afetados (VERDELLI; CORBETTA, 2017).

- VII. Parafibromina, a proteína codificada pelo gene CDC73 no cromossomo 1q31, perdido ou inativado na PT, está relacionada aos tumores CDC73 e em uma proporção consistente de cânceres de PT esporádicos. Essa proteína regula o nucleotídeo da extremidade 3' no processamento do RNA de histonas. A desregulação de parafibromina por interferência de RNA ou mutações *in vivo* levam a histonas não clivadas em mRNA com caudas poliadeniladas (FARBER *et al.*, 2010).
- VIII. O H2B monoubiquitinado em lisina 120 (K120) é regulado negativamente em CDC73-mutado em tumores PT (COLE; CLIFTON-BLIGH; MARSH, 2015). A monoubiquitinação de histonas está associada com a condensação de cromatina, controle transcricional da expressão gênica e resposta a danos no DNA (VERDELLI; CORBETTA, 2017).

Os RNAs não codificantes estão firmemente estabelecidos como atores importantes na biologia do câncer. Até recentemente, os holofotes eram principalmente para o papel de miRNAs, endógenos RNAs interferentes (siRNA) e RNAs de interação com Piwi (piRNAs) no câncer. Recentemente, no entanto, os RNAs longos, não codificantes (lncRNAs), receberam considerável reconhecimento por sua contribuição para múltiplos aspectos de crescimento do tumor e progressão do câncer. Também deve ser considerado que os miRNAs são, muitas vezes, interrompidos por alterações epigenéticas nas células tumorais. Entre os RNAs não codificantes, os miRNAs foram perfilados em tumores de PT. O perfil global de miRNA, investigado por matrizes baseadas em ensaio de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR), distingue PTs normais de CP (VERDELLI; CORBETTA, 2017).

Os miRNAs C19MC são expressos durante a embriogênese e silenciados durante a diferenciação; em adultos, a placenta é o único tecido expressando miRNAs C19MC. Além disso, vários cânceres relacionados ao embrião reexpressaram, de forma aberrante, os miRNAs C19MC. Um conjunto de miRNAs C19MC, miR-517c, miR-518e, miR-519d, miR-520d-3p, miR-520g e miR-372, pertencentes ao *cluster* de miRNA próximo miR-371-373, são expressos em um subconjunto de AP e na maioria dos CPs (VAIRA *et al.*, 2017). O miR-296-5p é expresso diferencialmente por AP em relação a CP: os níveis de expressão de miR-296-5p são mais altos em tumores benignos (CORBETTA *et al.*, 2010). Por outro lado, a expressão de miR-139 é igualmente diminuída em ambas as doenças e os níveis de miR-222, miR-503 e miR-517c são igualmente regulados positivamente em ambos (adenomas e carcinomas) de PT (VAIRA *et al.*, 2012).

Os níveis de expressão de miR-126-5p, miR-30b e miR-26b são significativamente maiores em AP quando comparados aos CP (RAHBARI *et al.*, 2011). Além disso, o miR-24 maduro é expresso apenas em AP relacionado à MEN1 que conservou o alelo selvagem MEN1, enquanto é regulado negativamente nos tecidos de AP com o 11q13 LOH, bem como em APs esporádicos (LUZI *et al.*, 2012).

2.10 Doenças associadas à histona H3K27

A lisina demetilase 6A (KDM6A), também conhecida como UTX, pertence à família KDM6 de histona H3K27 demetilases, que também inclui UTY e KDM6B. Desde a sua identificação como uma demetilase H3K27 em 2007, estudos mostraram papéis críticos de KDM6A em diferenciação celular, desenvolvimento e câncer. A KDM6A é importante para diferenciação de células-tronco embrionárias e desenvolvimento de vários tecidos. Mutações de KDM6A podem causar a síndrome de Kabuki, uma rara doença congênita humana que se manifesta por distúrbio craniofacial (faciais anormais), deformidades esqueléticas e no coração e defeitos cognitivos (TRAN; BROUN; GE, 2020).

O gene KDM6A funciona como supressor de tumor e é frequentemente mutado em cânceres. Esse gene é redundante com UTY e funciona de forma independente

de sua atividade desmetilase. Ele regula a expressão gênica, provavelmente por meio dos fatores de transcrição associados e MLL3/4 nos potenciadores. No entanto, a atividade enzimática de KDM6A é necessária em certos contextos celulares. Redundância funcional entre as atividades da H3K27 demetilase de KDM6A e KDM6B *in vivo* ainda precisam ser determinadas. Além de seu papel no desenvolvimento embrionário inicial, KDM6A também desempenha papel específico do tecido no desenvolvimento cardíaco, mamário e imunológico (TRAN; BROUN; GE, 2020). Esse gene está relacionado ao desenvolvimento embrionário de tecidos cardíacos. A perda da função de KDM6A em embriões femininos homocigotos mostram alterações embrionárias cardíacas com formação de câmara defeituosa (LEE, S.; LEE, J. W.; LEE, S. K., 2012).

O gene KDM6A controla o desenvolvimento da linhagem de células luminais mamárias e a expressão de genes específicos de células luminais, independentemente de sua atividade enzimática. Demonstrou-se que a perda de KDM6A no lúmen do epitélio mamário de camundongos leva a um *layout* desorganizado de células luminais e basais, à diminuição de populações de células luminais, ao aumento nas populações de células basais e alvéolos deslocados dos ductos principais durante o desenvolvimento mamário. Como consequência, esses camundongos são incapazes de nutrir a prole, apesar de manterem a produção de leite (YOO *et al.*, 2016). A ausência de KDM6A das células luminais mamárias não resulta em transformação oncogênica do epitélio mamário. Em contraste, na leucemia linfoblástica aguda de células T, o gene KDM6A é considerado um supressor tumoral (NTZIACHRISTOS *et al.*, 2014).

As mutações em genes das histonas H3K27 estão presentes em muitos tipos de tumor, incluindo mieloma múltiplo, carcinoma de células escamosas de esôfago, carcinoma de células renais, glioblastoma, câncer de mama e câncer colorretal. Entre 58 amostras de pacientes com mieloma múltiplo testadas, cerca de 10% apresentavam mutações KDM6A (VAN HAAFTEN *et al.*, 2009). Um estudo mais abrangente de 4.742 amostras de tumores de 21 tipos de câncer demonstrou que o KDM6A é altamente mutado em vários tipos deles, especialmente no de bexiga. O carcinoma urotelial é o tipo de câncer mais comum de bexiga e um dos cânceres

mais frequentes em homens em regiões desenvolvidas do mundo (LAWRENCE *et al.*, 2014).

As mutações KDM6A também são frequentes no câncer pancreático, um dos mais comuns e mais letais cânceres no mundo. De acordo com bancos de dados públicos de genomas de câncer de pâncreas, o gene KDM6A apresenta-se mutado em cerca de 10,7% a 21,6% das amostras de pacientes com câncer pancreático (ANDRICOVICH *et al.*, 2018). Mutações de KDM6A também estão presentes em outros tipos de câncer, incluindo leucemia mielomonocítica crônica, câncer de próstata metastático resistente à castração, subgrupos de meduloblastoma e leucemia mieloide aguda (VAN HAAFTEN *et al.*, 2009; JANKOWSKA *et al.*, 2011).

2.11 Potencial de histonas em terapêutica

As características epigenéticas têm sido estudadas em vários tipos de tumores, incluindo aqueles da região da cabeça e pescoço, para esclarecer o mecanismo de progressão do tumor (CASTILHO; SQUARIZE; ALMEIDA, 2017). A hipometilação global de DNA tem sido sugerida para predizer o prognóstico de carcinoma de células escamosas da orofaringe, com risco 3,5 vezes maior de recorrência precoce (GAŹDZICKA *et al.*, 2020). Por outro lado, como na PT, a hipermetilação de genes específicos, como o p16 (ALLAMEH *et al.*, 2019), PTEN (SUSHMA *et al.*, 2016), DAPK (CHOUDHURY; GHOSH, 2015) e RASSF1 (WEN *et al.*, 2018) tem sido apontada como possível mecanismo de silenciamento de genes supressores tumorais, promovendo o desenvolvimento de neoplasias. A acetilação das histonas leva à descondensação com a “abertura” do DNA, favorecendo a transcrição de vários genes (ARIF *et al.*, 2010). A hiperacetilação das histonas pode ser desencadeada pela superexpressão de inibidores de enzimas de desacetilação de histonas (HDAC) (KOIKE *et al.*, 2017).

Foram desenvolvidas algumas drogas que interferem na acetilação das histonas, atuando como inibidores específicos ou de classes múltiplas de HDAC e causando superexpressão de p21, uma quinase dependente de ciclina, capaz de interromper o ciclo celular em G2/M e causar a morte celular em linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço (ROSATO; ALMENARA; GRANT, 2003).

A utilização de um inibidor de HDAC, o LBH589, está associada à interrupção do ciclo celular na fase G2/M em uma linha celular de câncer de faringe. O uso de um inibidor de HDAC em células de câncer de cabeça e pescoço levou ao aumento da expressão de dermatopontina, uma proteína reguladora da disseminação do tumor (KOIKE *et al.*, 2017). A indução de acetilação com um inibidor de HDAC também reduziu a proliferação de células-tronco cancerígenas no carcinoma espinocelular de língua; embora, paradoxalmente, aumentando expressão de BMI-1, um oncogene associado à agressividade tumoral (GIUDICE *et al.*, 2013).

As histonas H3 são hipoacetiladas em tumores de células escamosas de cabeça e pescoço, essa hipoacetilação foi correlacionada com pior prognóstico para esses tumores (WEBBER, *et al.*, 2017). Após tratamento com Vorinostat, as células-tronco em linhas de carcinoma adenoide cístico de glândula salivar foram efetivamente reduzidas, no entanto a combinação de Vorinostat e cisplatina foi altamente eficaz em esgotar as células-tronco do câncer e reduzir a viabilidade do tumor, sugerindo uma remodelação epigenética (CASTILHO; SQUARIZE; ALMEIDA, 2017).

Estudos do tecido neoplásico da PT têm se concentrado em descrever o perfil de DNA e metilação de histonas. Tem sido pouco estudado na acetilação-padrão de histonas, embora esse padrão tenha sido alterado em outros tecidos da região da cabeça e pescoço (VERDELLI; CORBETTA, 2017). A associação de mecanismos de modificação de histonas pós-traducionais com tumorigênese abriu novas possibilidades para identificar alvos de terapia contra o câncer. O primeiro alvo observado foi a redução na acetilação da lisina 16 e metilação da lisina 20 na histona H4 de células neoplásicas, mostrando que estas poderiam ser possíveis alvos de modificação epigenética (PUPPIN *et al.*, 2011).

A ação farmacológica na acetilação de histonas tem desempenhado papel de destaque neste campo. Os HDACs são essenciais para a atividade de transcrição de genes, e uma mudança em sua expressão tem sido demonstrada em tumores, levando ao rápido desenvolvimento de inibidores desta atividade enzimática recomendada por sua atividade antitumoral. A agência federal norte-americana, *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou Vorinostat, Romidepsin, Belinostat e Panobinostat para uso em várias neoplasias malignas (YOON; EOM, 2016). Nenhum

estudo foi realizado até 2022 para testar a aplicação de HDAC como inibidores de neoplasia maligna ou benigna das PTs, nem o perfil global de acetilação foi demonstrado em diferentes doenças que afetam essas glândulas (CONTI DE FREITAS; CASTILHO; SQUARIZE, 2022).

Estudos têm sido conduzidos para testar a aplicação da acetilação de histonas ao prognóstico ou diagnóstico diferencial de neoplasia benigna e maligna (WEBBER *et al.*, 2017). Além disso, a alta desacetilação de histonas em neoplasias tem motivado estudos para avaliar a capacidade dos inibidores de desacetilação de histonas HDAC para prevenir o desenvolvimento do câncer (CONTI DE FREITAS; CASTILHO; SQUARIZE, 2022).

O sulforafano, que tem atividade inibidora de HDAC, está relacionado ao aumento da acetilação no cólon e câncer de próstata com p21 e BAX reduzidos, levando à interrupção do ciclo celular ou apoptose e, assim, prevenindo o câncer (LI *et al.*, 2018). Formulações para aplicação tópica de HDAC MS-275 foram testadas em carcinomas de células escamosas da pele induzidas por UVB em camundongos, parecendo ser promissor para uso como quimiopreventivo (KALIN *et al.*, 2019).

Situações clínicas conhecidas que podem levar ao desenvolvimento de HPT ainda aguardam um agente que possa prevenir a doença. Até agora, a aplicação de inibidores de HDAC para patologias de PT não foram estudados sistematicamente (CONTI DE FREITAS; CASTILHO; SQUARIZE, 2022).

As alterações epigenéticas têm o potencial de demonstrar papel relevante nos tumores da PT. O conhecimento gerado a partir de estudos de histonas pode, potencialmente, ser aplicado para diferenciar tumores benignos e malignos de PT. No sHPT, ajudará a entender a fisiopatologia e as características de progressão da doença. Além disso, os dados até agora obtidos podem determinar se as doenças de PT são potencialmente suscetíveis a tratamentos direcionados ao perfil de histonas. Embora muitos avanços tenham sido observados na acetilação de histonas e seu envolvimento em tumores, foi insuficientemente considerada em tumores de PT (CONTI DE FREITAS; CASTILHO; SQUARIZE, 2022).

2.12 Justificativa

A associação entre mecanismos de modificação de histonas por acetilação e a tumorigênese abriu nova possibilidade de pesquisa na identificação de marcadores diagnósticos e alvos terapêuticos. Após a observação inicial de redução na acetilação de lisina 16 na histona H4 em células neoplásicas (FRAGA *et al.*, 2005), outros estudos buscaram associar acetilação de histonas ao prognóstico (CAO *et al.*, 2017; CHERVONA; COSTA, 2012; HU *et al.*, 2020; MASTORAKI *et al.*, 2020; WEBBER *et al.*, 2017), ou diagnóstico diferencial de neoplasias benignas e malignas (GIAGINIS *et al.*, 2014). A elevada desacetilação de histonas em neoplasias motivou estudos que avaliaram a capacidade dos inibidores de HDAC em prevenir o desenvolvimento do câncer. O sulforafano, um HDAC, em câncer de cólon e próstata levou ao aumento da acetilação, com interrupção do ciclo celular ou apoptose, prevenindo o câncer (HO; CLARKE; DASHWOOD, 2009; MOVAFAGH; MUNSON, 2019; WEI *et al.*, 2016). Formulações para aplicação tópica de inibidores de HDAC, MS-275, têm sido testadas no carcinoma espinocelular de pele e em tumores induzidos por radiação UVB em ratos, parecendo promissor, inclusive para uso em quimioprevenção (KALIN *et al.*, 2019). Assim, diante da reconhecida importância do mecanismo epigenético de acetilação de histonas na tumorigênese em diversos tecidos humanos, torna-se relevante a pesquisa do perfil de acetilação de histonas também em tumores de glândulas PTs.

3. *Objetivos*

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil de acetilação da histona H3K27 em AP de pacientes portadores de hiperparatireoidismo primário submetidos à paratireoidectomia.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar se o perfil de acetilação da histona H3K27 é capaz de diferenciar AP e glândulas PTs não adenomatosas.

- Avaliar se o perfil de acetilação da histona H3K27 é capaz de se correlacionar com parâmetros clínico-laboratoriais, tais como níveis de cálcio, PTH e dimensões de APs.

4. Material e Métodos

4.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi realizado de acordo com a declaração de Helsinque para pesquisa em seres humanos, e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), CAAE nº 57680622.8.0000.5440 (Anexo).

4.2 Características da amostra

Foram selecionadas no Serviço de Patologia do HCFMRP-USP amostras de PTs de dezenove pacientes submetidos à paratireoidectomia no período de 2015 a 2020. Foram incluídas amostras de pacientes cujo diagnóstico clínico estabelecido foi de pHPT e a análise histopatológica confirmou a existência de adenoma.

Os pacientes eram originários do Ambulatório de Cirurgia de Tireoide e Paratireoide (ACTP) do HCFMRP-USP. Os critérios para indicação de tratamento cirúrgico adotados pelo ACTP seguiram protocolos de abordagem do HPT, amplamente aceitos e adotados em outros serviços. Os dados relativos às características demográficas, aspectos clínicos e laboratoriais, dimensões das PTs e informações de seguimento foram consultados nos prontuários dos pacientes. Foram coletados dados sobre gênero, idade, características da doença, sintomas, critérios considerados para definição de tratamento cirúrgico, perfil laboratorial relativo ao metabolismo do cálcio, incluindo cálcio total, albumina, cálcio iônico, 25-hidroxicolecalciferol, creatinina, fósforo inorgânico, fosfatase alcalina, paratormônio e medida de calciúria.

Para fins de comparação entres os tecidos, foram estudadas amostras contendo diagnósticos patológicos de adenoma e de tecido normal. Foram formados dois grupos: um grupo com dezenove amostras de adenomas esporádicos e outro com cinco amostras de tecido normal. Foram excluídas as amostras de pacientes cujo diagnóstico clínico não foi definitivo, pacientes com recidivas ou persistência de doença, aqueles que não puderam manter o seguimento clínico por pelo menos um ano e os que não apresentaram normalização dos níveis de cálcio após seis meses do procedimento.

As lâminas de histopatologia das PTs foram preparadas no Laboratório de Investigação em Culturas de Células e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), coradas em hematoxilina/eosina, analisadas e revisadas por patologista com experiência em patologias da glândula PT. Lâminas com cortes parafinados sequenciais foram enviadas ao *Laboratory of Epithelial Biology, University of Michigan School of Dentistry*, Ann Arbor, Michigan, Estados Unidos da América (EUA), para marcação com imunofluorescência de histona H3k27ac.

4.3 Imunofluorescência

As amostras, inicialmente emblocadas em parafina, foram cortadas de maneira seriada, coradas com hematoxilina/eosina e imunofluorescência para H3K27ac. A confirmação histológica foi feita por patologista com experiência em glândulas PTs, que desconhecia os dados demográficos ou clínicos dos pacientes. Para a coloração da imunofluorescência, as amostras foram seccionadas em cortes de 3 μ m e colocadas em lâminas silanizadas. Os cortes foram desparafinizados com incubação a 60°C por 25 minutos e banhos de xilol por 25 minutos (Figura 12).

Figura 12 - Desparafinização das lâminas para imunofluorescência



Após a desparafinação, os cortes foram hidratados em soluções aquosas de etanol em concentrações decrescentes (100%, 95% e 70%), por cinco minutos cada. (Figura 13).

Figura 13 - Tratamento das lâminas com soluções aquosas e etanol



A recuperação antigênica foi realizada com os cortes imersos em solução de ácido cítrico (10 mM), por dois minutos de micro-ondas em potência 100, seguido de 18 minutos em potência 10 (Figura 14).

Figura 14 - Processo de recuperação antigênica em ácido cítrico



O bloqueio endógeno de atividade da peroxidase foi realizado com dois banhos de 15 min de 6% H₂O₂ + metanol. Após incubação em câmara úmida, durante a noite (a 4°C), com anticorpos primários (diluição 1:100) Acetyl-Histone H3 (Lys27), as lâminas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados Alexa Fluor 488, e então coradas com Hoechst 33,342 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) para visualização do núcleo das células. As amostras foram fotografadas usando uma objetiva de 40X em campo representativo e avaliadas usando o *software Image J* no processo que se segue.

4.4 Tratamento das imagens

As imagens adquiridas nos processos acima descritos foram trabalhadas utilizando-se o programa *Image J 1.53T* (Wayne Rasband and contributors - *National*

Institutes of Health, EUA). Foram selecionadas as fotos capturadas no aumento de 40x (Figura 12), contendo a marcação dos núcleos em azul (4',6-diamidino-2-fenilindol - DAPI) e as marcações imunofluorescentes da histona H3K27ac em verde (isotiocianato de fluoresceína - FITC).

As amostras foram analisadas combinando coloração H3K27ac (Alexa 488) e Hoechst 33.342 (Azul) para identificar e quantificar células duplamente-positivas. Como todas as imagens geradas eram em tons de cinza, e a especificidade de cada canal era dada pelos filtros de banda estreita, a pseudocor das amostras seguia os canais RGB (verde e azul). Essa estratégia permitiu o uso consistente de uma função de canal dividido para quantificação de núcleos positivos com marcação H3K27, diante do total de núcleos marcados em azul (Hoechst). As células positivas foram analisadas e quantificadas usando imagens monocromáticas no *software* NIH *Image J* seguido pelo *plugin* de contagem de células (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). Os resultados foram expressos em porcentagem de células coradas positivas entre o número total de células.

O processo inicial foi a contagem de células nucleadas, marcadas em azul. Para tal, foi utilizado o processo de contagem automática do *Image J* com o seguinte protocolo: após abertura da imagem, foi selecionada opção *color*, seguida de *split channels* para separar as imagens azuis (Figura 15) e verdes (Figura 16). As figuras foram selecionadas e armazenadas para posterior análise. Uma vez selecionada a imagem (Figura 15), foi realizado o controle de brilho na opção *color threshold* em tom de vermelho na opção *adjust*. Nesse controle de brilho, o objetivo foi manter na imagem somente as células válidas (presença de núcleos marcados).

Figura 15 - Imagem com marcação Hoechst original para contagem de núcleos

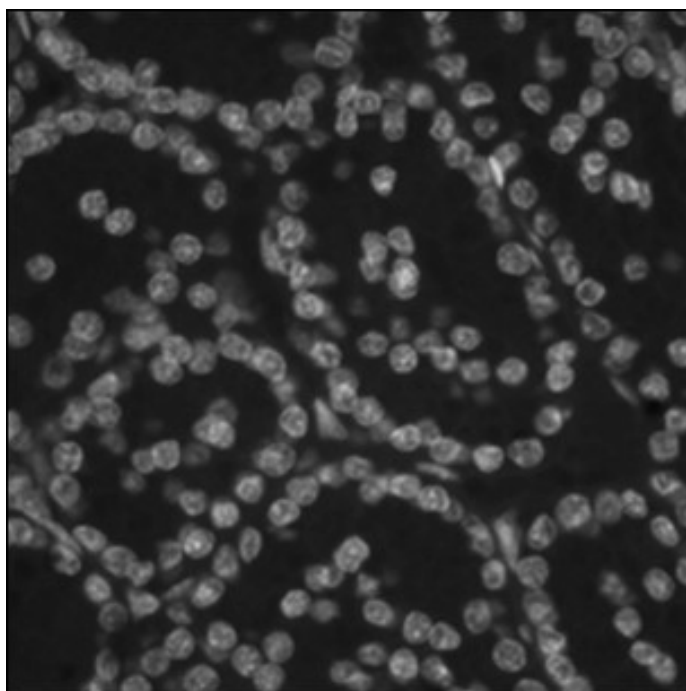
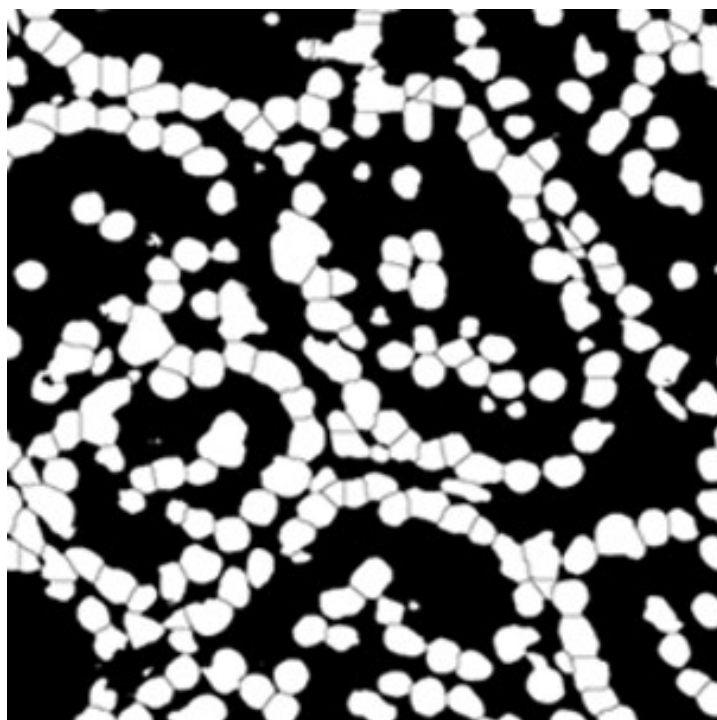
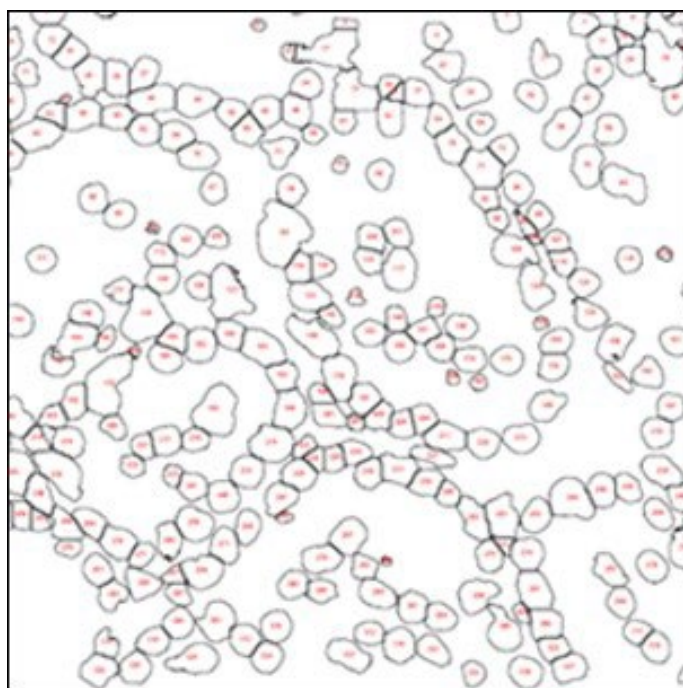


Figura 16 - Tratamento da imagem com o *software Image J* para contagem automática



Uma vez selecionadas as células, foi acionada a opção *Black and White* e por meio do *Process*, transformada a imagem em binária e realizada o *watershed* com intuito de separar células próximas e otimizar a contagem (Figura 17).

Figura 17 - Tratamento da imagem com o *software Image J* com definição de limites nucleares para proceder à contagem automática



Uma vez mantidas na imagem somente as células de interesse, iniciou-se o processo de análise. Selecionada a opção de análise de partículas, com determinação do tamanho aproximado das células a serem contadas, deixando marcadas as opções *pixel unit*, *show outlines*, *display results*, *add to manager* e *exclude the edges* (Figura 18). Após esse processo, foi realizada a checagem manual para melhor individualização das células que pudessem ter saído na contagem como agrupadas. Após, o programa gerou uma tabela de Excel contendo o número de células marcadas. Na sequência, foi realizada a seleção da imagem verde (Figura 19), contendo as marcações em imunofluorescência para H3K27. Optou-se pela contagem manual exclusiva devido ao pequeno número de células e a necessidade de se excluírem as marcações das hemácias (células anucleadas que

apresentavam marcação de imunofluorescência), uma vez que, pela contagem automática, as hemácias seriam incluídas equivocadamente na contagem. A contagem manual foi realizada por meio do protocolo *Multipoint tool*, configurado para mostrar a numeração da seleção, gerando a imagem com as contagens; e o arquivo em Excel com a quantidade de células selecionadas. Ao término da análise das imagens para contagem das células, os dados extraídos foram tabulados junto aos dados dos pacientes para posterior análise estatística.

Figura 18 - Contagem manual dos núcleos das células para dupla-verificação, após contagem automática

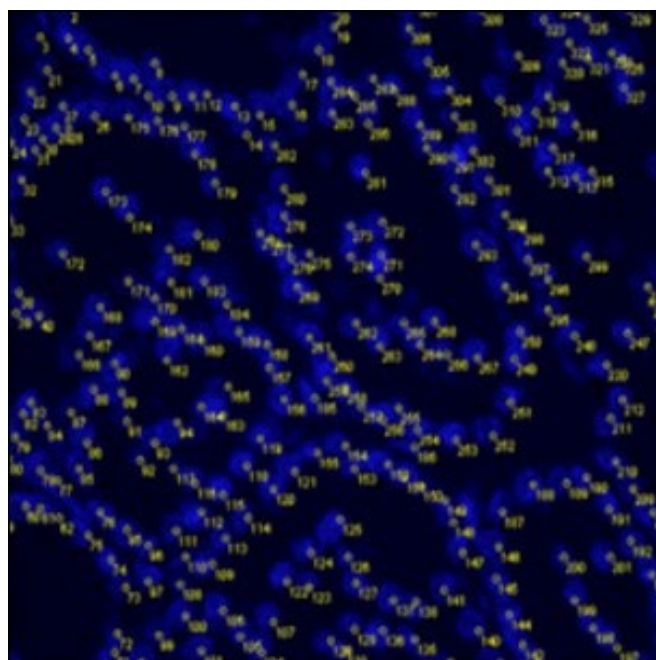
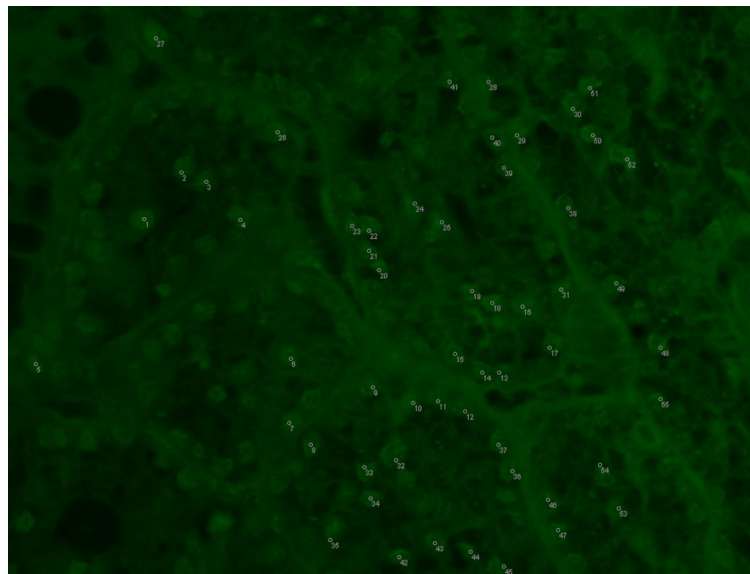


Figura 19 - Contagem manual dos núcleos das células com marcação FITC: positivas para H3K27



4.5 Análise estatística

Para todas as análises estatísticas e confecção dos gráficos foi utilizado o *software* Graphpad Prism para Windows, versão 19 (IBM Corporation, Armonk, NY, EUA). A comparação entre os dados obtidos dos dois grupos (Caso e Controle) foi analisada por testes não paramétricos, uma vez que esses dados não apresentaram distribuição normal. Foram empregados os testes de Mann-Whitney e Spearman. Os coeficientes de correlação de Spearman foram calculados para determinar a correlação da expressão de imunofluorescência entre as amostras de adenoma e os dados clínicos indicadores de doença avançada. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo em todos os testes.

5. Resultados

5.1 Dados demográficos e caracterização da amostra

Dezenove pacientes foram incluídos no estudo, 16 eram do gênero feminino e 3, masculinos, com idade média de $56 \pm 16,2$ anos (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados demográficos dos participantes do estudo

| | Variável | Número |
|--------|---------------|------------------|
| Gênero | Feminino | 16 casos |
| | Masculino | 3 casos |
| Idade | Média | 56 anos |
| | Desvio-padrão | 16,2 anos |
| | Variação | 25,1 a 74,3 anos |

Todos os pacientes apresentavam, como esperado, cálcio e PTH elevados antes da cirurgia, com valores médios de cálcio total de $11,4 \pm 1,8$ e PTH $553,9 \pm 645,1$. E no intraoperatório, as posições dos adenomas foram diversas e equiparáveis. Não foi observado nenhum caso de adenoma ectópico. E estes mostravam volumes médios de $6,3 \pm 12,8$ cm³ (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados de exames laboratoriais pré-operatórios, dados de topografia e dimensão do adenoma no intraoperatório

| Variável | Número | |
|---|---------------|-----------------------------|
| Cálcio pré-operatório | Média | 11,4 |
| | Desvio-padrão | 1,8 |
| | Variação | 9,1 a 16,96 mg/dL |
| PTH pré-operatório | Média | 553,9 |
| | Desvio-padrão | 645,1 |
| | Variação | 89,6 a 2059 mmol/L |
| Localização intraoperatória dos adenomas | PSD | 4 casos |
| | PSE | 5 casos |
| | PID | 5 casos |
| | PIE | 5 casos |
| | Ectópica | 0 |
| Volume dos adenomas | Média | 6,3 cm ³ |
| | Desvio-padrão | 12,8cm ³ |
| | Variação | 0,07 a 50,2 cm ³ |

PTH: Paratormônio. **PSD:** Paratireoide superior direita, **PSE:** Paratireoide superior esquerda, **PID:** Paratireoide inferior direita, **PIE:** Paratireoide inferior esquerda.

5.2 Evolução de indicadores laboratoriais pré e pós-cirurgia

No período pós-operatório, os pacientes foram seguidos por período mínimo de 12 meses, observando-se critérios laboratoriais de cura em todos os casos. Nesse período, em exames seriados, os pacientes apresentaram média de cálcio sérico de $9,34 \pm 0,40$ mg/dL, demonstrando variação de 17,33% em relação aos achados pré-operatórios. Da mesma forma, detectou-se queda de 70,2% dos níveis séricos de PTH. A média observada de PTH no período pós-operatório foi de $71,73 \pm 71,19$ pg/dL. Também foram observadas discreta e temporária elevação dos níveis séricos de creatinina no período pós-operatório mais precoce, retornando aos níveis basais no seguimento pós-operatório longo (maior que seis meses). A variação encontrada foi de 11,45%, com valores médios pós-operatórios de $1,19 \pm 0,56$ mg/dL (Tabela 3). Houve normalização dos níveis séricos de fósforo no período pós-operatório, com média de $3,6 \pm 0,49$ mg/dL, acima do observado no período pré-operatório, que foi de 2,89 mg/dL, representando elevação de 28,1% (Tabela 3).

Tabela 3 - Variação média dos exames pré e pós-operatórios dos participantes do estudo

| | Cálcio pré (mg/dL) | Cálcio pós (mg/dL) | Fósforo pré (mg/dL) | Fósforo pós (mg/dL) | PTH pré (pg/dL) | PTH pós (pg/dL) | Creatinina pré (mg/dL) | Creatinina pós (mg/dL) |
|----------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-----------------|-----------------|------------------------|------------------------|
| Caso 01 | 9,99 | 9,82 | 2,49 | 3,83 | 172 | 28,3 | 0,94 | 0,97 |
| Caso 02 | 12,77 | 9,14 | 2,61 | 3,14 | 1678 | 20,27 | 1,41 | 1,7 |
| Caso 03 | 13,42 | 9,49 | 2,6 | 3,69 | 594,5 | 26,9 | 1,1 | 1,35 |
| Caso 04 | 12,6 | 9,96 | 2,1 | 3,18 | 736,3 | 43,85 | 1,36 | 1,69 |
| Caso 05 | 11,21 | 8,48 | 2,8 | 3,6 | 1900 | 342,1 | 2 | 2,15 |
| Caso 06 | 11,8 | 9,5 | 2,03 | 3,54 | 111 | 8,88 | 0,88 | 0,95 |
| Caso 07 | 9,97 | 9,53 | 3,32 | 3,6 | 128 | 108,56 | 0,92 | 0,93 |
| Caso 08 | 11,6 | 9,07 | 2,66 | 4,09 | 509 | 66,6 | 0,62 | 0,7 |
| Caso 09 | 13,34 | 9,21 | 3,41 | 2,68 | 1900 | 44,98 | 2,36 | 2,21 |
| Caso 10 | 11,34 | 9,24 | 3,27 | 3,67 | 135,25 | 33,88 | 0,67 | 0,75 |
| Caso 11 | 10,3 | 9,45 | 3,53 | 3,75 | 124,45 | 107,66 | 1,28 | 1,45 |
| Caso 12 | 10,39 | 8,5 | 3,2 | 4,93 | 105,34 | 21,37 | 0,84 | 0,82 |
| Caso 13 | 10,66 | 9,13 | 3,77 | 4,13 | 69,2 | 26,2 | 0,89 | 1 |
| Caso 14 | 10,92 | 10,02 | 3,45 | 3,71 | 146,45 | 100 | 0,56 | 0,57 |
| Caso 15 | 11,01 | 9,07 | 3,72 | 3,96 | 169,25 | 81,56 | 1,84 | 2,4 |
| Caso 16 | 10,37 | 9,53 | 2,71 | 3,32 | 120,5 | 61,9 | 0,71 | 0,77 |
| Caso 17 | 11,27 | 9,38 | 2,65 | 3,21 | 197 | 104,26 | 0,68 | 0,85 |
| Caso 18 | 11,73 | 9,72 | 2,55 | 3,57 | 361 | 53,6 | 0,72 | 0,71 |
| Caso 19 | 11,53 | 9,14 | 2,01 | 2,89 | 1147 | 81,91 | 0,58 | 0,72 |
| MÉDIA | 11,38 | 9,34 | 2,89 | 3,60 | 542,33 | 71,73 | 1,07 | 1,19 |
| DP | 1,02 | 0,40 | 0,54 | 0,49 | 618,12 | 71,19 | 0,50 | 0,56 |

PTH: Paratormônio, **DP:** Desvio padrão.

Nos períodos pré e pós-operatório, os dados de evolução referentes aos perfis de cálcio, fósforo, PTH e creatinina estão demonstrados de maneira individualizada nas Figuras 20 a 38. Nesses gráficos é possível observar de maneira clara, as curvas de queda de cálcio e PTH após a cirurgia, a oscilação da creatinina (no período perioperatório com normalização no seguimento pós-operatório longo) e elevação do fósforo após o procedimento.

Figura 20 - Paciente 01: **(A)** Evolução da dosagem sérica de cálcio, **(B)** fósforo, **(C)** paratormônio e **(D)** creatinina no pré e pós-operatório

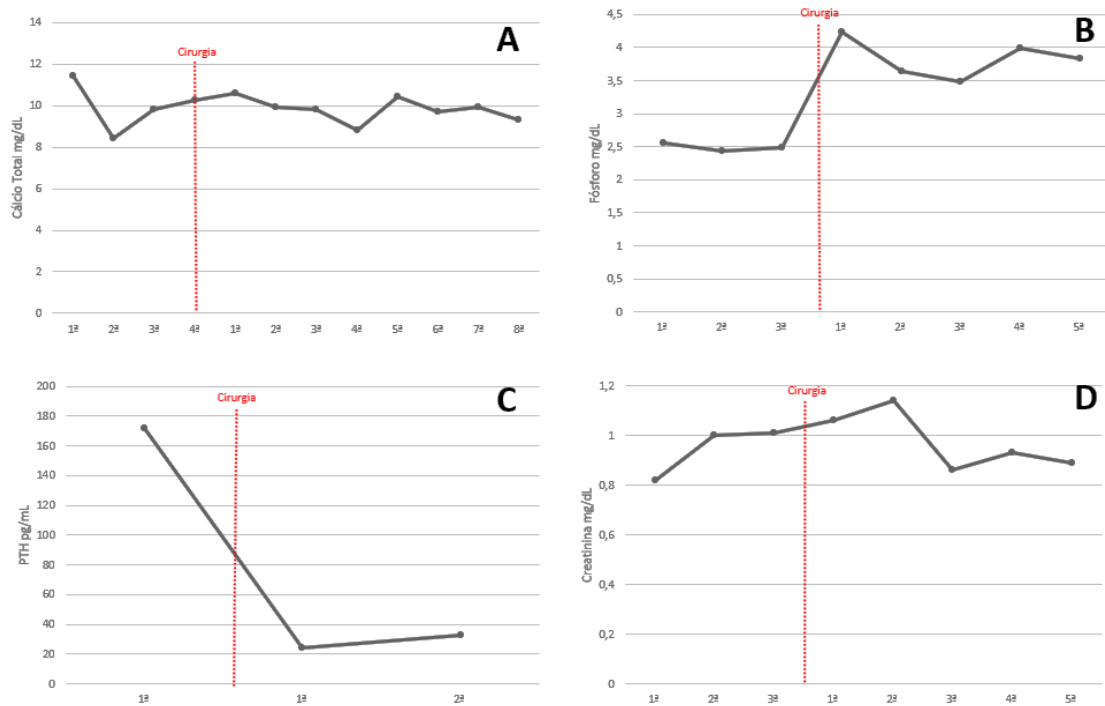


Figura 21 - Paciente 02: **(A)** Evolução da dosagem sérica de cálcio, **(B)** fósforo, **(C)** paratormônio e **(D)** creatinina no pré e pós-operatório

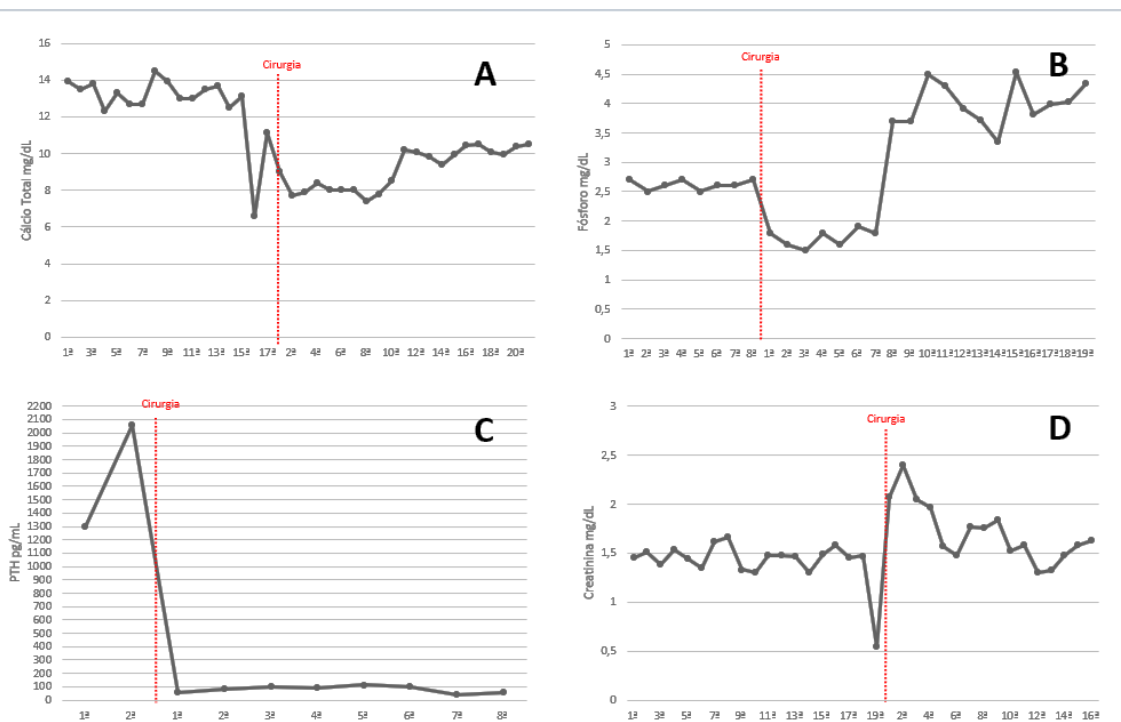


Figura 22 - Paciente 03: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório

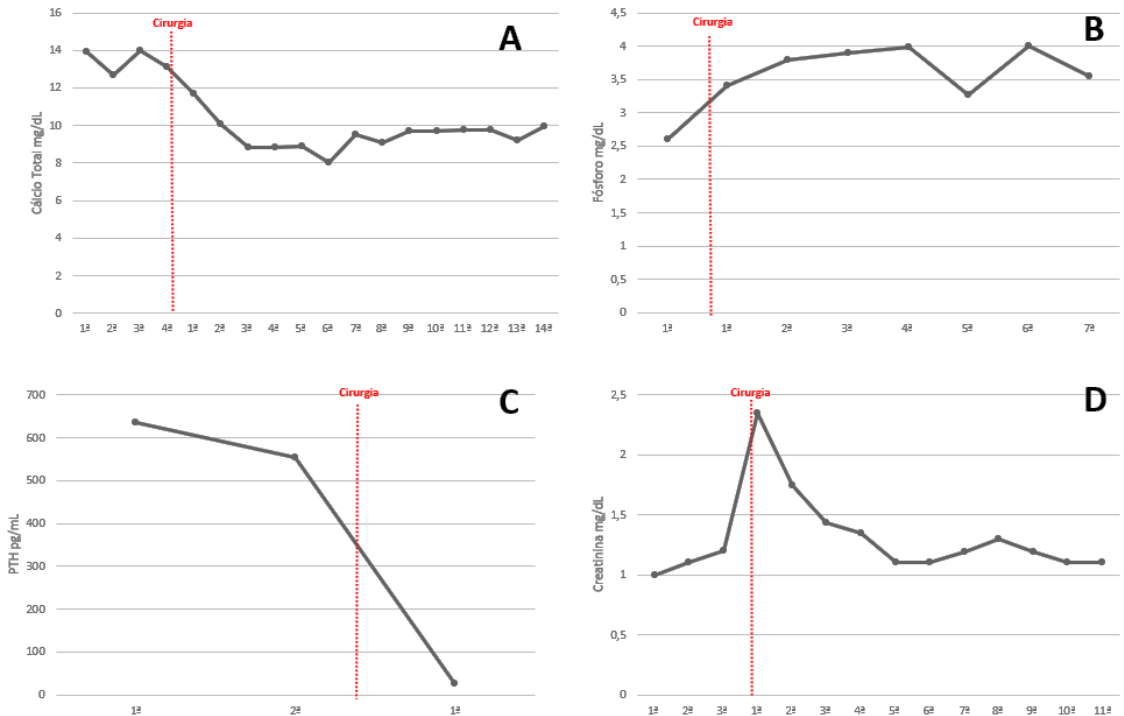


Figura 23 - Paciente 04: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório

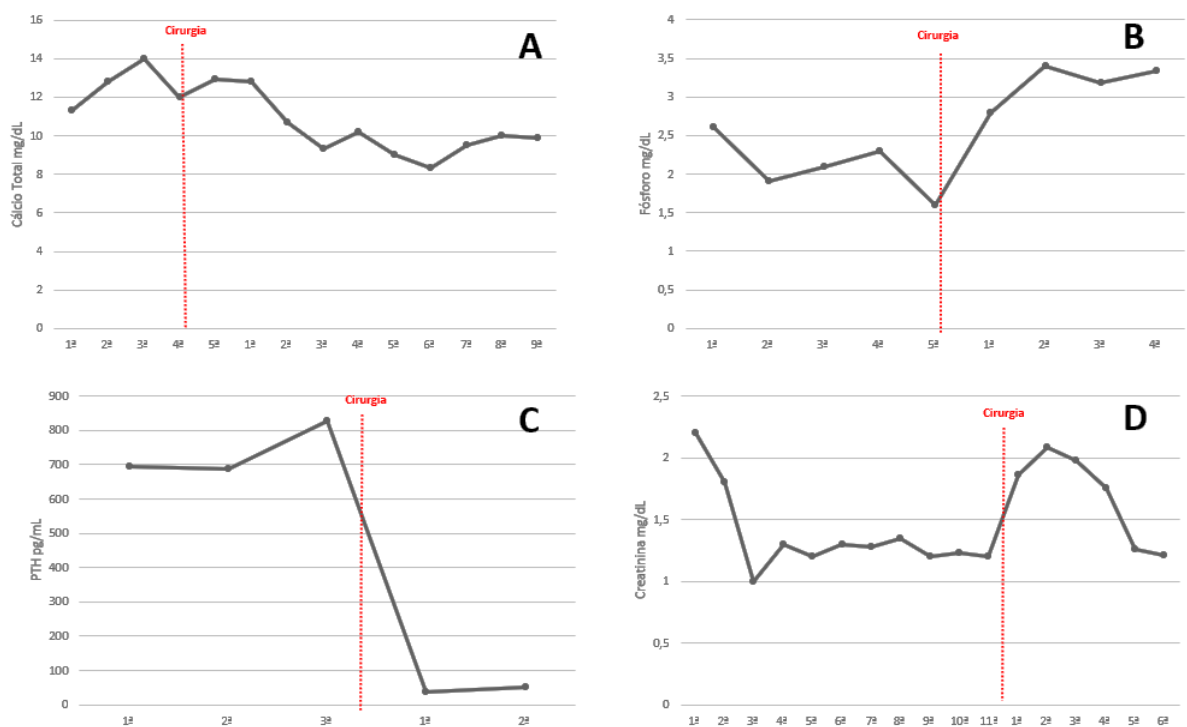


Figura 24 - Paciente 05: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório

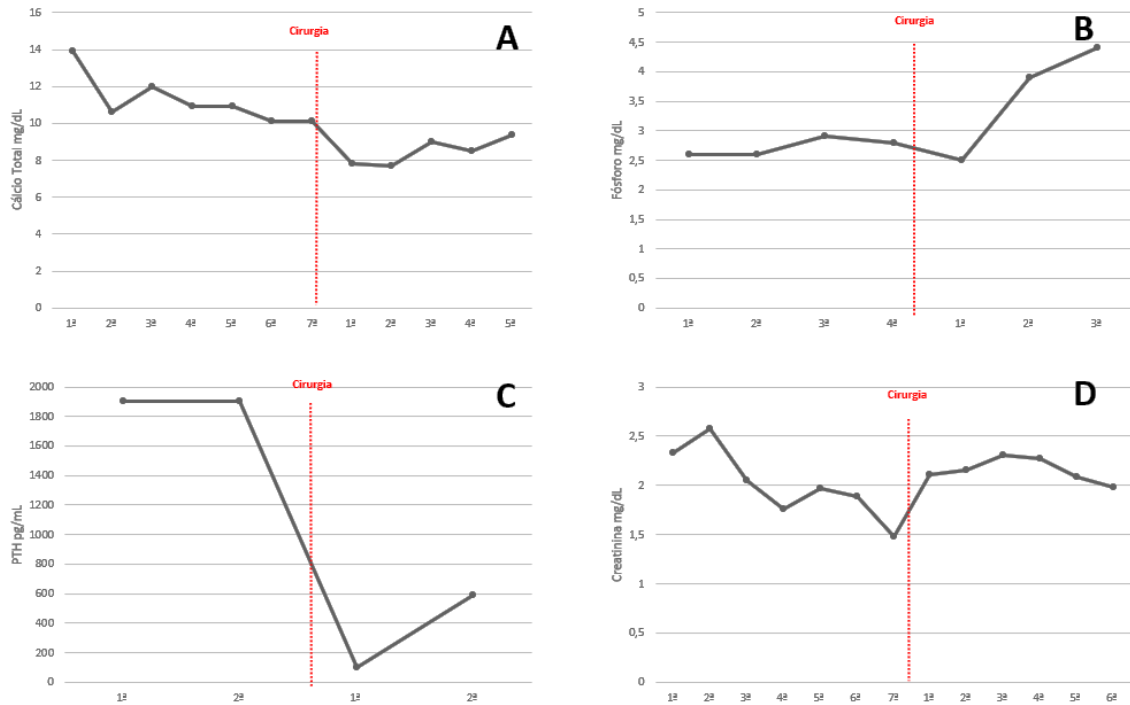


Figura 25 - Paciente 06: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório

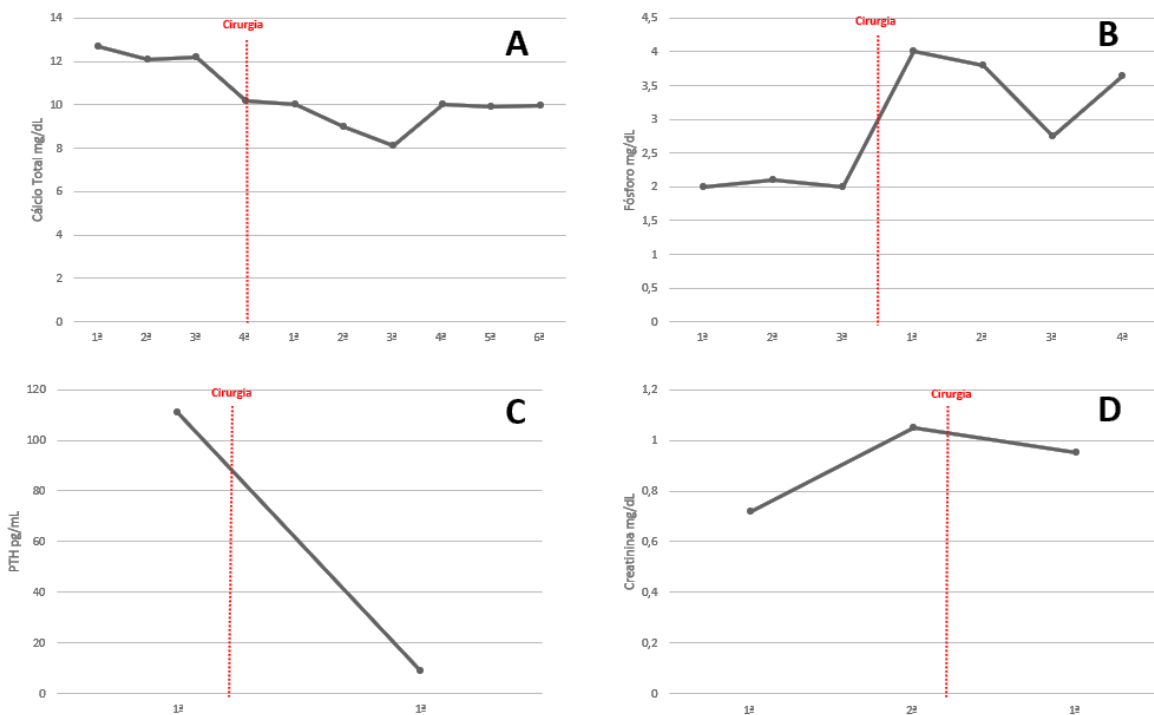


Figura 26 - Paciente 07: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório

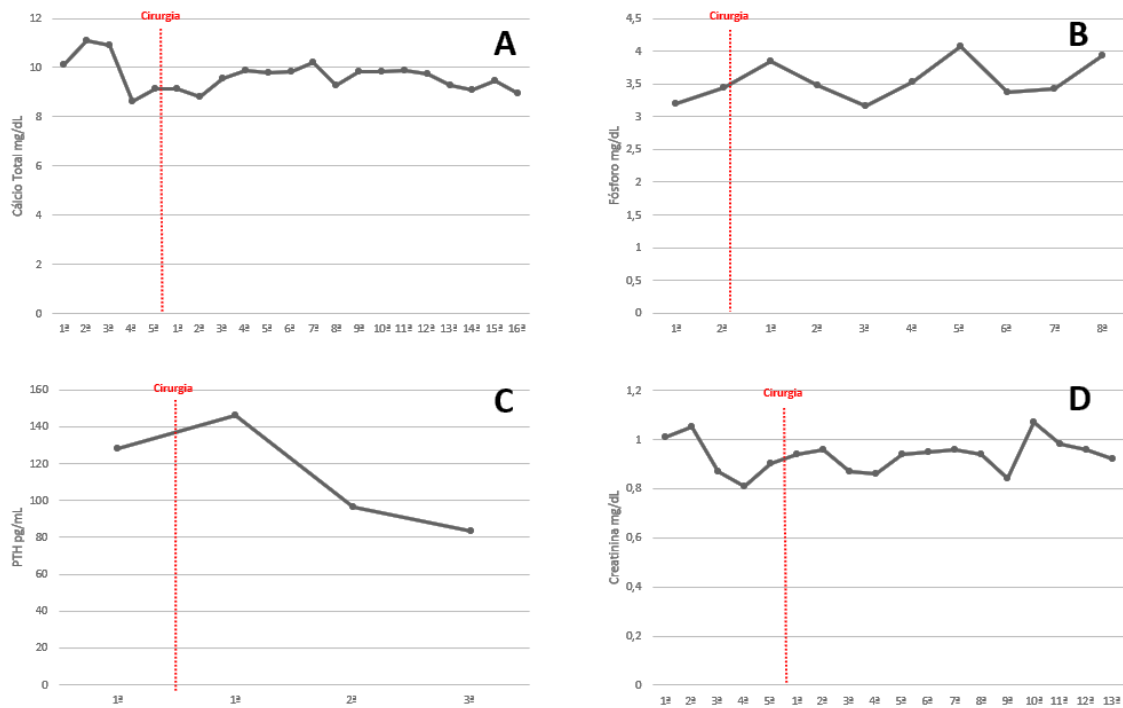


Figura 27 - Paciente 08: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório

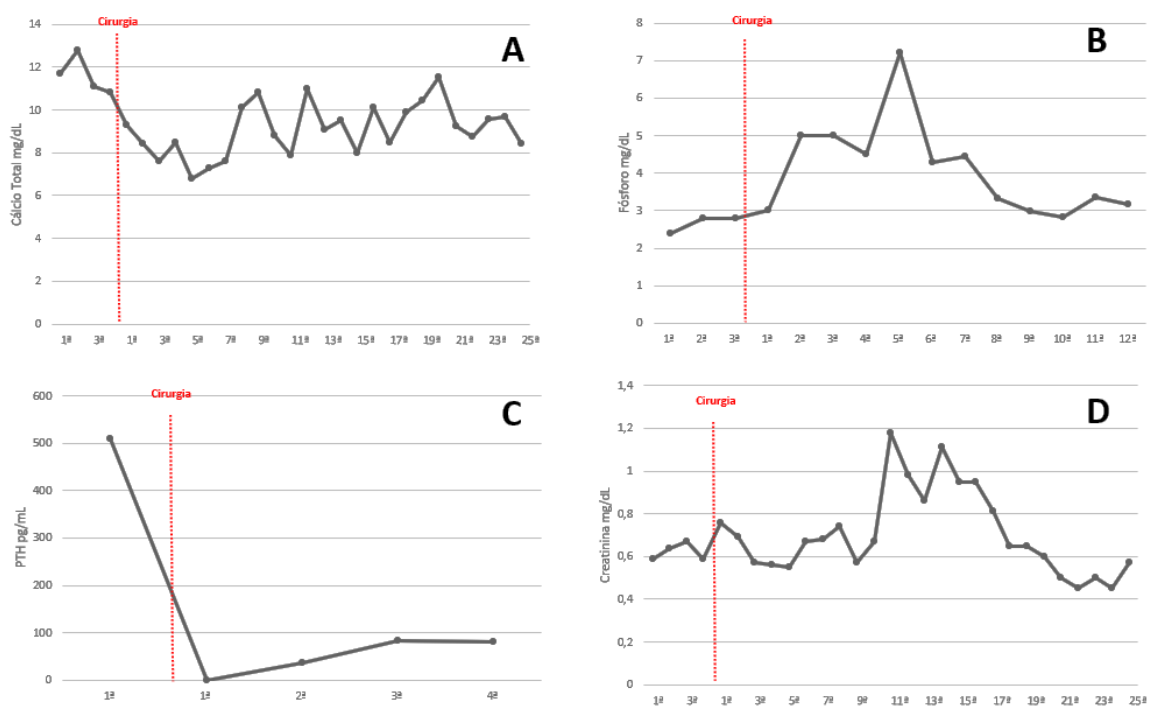


Figura 28 - Paciente 09: **(A)** Evolução da dosagem sérica de cálcio, **(B)** fósforo, **(C)** paratormônio e **(D)** creatinina no pré e pós-operatório

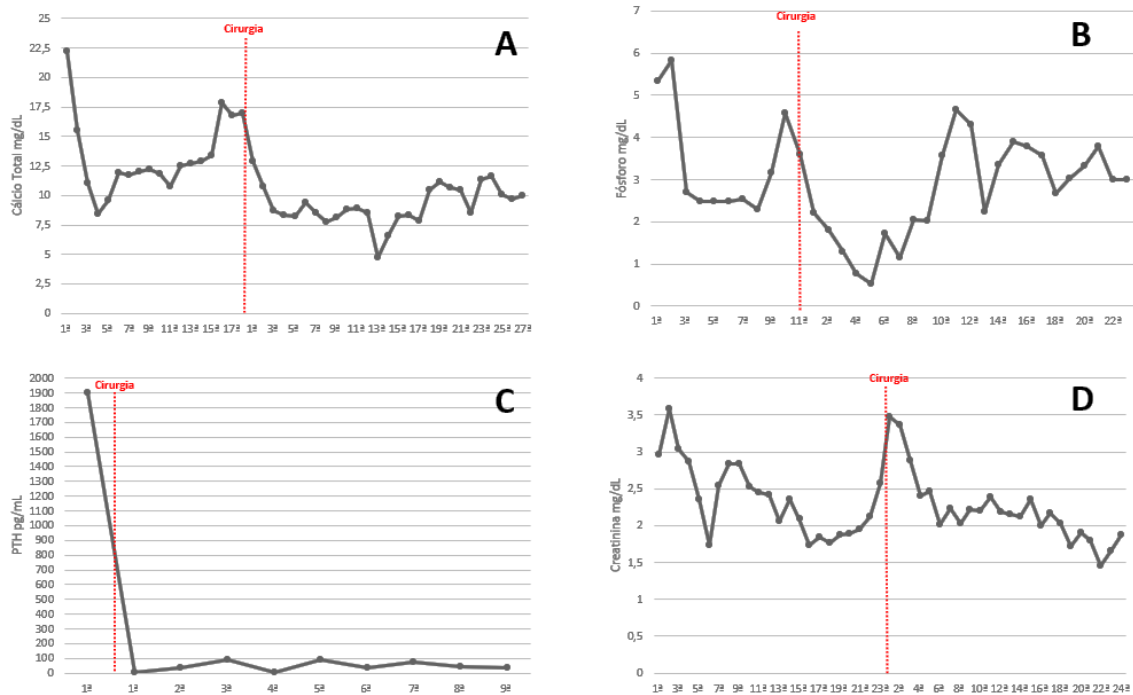


Figura 29 - Paciente 10: **(A)** Evolução da dosagem sérica de cálcio, **(B)** fósforo, **(C)** paratormônio e **(D)** creatinina no pré e pós-operatório

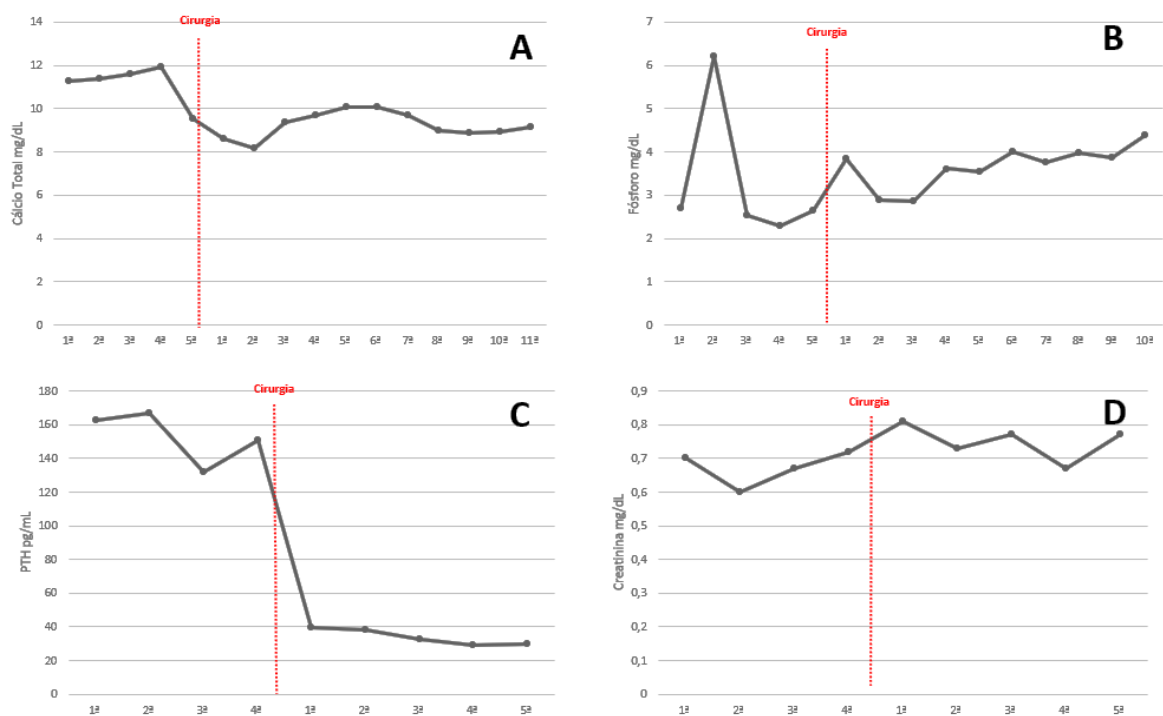


Figura 30 - Paciente 11: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório

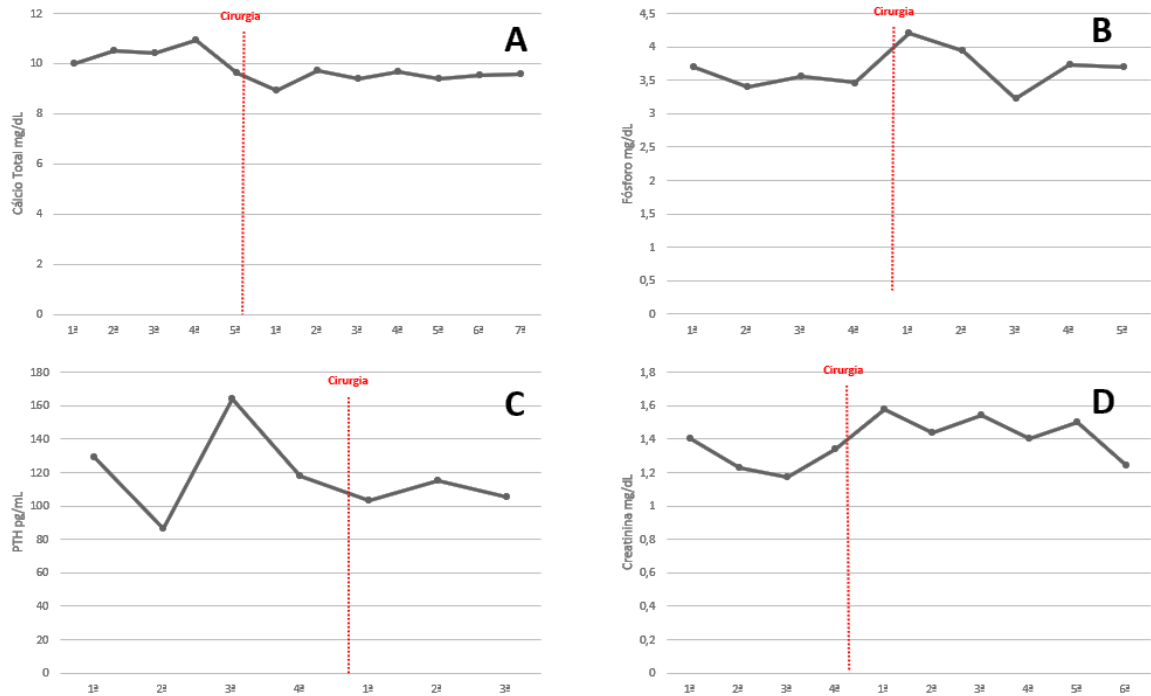


Figura 31 - Paciente 12: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório

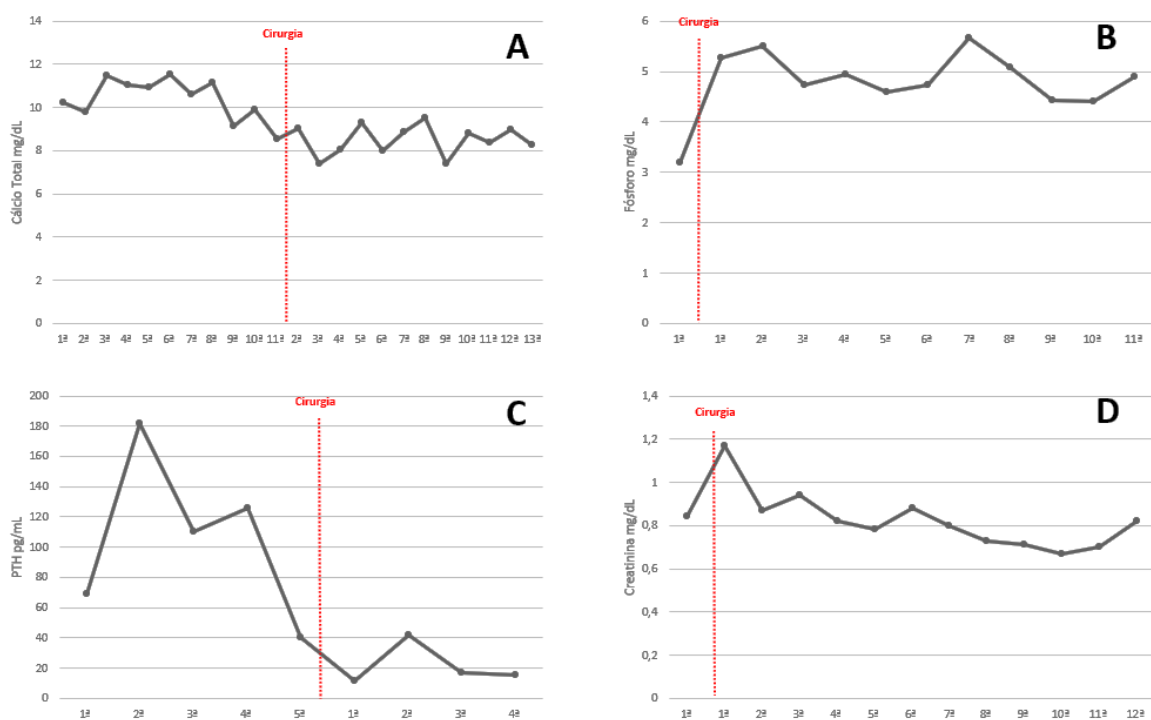


Figura 32 - Paciente 13: **(A)** Evolução da dosagem sérica de cálcio, **(B)** fósforo, **(C)** paratormônio e **(D)** creatinina no pré e pós-operatório

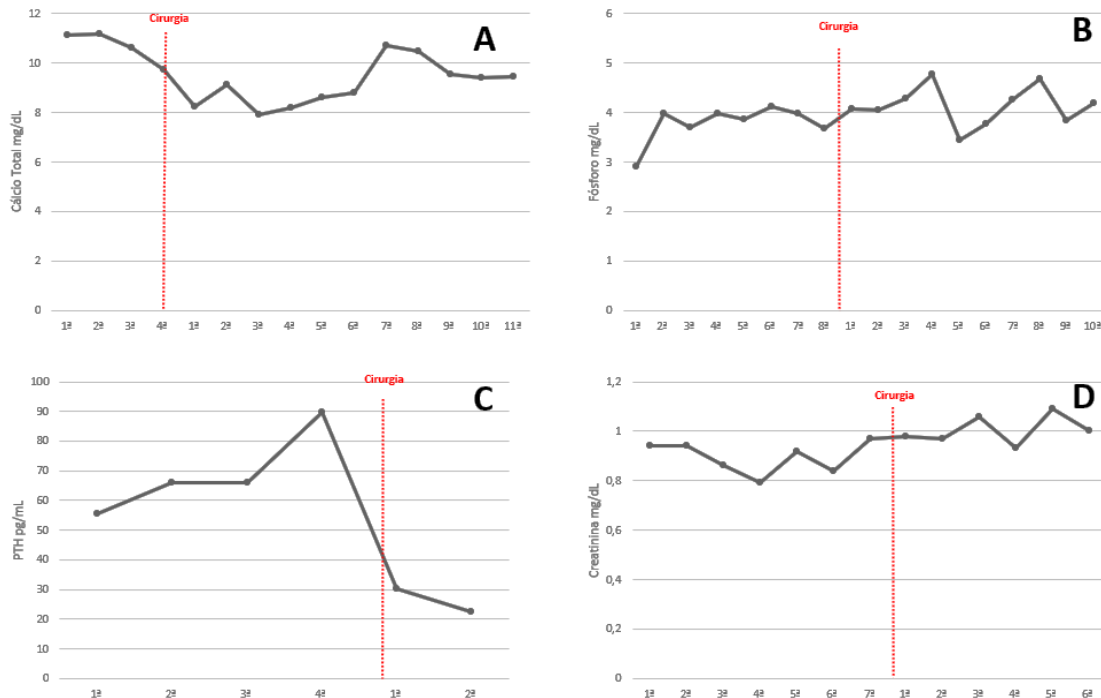


Figura 33 - Paciente 14: **(A)** Evolução da dosagem sérica de cálcio, **(B)** fósforo, **(C)** paratormônio e **(D)** creatinina no pré e pós-operatório

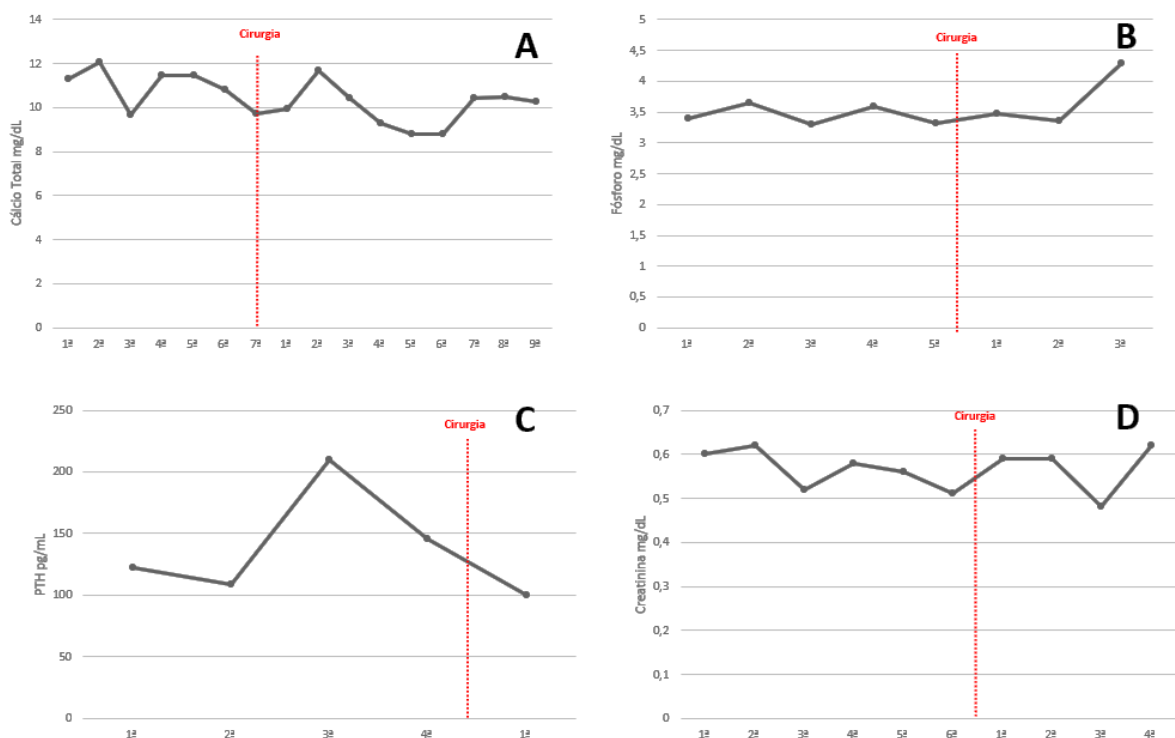


Figura 34 - Paciente 15: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório

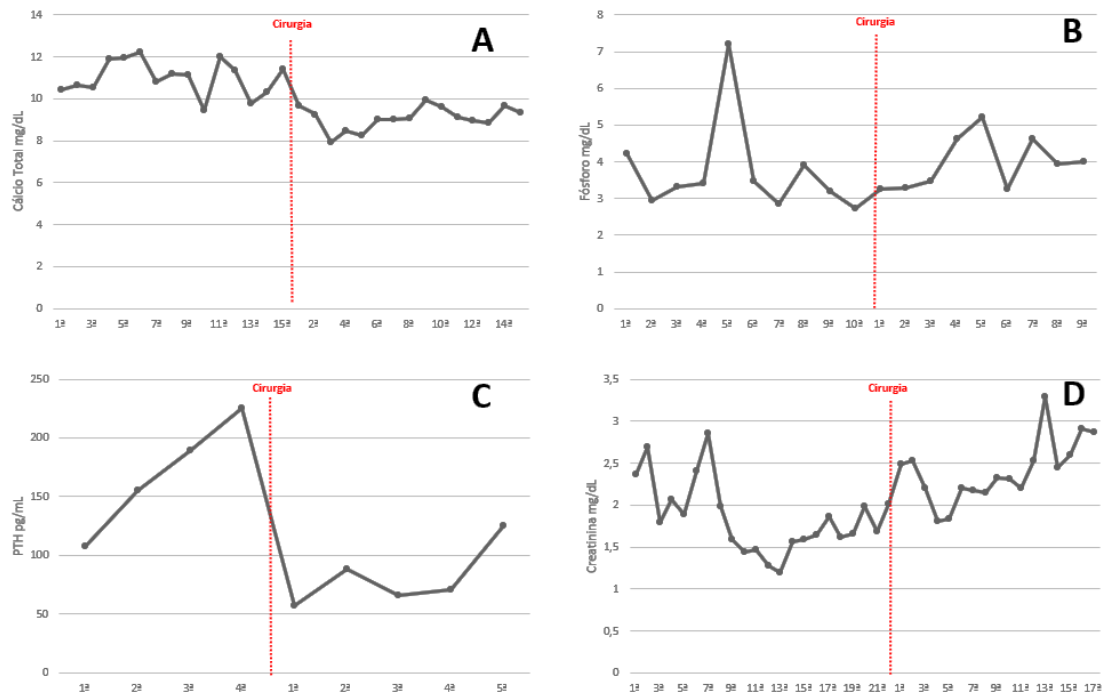


Figura 35 - Paciente 16: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório

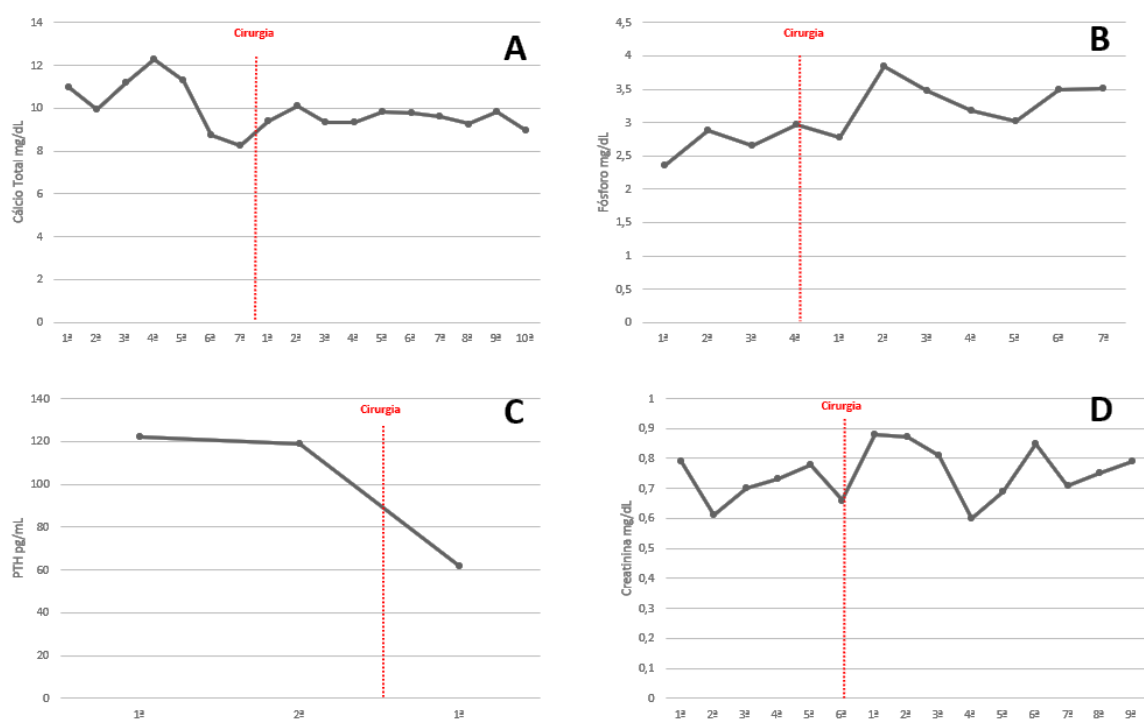


Figura 36 - Paciente 17: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório

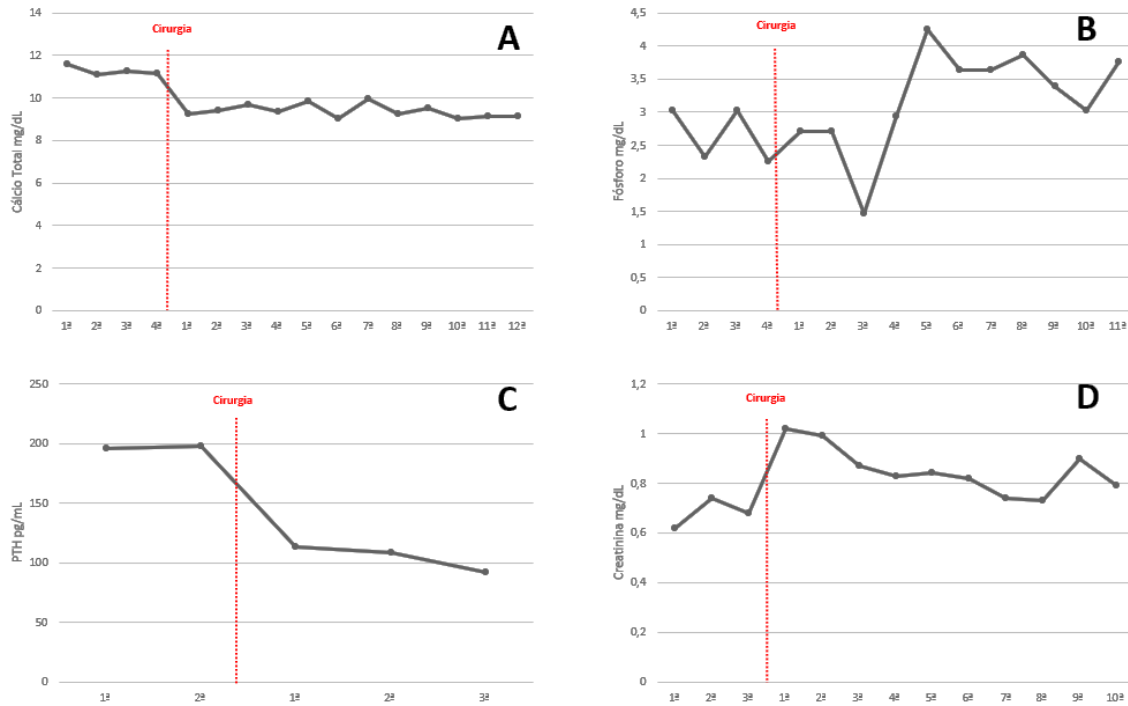


Figura 37 - Paciente 18: (A) Evolução da dosagem sérica de cálcio, (B) fósforo, (C) paratormônio e (D) creatinina no pré e pós-operatório

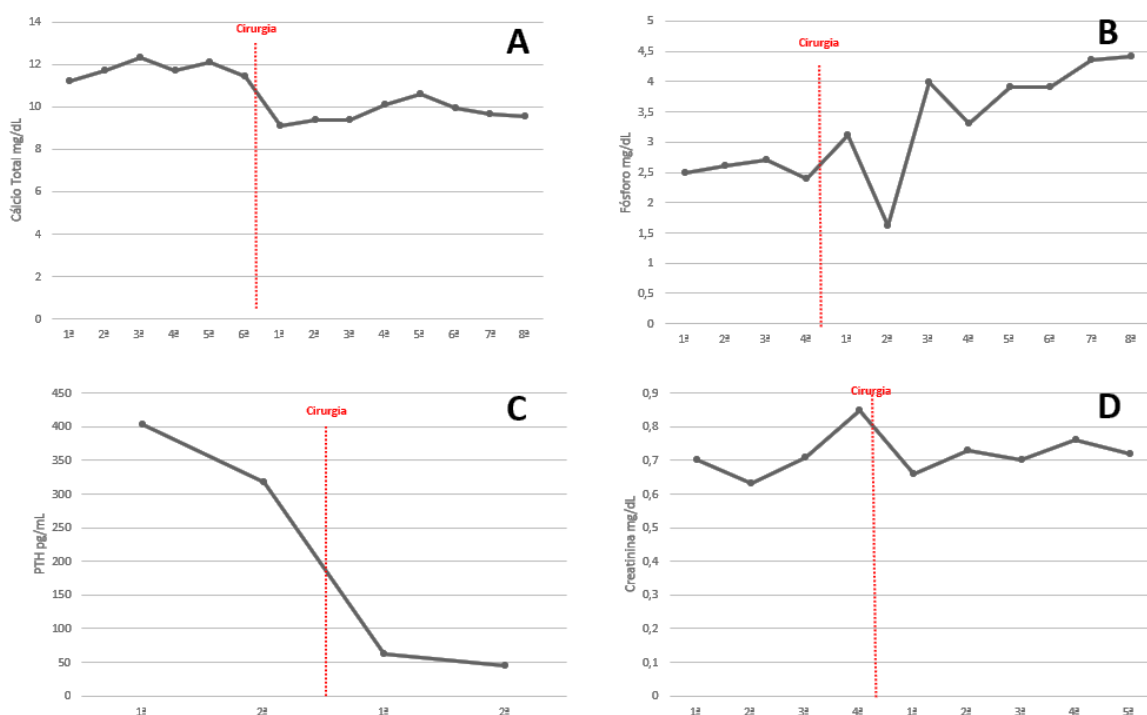
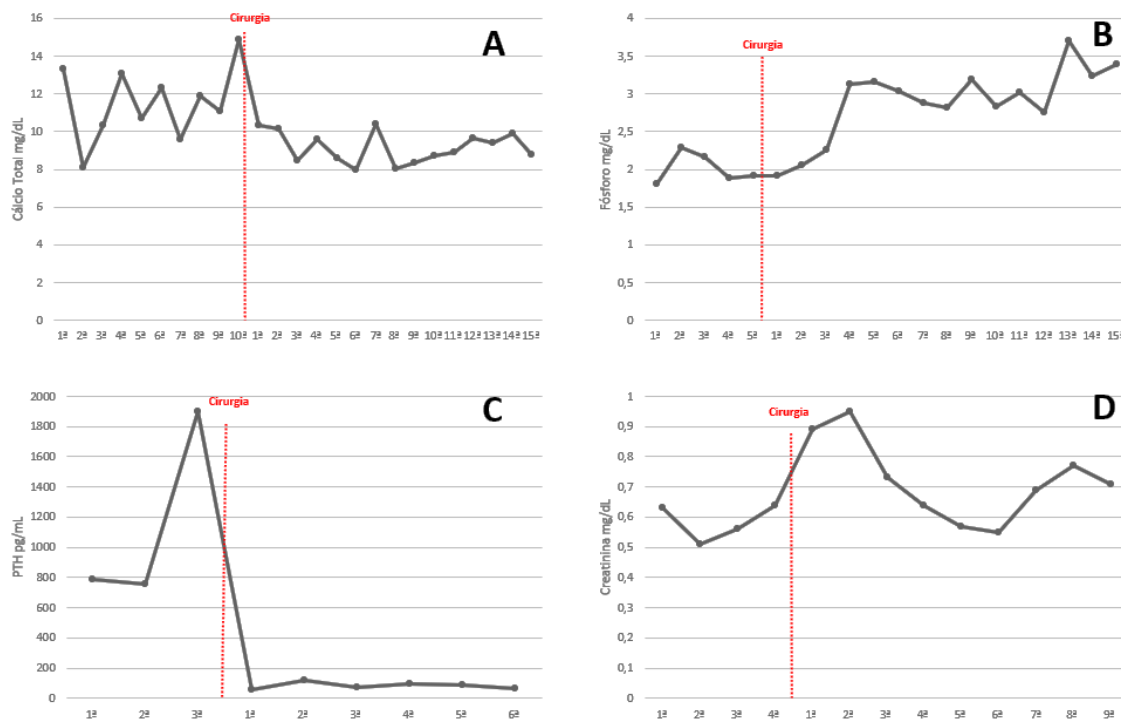


Figura 38 - Paciente 19: **(A)** Evolução da dosagem sérica de cálcio, **(B)** fósforo, **(C)** paratormônio e **(D)** creatinina no pré e pós-operatório



5.3 Histopatologia

As lâminas de todos os adenomas (Grupo Caso) e das amostras normais (Grupo Controle) foram revisadas por patologista experiente em PTs e que desconhecia os quadros clínicos dos pacientes do estudo. Nesta avaliação, todas as amostras normais (Grupo Controle) evidenciaram celularidade variada, composta de células principais e oxifílicas, além de adipócitos (estes mais evidentes nos Controles 1 e 4). Nestas lâminas não foram observadas outras particularidades. Estas imagens estão representadas nas Figuras 58 a 62, na imagem **A** de cada um dos mosaicos. Já nas amostras dos adenomas (Grupo Caso), a maioria dos casos mostrou glândulas macroscopicamente aumentadas, que à microscopia evidenciaram composição monocelular, sendo 15 de células principais, 3 de células oxifílicas e 1 misto, com raras células claras e adipócitos. Neste grupo, foram notadas particularidades em alguns dos casos:

- Caso 01 apresentou grande quantidade de células claras, que pode ser evidenciada pela grande quantidade de glicogênio no interior de seu citoplasma, conforme imagem **A** do mosaico da Figura 39.
- Caso 02 chamou atenção pela elevada celularidade com predomínio de células principais, conforme imagem **A** do mosaico da Figura 40.
- Caso 08 apresentou um adenoma “misto”, com marcada divisão de células principais e oxifílicas, que pode ser notada na imagem **A** do mosaico da Figura 46.
- Caso 11 apresentou septos mais grosseiros e imagens de crescimento trabecular, achado compatível com adenoma atípico. Esta lâmina está ilustrada na imagem **A** do mosaico da Figura 49.
- Casos 12, 16 e 18 com predomínio de células oxifílicas, citoplasma amplo, granular, rico e eosinofílico. Estas lâminas estão ilustradas nas imagens **A** do mosaico das Figuras 50, 54 e 56, respectivamente.
- Caso 17 mostrou um adenoma com presença marcadamente maior de adipócitos, que pode ser notada na imagem **A** do mosaico da Figura 55.
- Caso 19 evidenciou núcleos grandes e irregulares com presença de nucléolos, que podem ser notados na imagem **A** do mosaico da Figura 57.

5.4 Imunofluorescência

Os resultados das análises das lâminas de imunofluorescência com os dados referentes às marcações DAPI, FITC e de relação FITC/DAPI das amostras de adenoma (Grupo Caso) e das amostras normais (Grupo Controle) estão listados na Tabela 4. Foi possível notar que nos casos dos adenomas a quantidade de núcleos celulares marcados (DAPI) foi em média de $257,7 \pm 104,3$ enquanto nas amostras normais foi de $276,0 \pm 136,7$. Já para as marcações das H3K27 acetiladas (FITC), a média de núcleos marcados nos adenomas foi de $41,1 \pm 38,6$ frente aos $13,4 \pm 15$ núcleos marcados nas amostras normais. A diferença mais marcante foi na relação FITC/DAPI, sendo nos adenomas de $0,21 \pm 0,24$, frente aos controles de $0,06 \pm 0,07$. Considerando-se os valores da relação FITC/DAPI no grupo Caso, foi possível

classificar o perfil de marcação dos adenomas, sendo que em 50% dos casos não se observou acetilação da histona H3K27, em 25% esta marcação foi muito discreta e nos 25% restantes, a marcação foi expressiva.

Tabela 4 - Marcações DAPI, FITC e de relação FITC/DAPI das amostras de adenoma (Grupo Caso) e amostras normais (Grupo Controle)

| Grupo Caso | | | |
|-----------------------|---------------|--------------|------------------|
| | DAPI | FITC | FITC/DAPI |
| Caso 01 | 259 | 55 | 0,2123552 |
| Caso 02 | 352 | 1 | 0,0028409 |
| Caso 03 | 116 | 100 | 0,8620690 |
| Caso 04 | 285 | 1 | 0,0035088 |
| Caso 05 | 246 | 39 | 0,1585366 |
| Caso 06 | 439 | 75 | 0,1708428 |
| Caso 07 | 323 | 5 | 0,0154799 |
| Caso 08 | 242 | 46 | 0,1900826 |
| Caso 09 | 115 | 78 | 0,6782609 |
| Caso 10 | 454 | 80 | 0,1762115 |
| Caso 11 | 80 | 23 | 0,2875000 |
| Caso 12 | 171 | 1 | 0,0058480 |
| Caso 13 | 391 | 1 | 0,0025575 |
| Caso 14 | 304 | 1 | 0,0032895 |
| Caso 15 | 284 | 97 | 0,3415493 |
| Caso 16 | 143 | 1 | 0,0069930 |
| Caso 17 | 170 | 97 | 0,5705882 |
| Caso 18 | 271 | 1 | 0,0036900 |
| Caso 19 | 253 | 80 | 0,3162055 |
| MÉDIA | 257,78 | 41,15 | 0,21 |
| DESVIO PADRÃO | 104,34 | 38,63 | 0,24 |
| Grupo Controle | | | |
| Controle 01 | 93 | 4 | 0,0430108 |
| Controle 02 | 203 | 39 | 0,1921182 |
| Controle 03 | 391 | 1 | 0,0025575 |
| Controle 04 | 221 | 22 | 0,0995475 |
| Controle 05 | 472 | 1 | 0,0021186 |
| MÉDIA | 276,0 | 13,40 | 0,06 |
| DESVIO PADRÃO | 136,73 | 15,0 | 0,07 |

FITC: Isotiocianato de fluoresceína, **DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenil-indol.

As imagens resultantes das análises das lâminas de todos os casos e controles estão demonstradas de maneira individualizada nas Figuras 39 a 62.

Figura 39 - Paciente 01: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação dos núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), mostrando células com marcação H3K27ac (verde). **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul

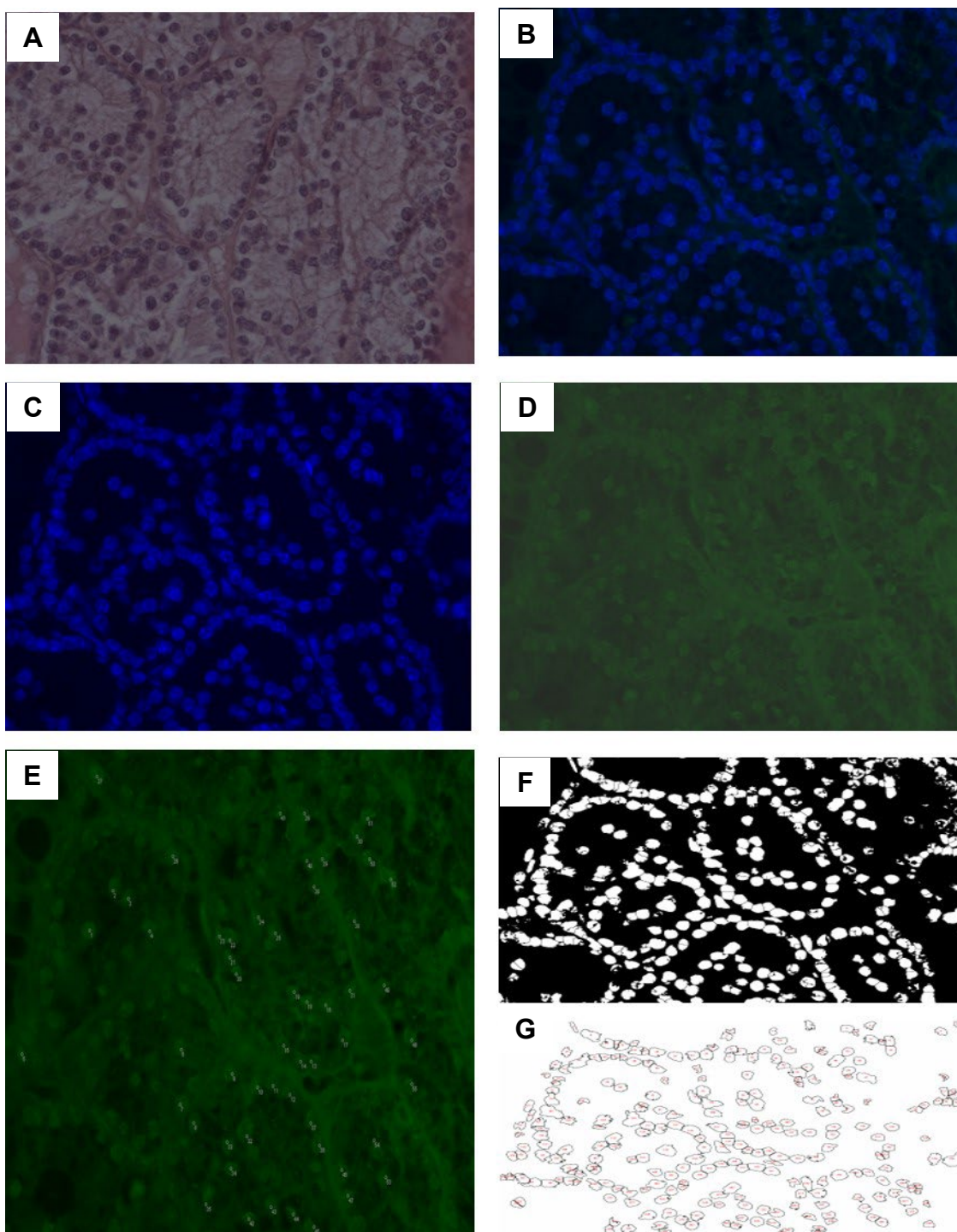


Figura 40 - Paciente 02: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem automatizada das células marcadas em azul (Image J): **(E)** Separação. **(F)** Contagem

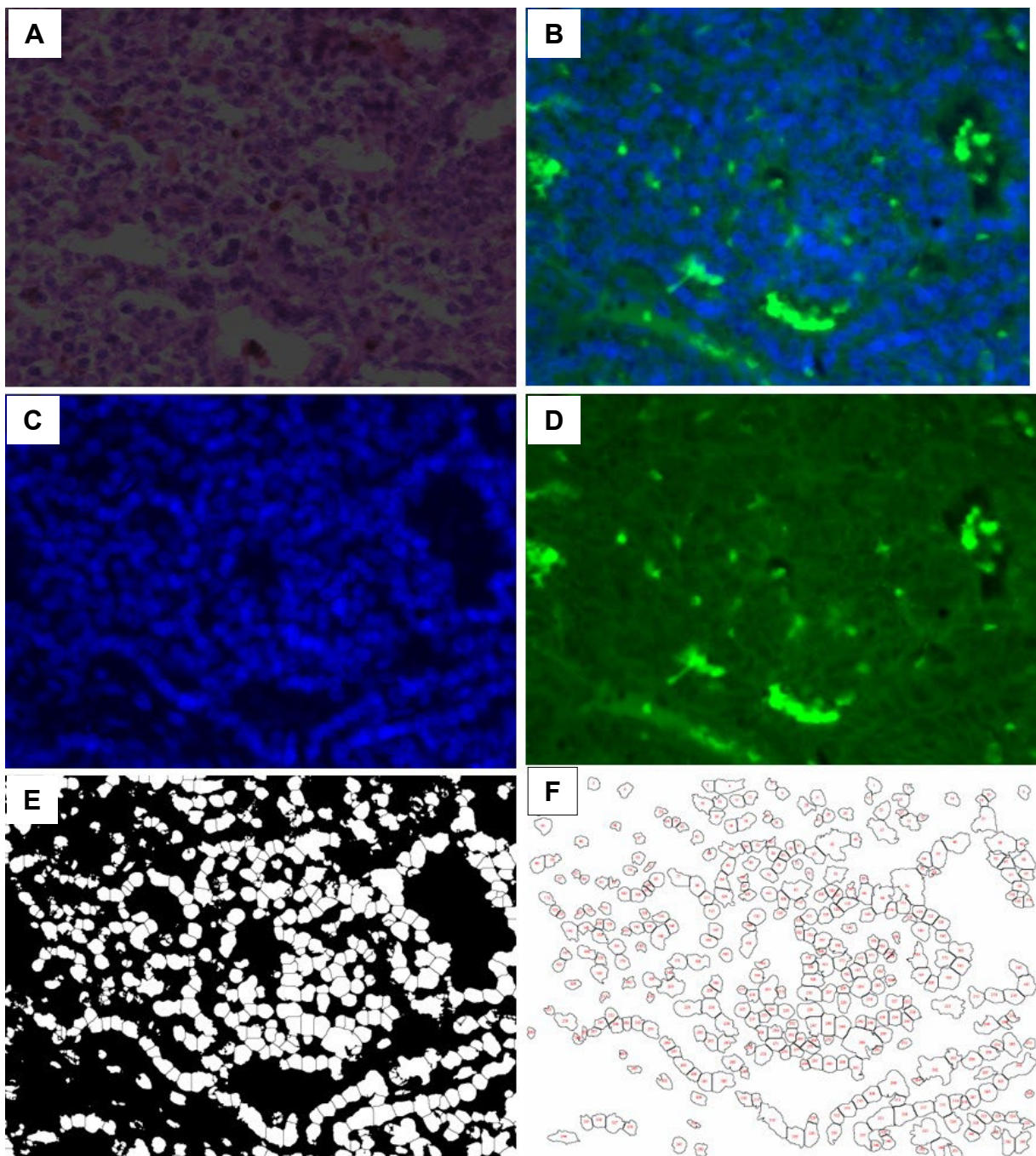


Figura 41 - Paciente 03: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional mostrando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) revelando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul

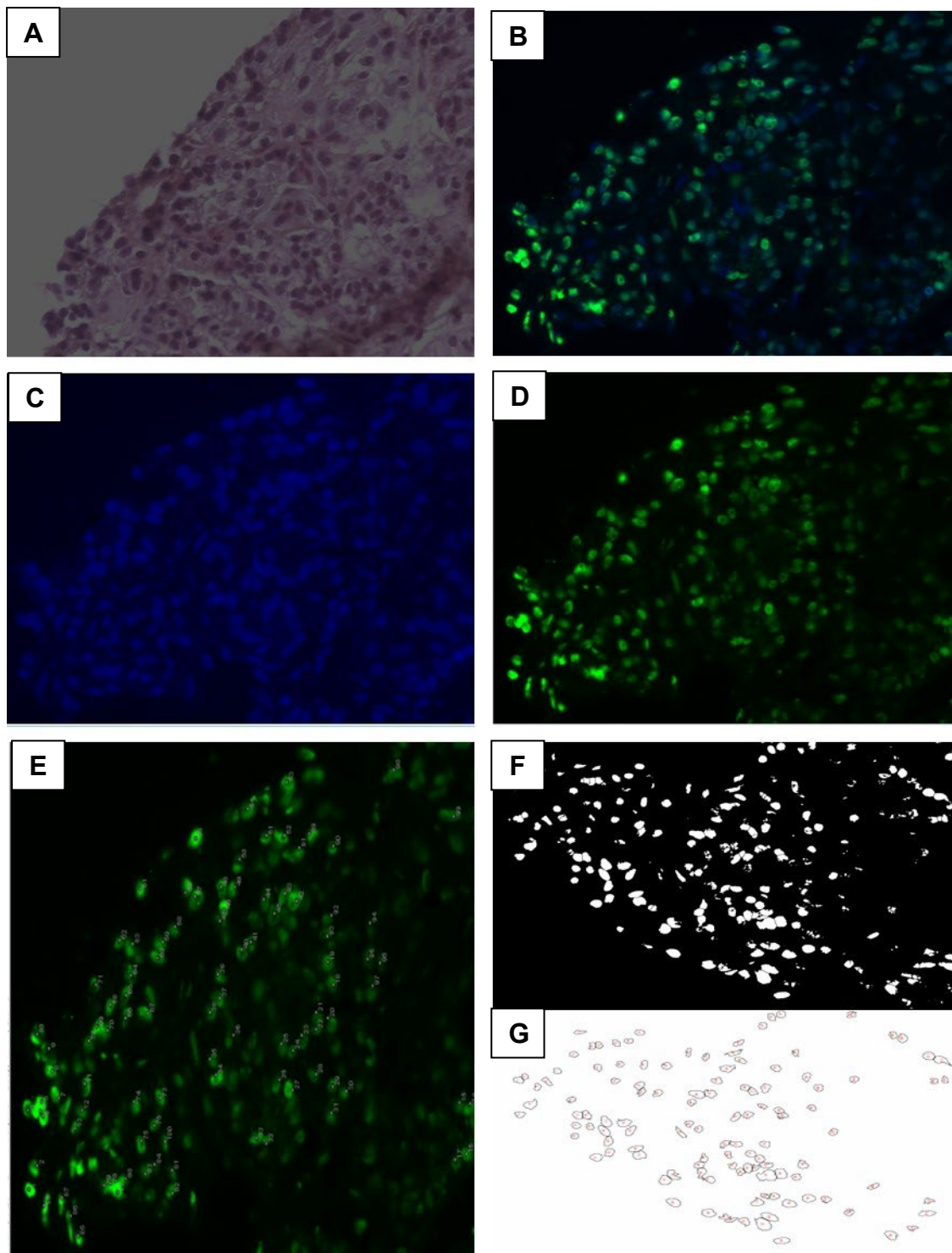


Figura 42 - Paciente 04: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), mostrando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J). **(E)** Separação. **(F)** Contagem

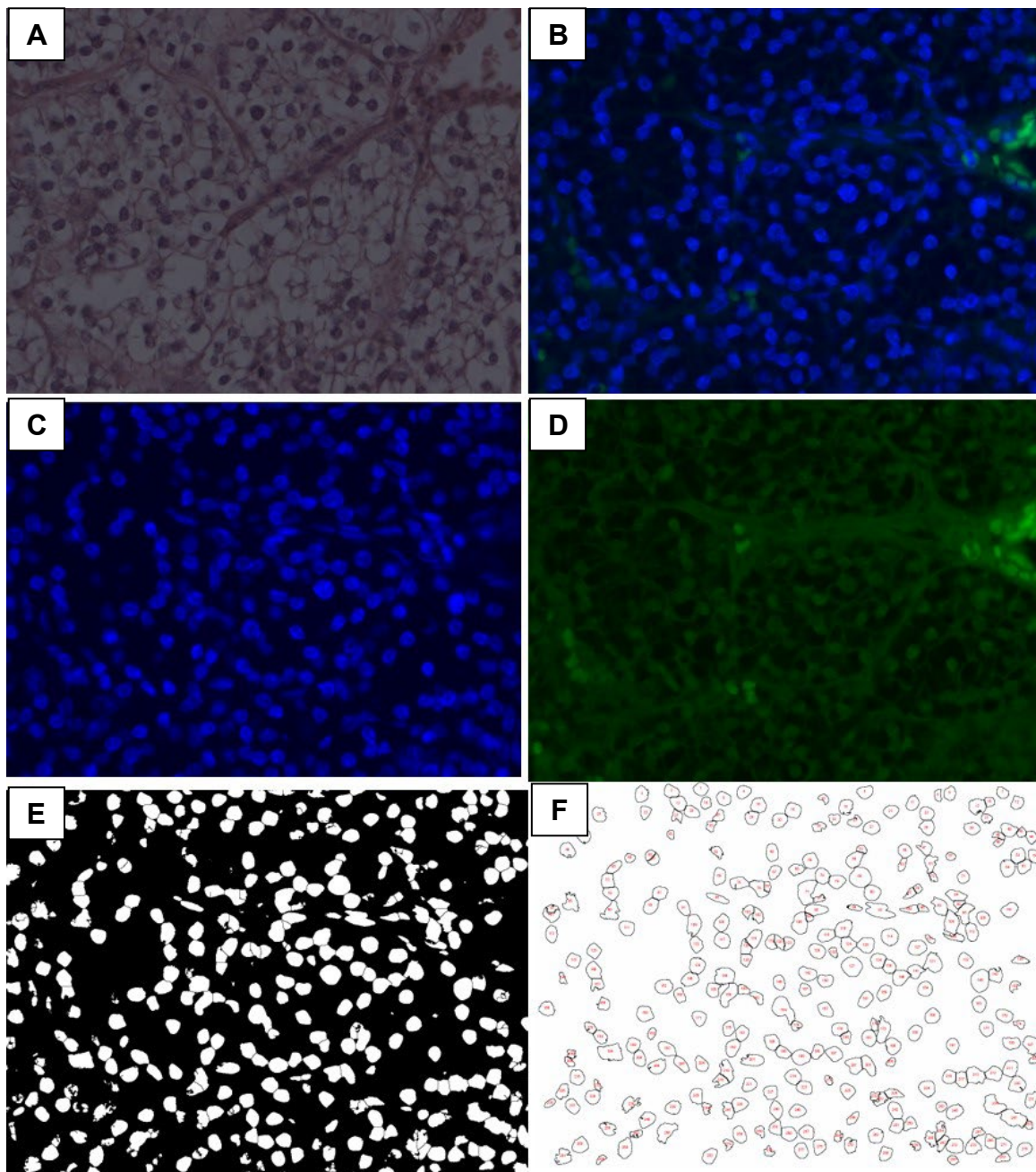


Figura 43 - Paciente 05: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional mostrando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul

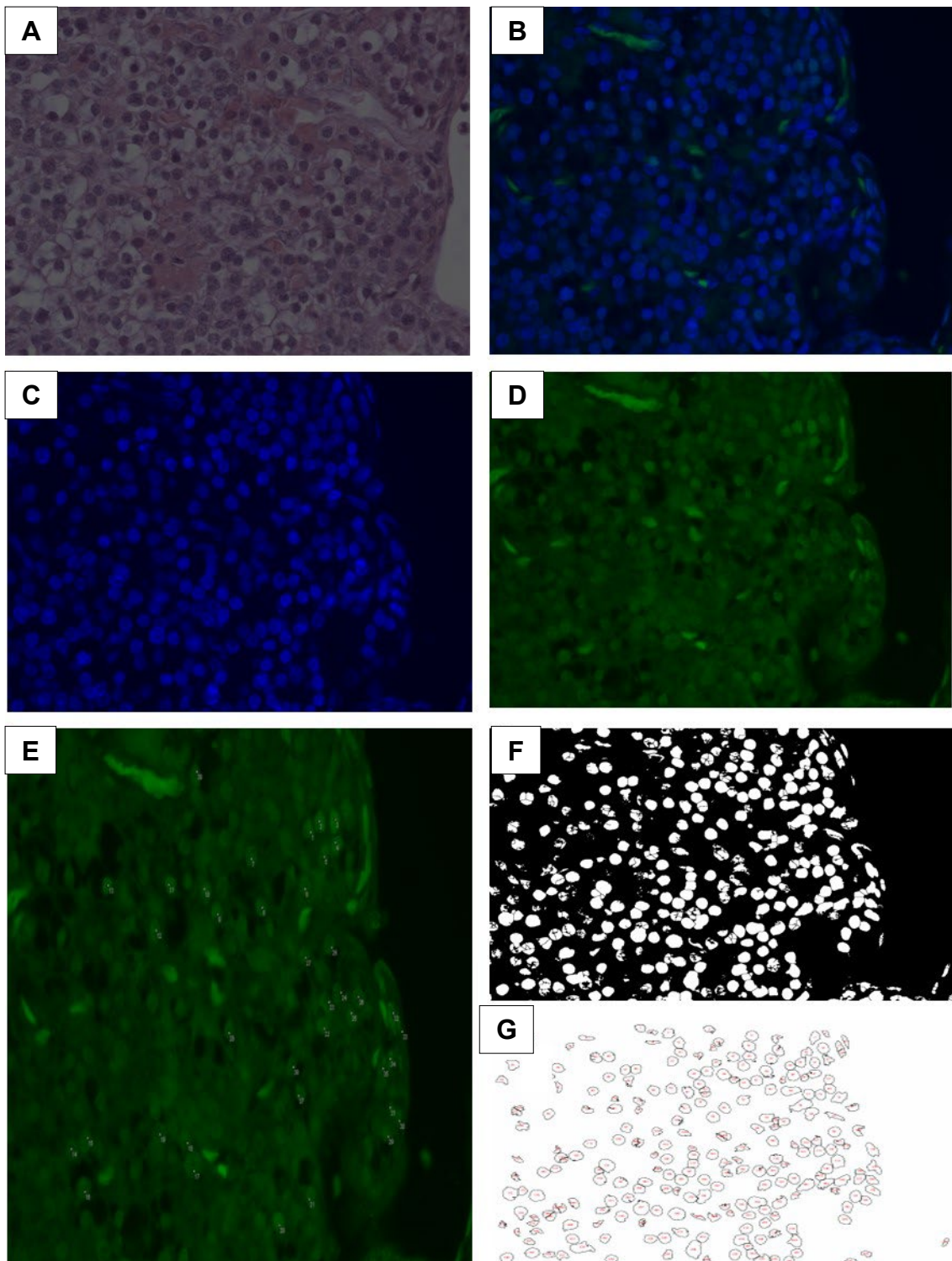


Figura 44 - Paciente 06: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional mostrando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) demonstrando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul

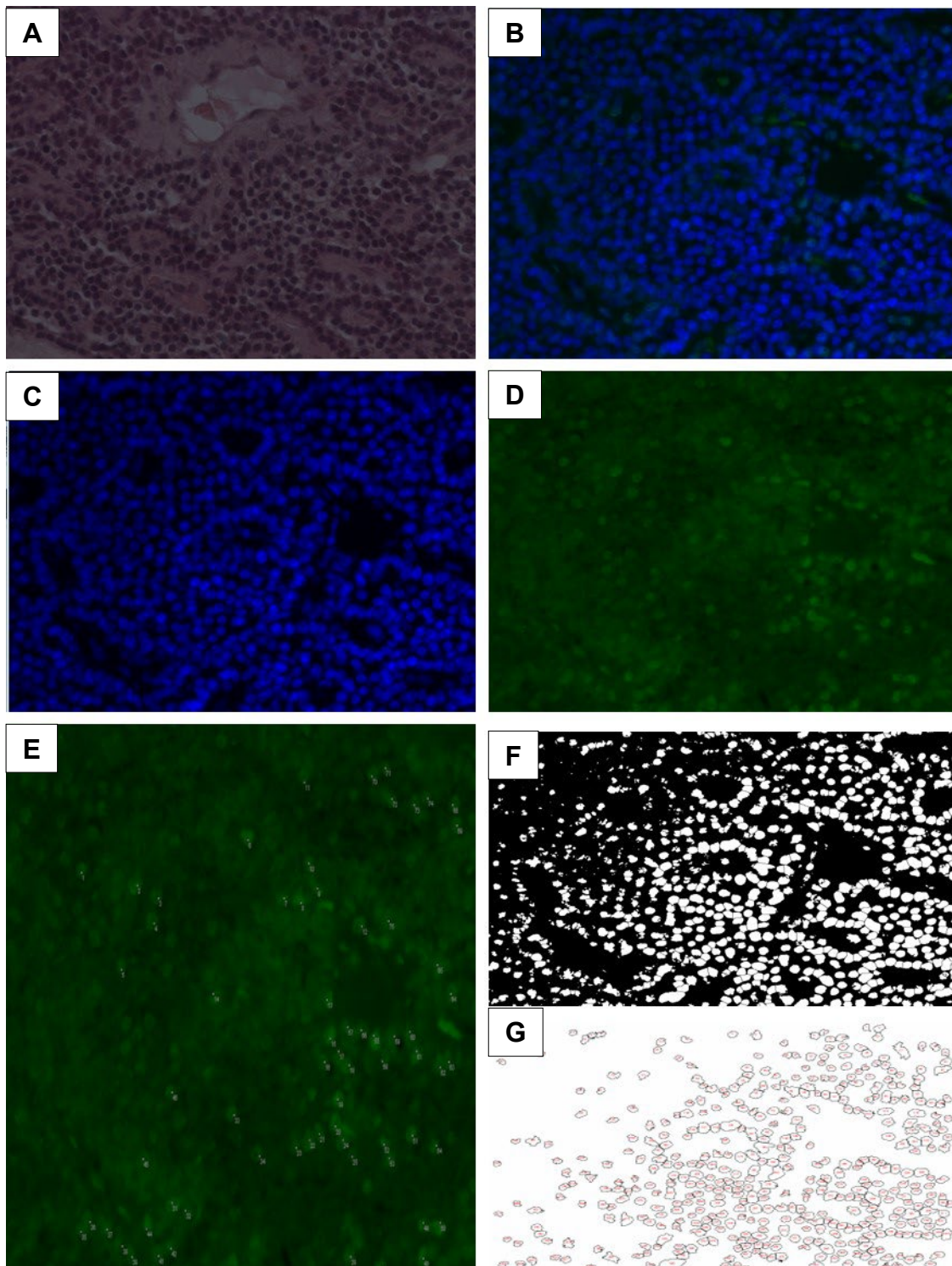


Figura 45 - Paciente 07: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), mostrando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) demonstrando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul

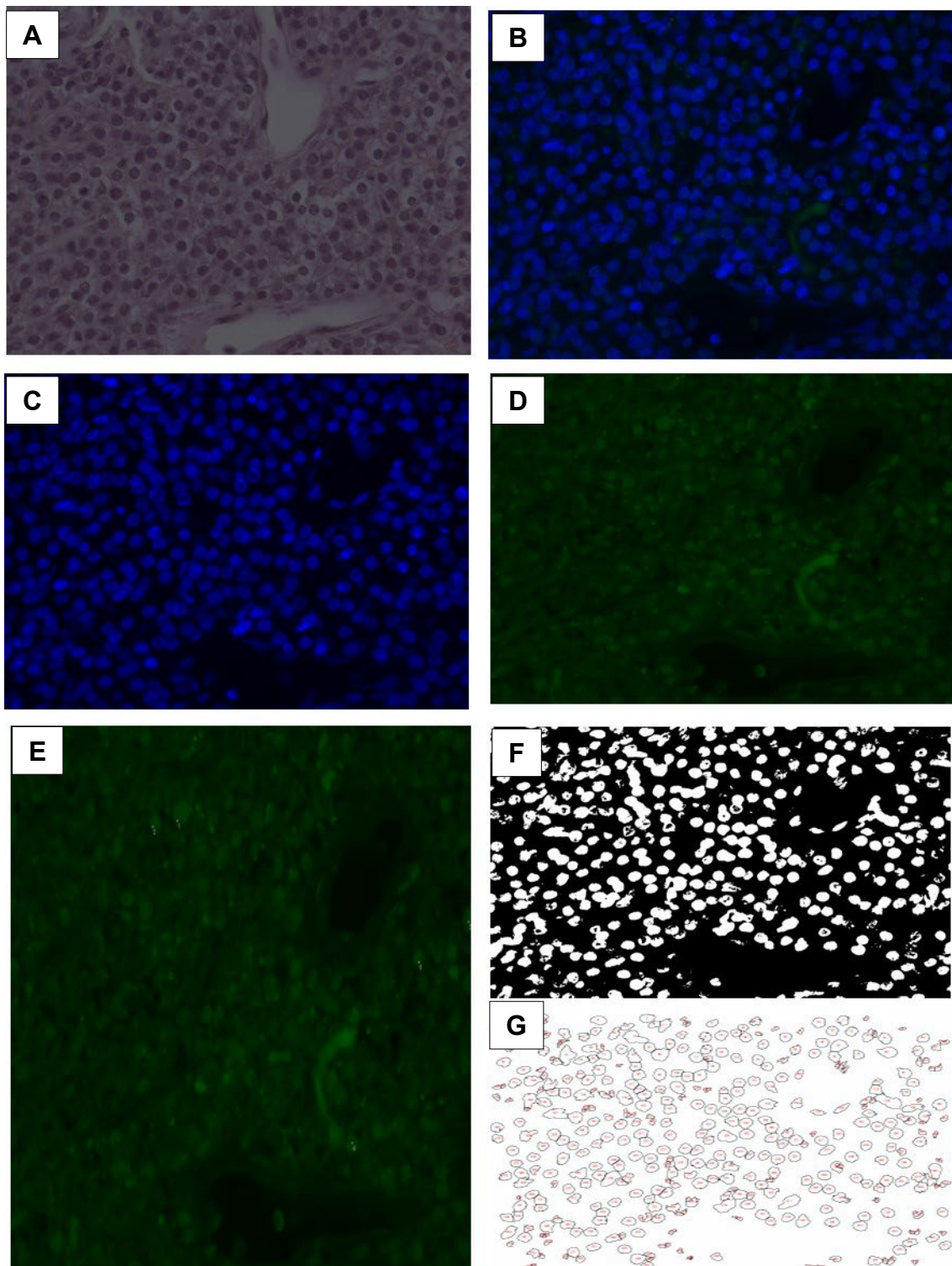


Figura 46 - Paciente 08: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul

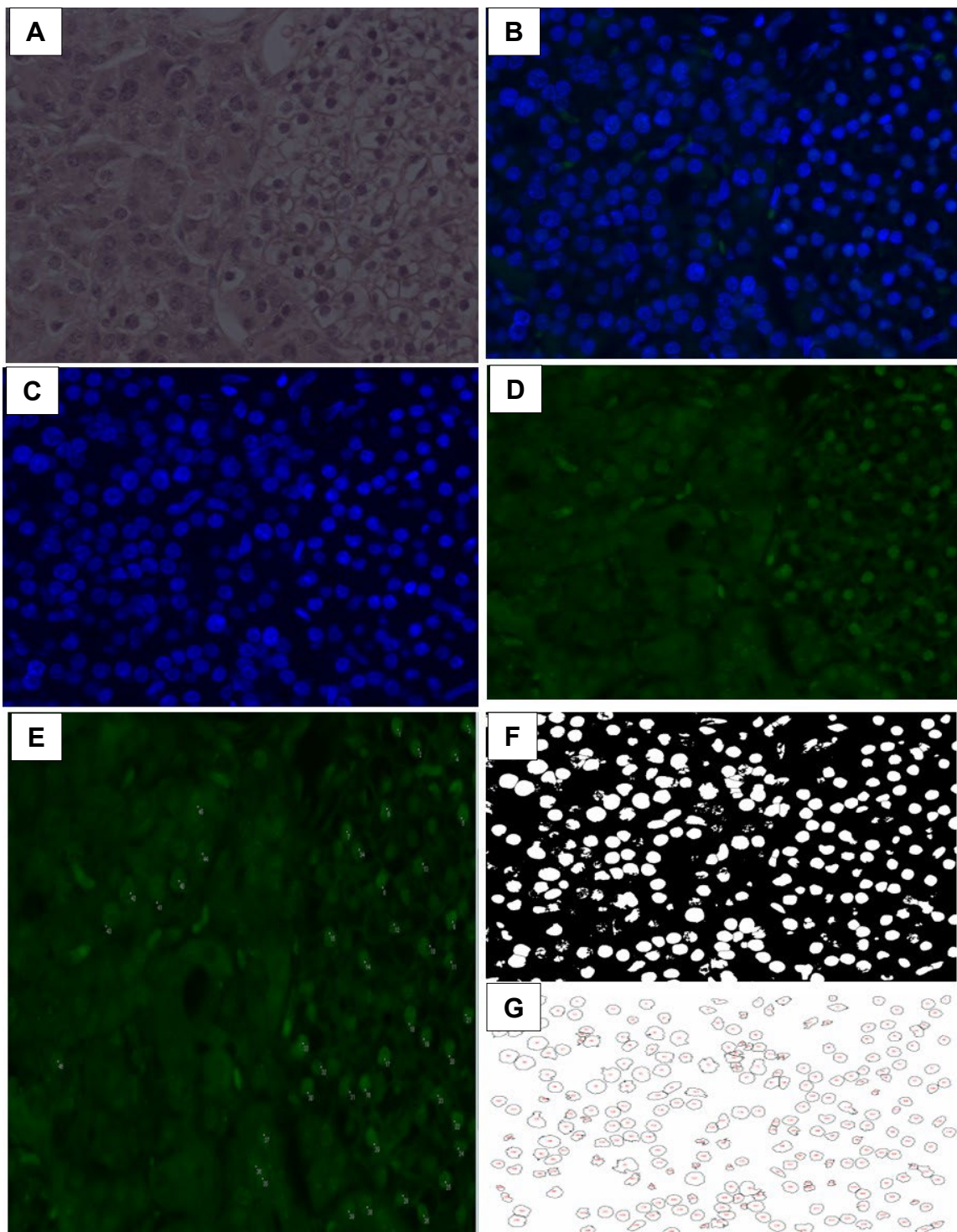


Figura 47 - Paciente 09: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul

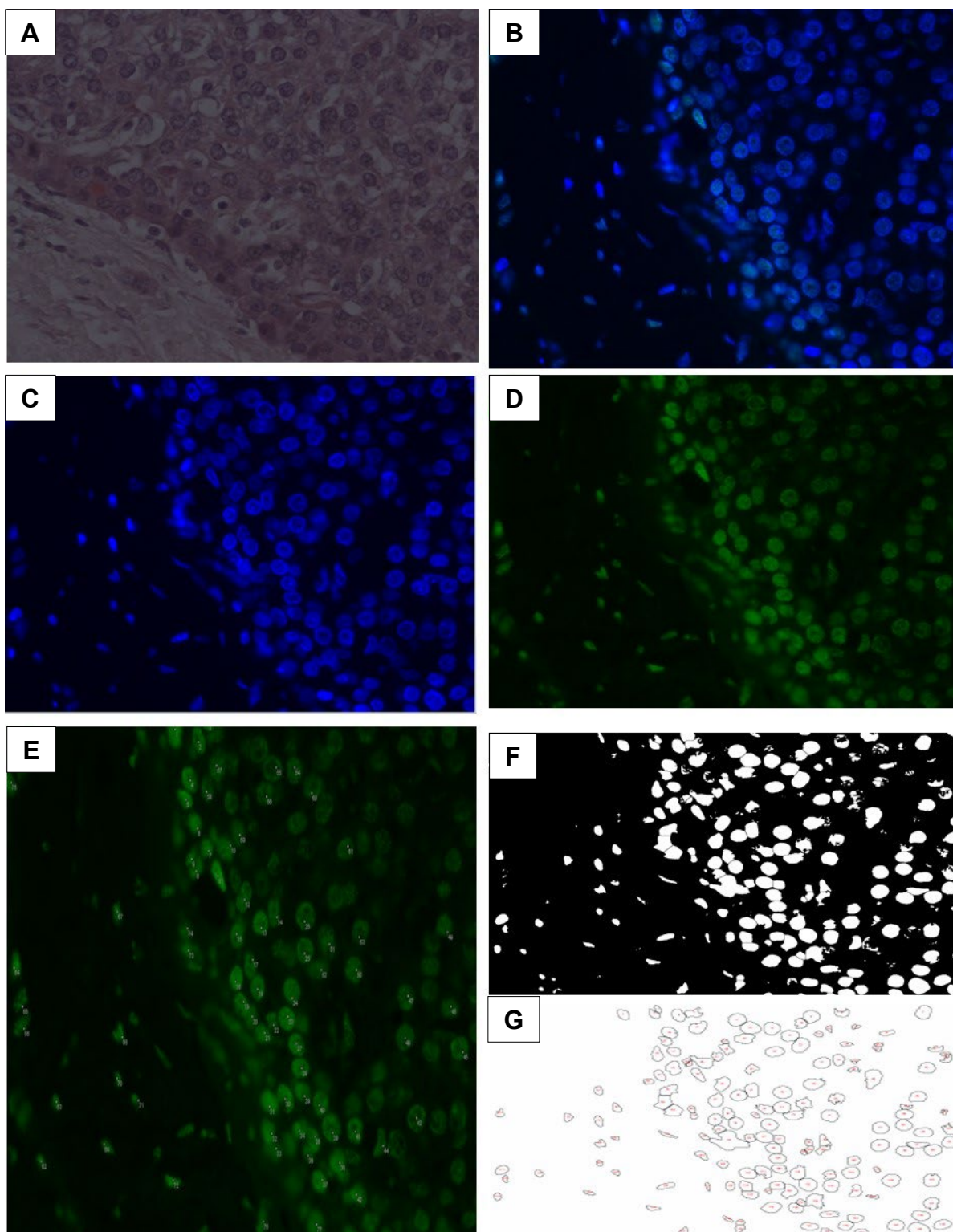


Figura 48 - Paciente 10: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul

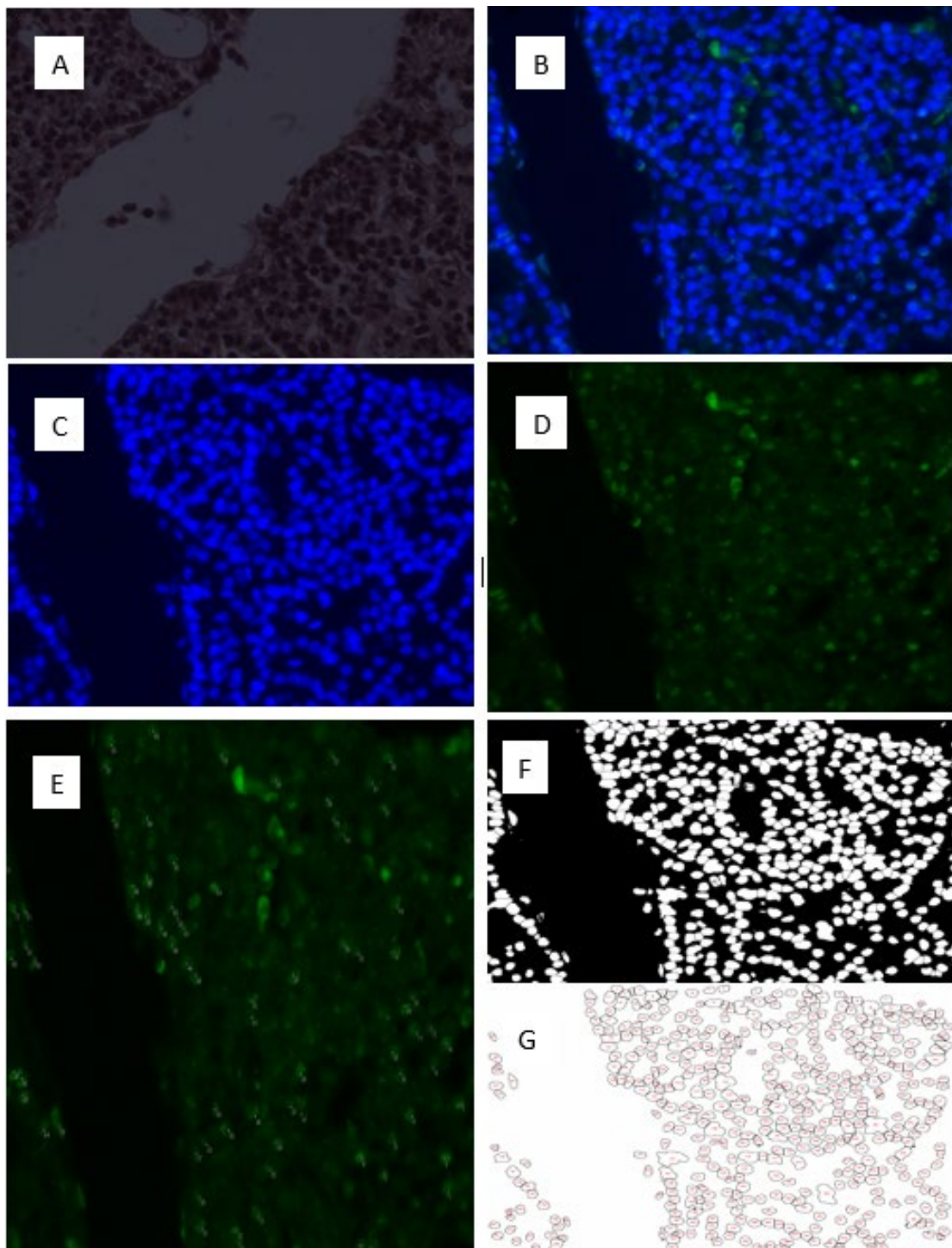


Figura 49 - Paciente 11: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul

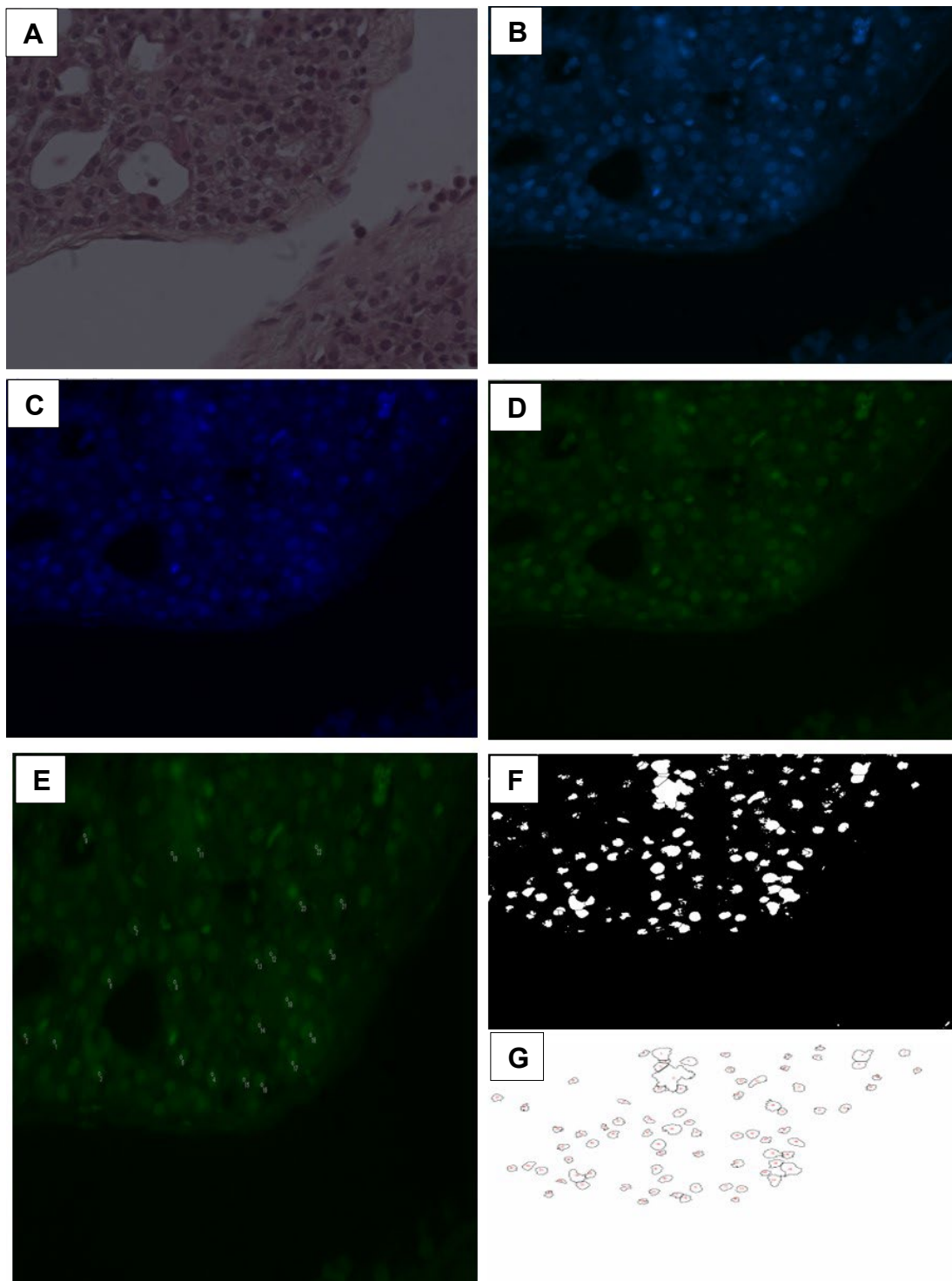


Figura 50 - Paciente 12: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Separação. **(F)** Contagem

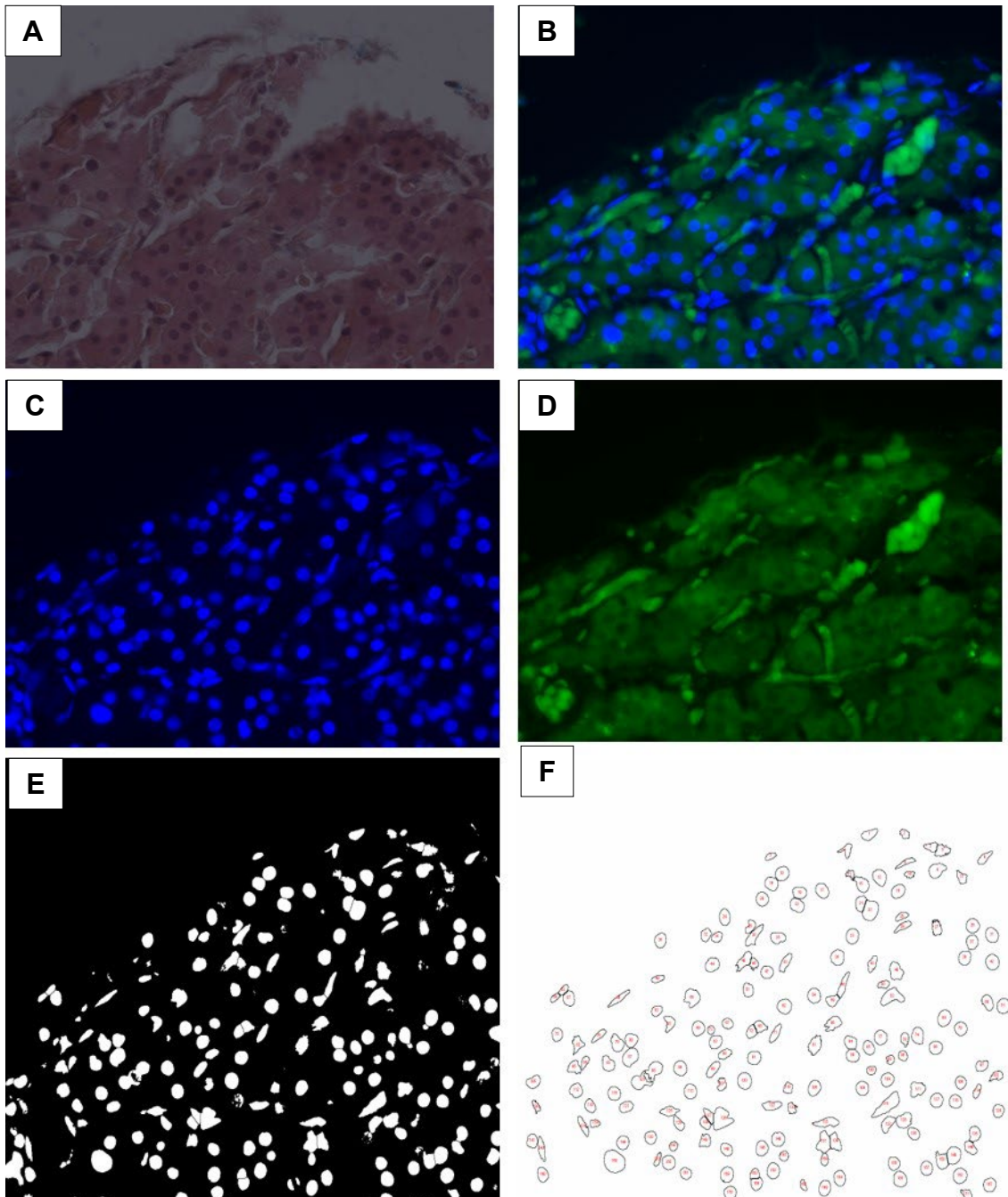


Figura 51 - Paciente 13: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Separação. **(F)** Contagem

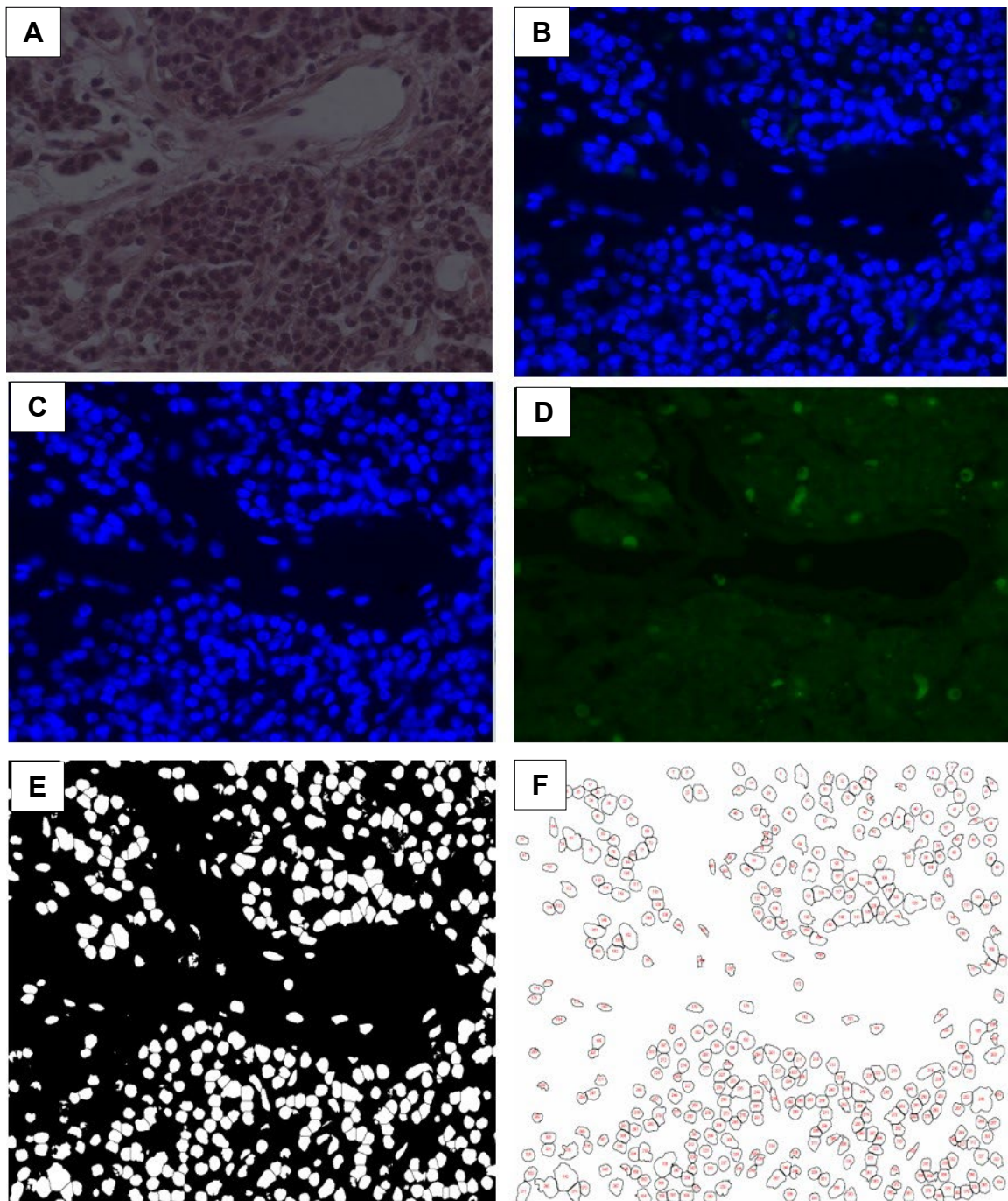


Figura 52 - Paciente 14: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Separação. **(F)** Contagem.

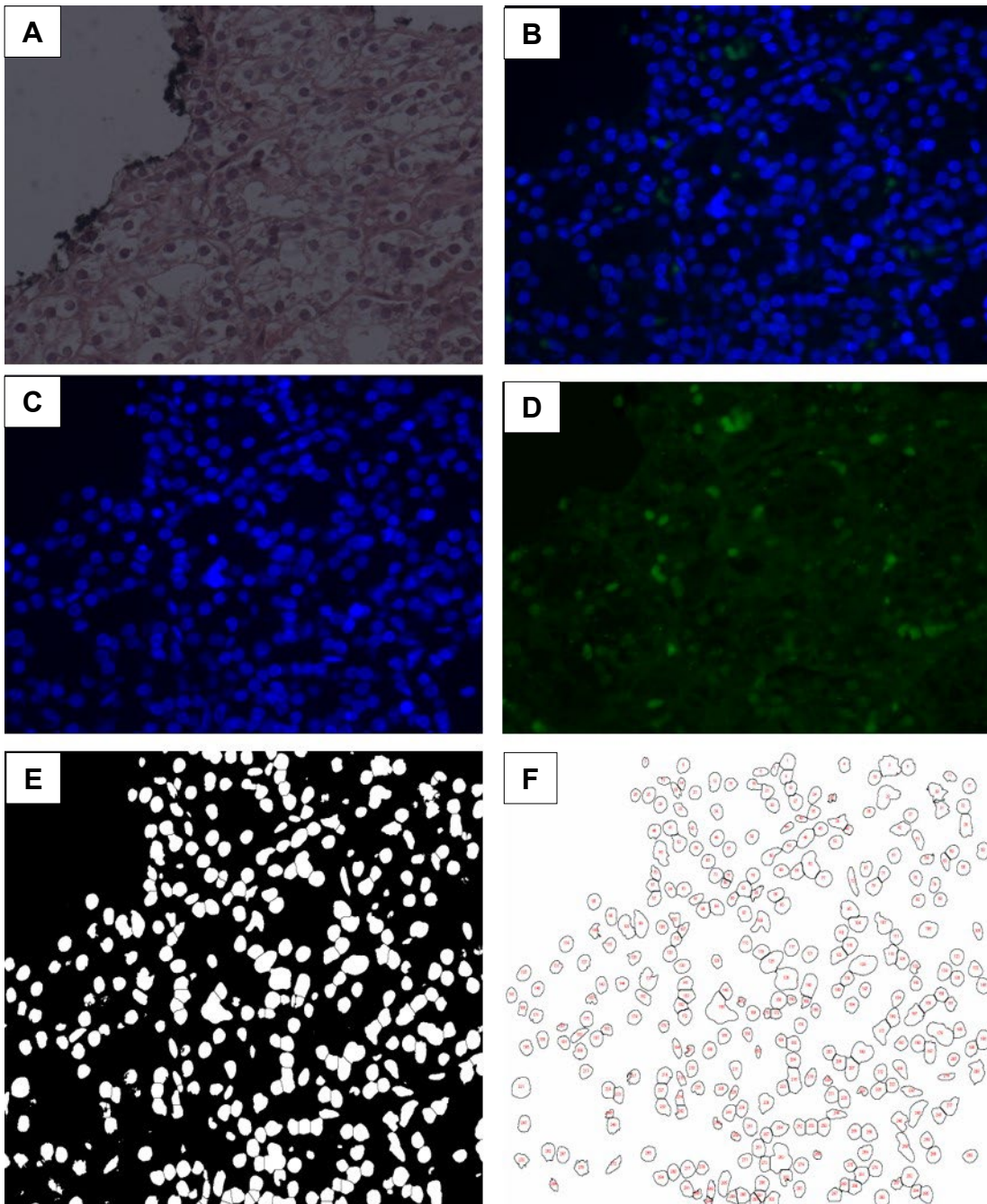


Figura 53 - Paciente 15: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul

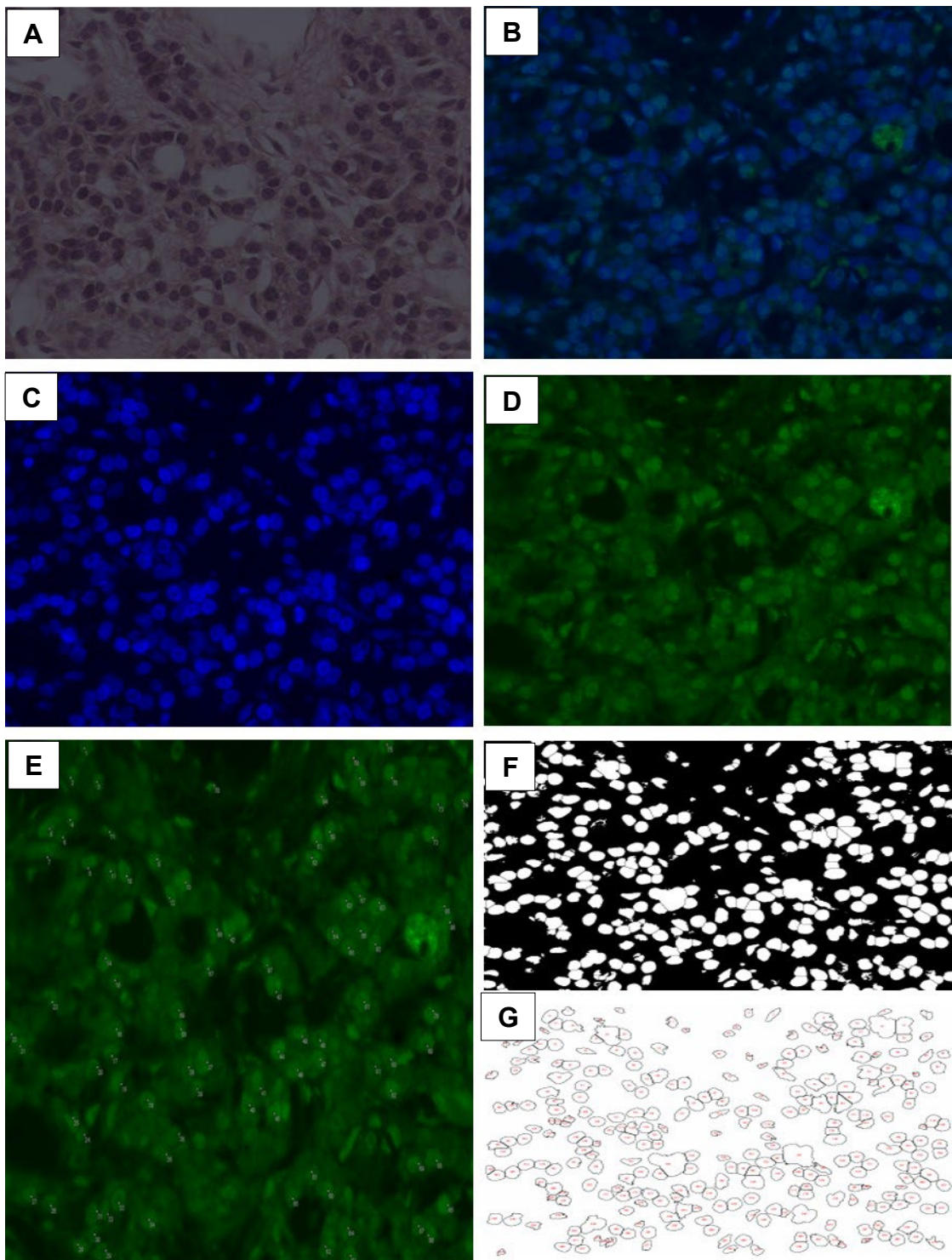


Figura 54 - Paciente 16: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Separação. **(F)** Contagem

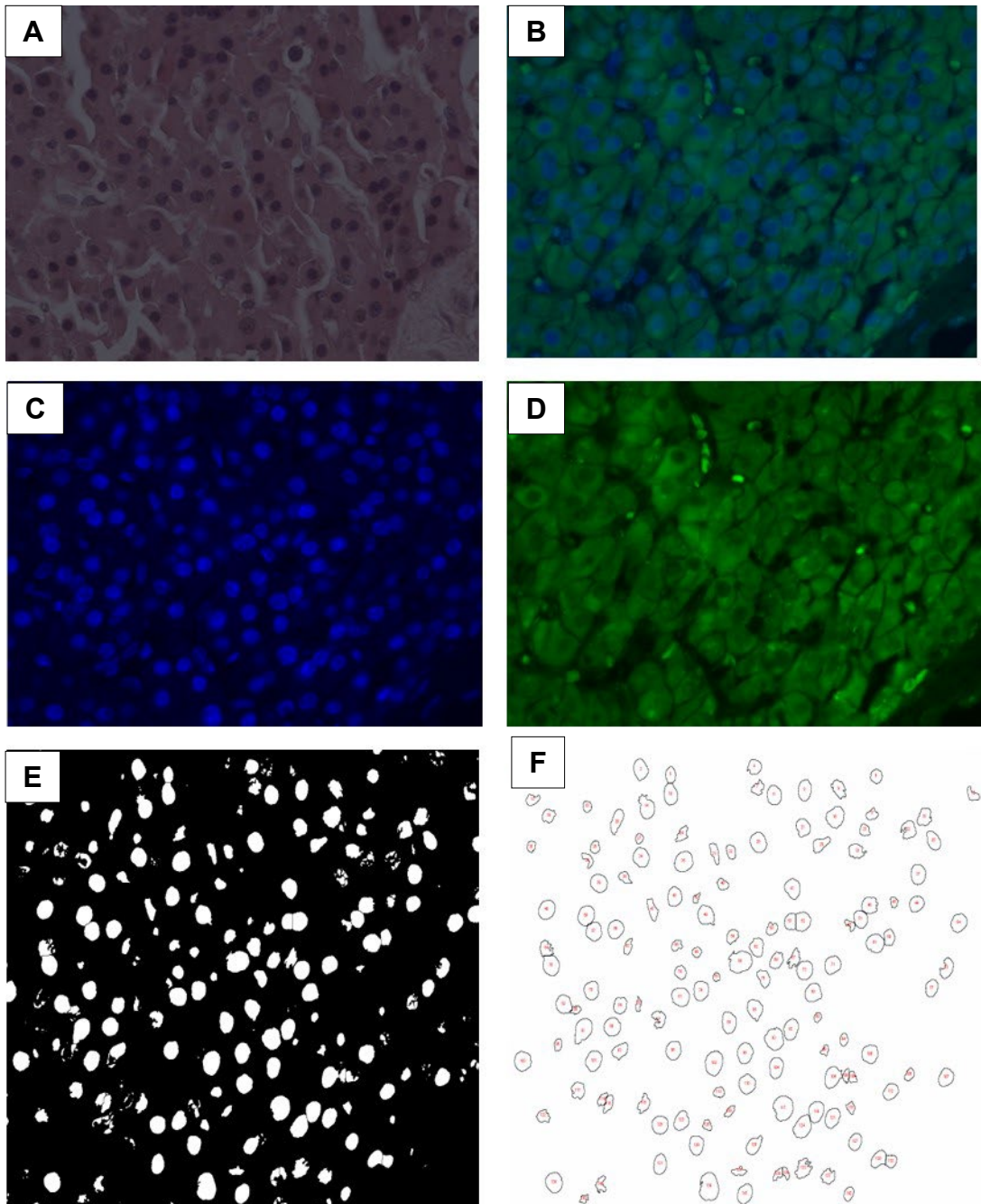


Figura 55 - Paciente 17: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul

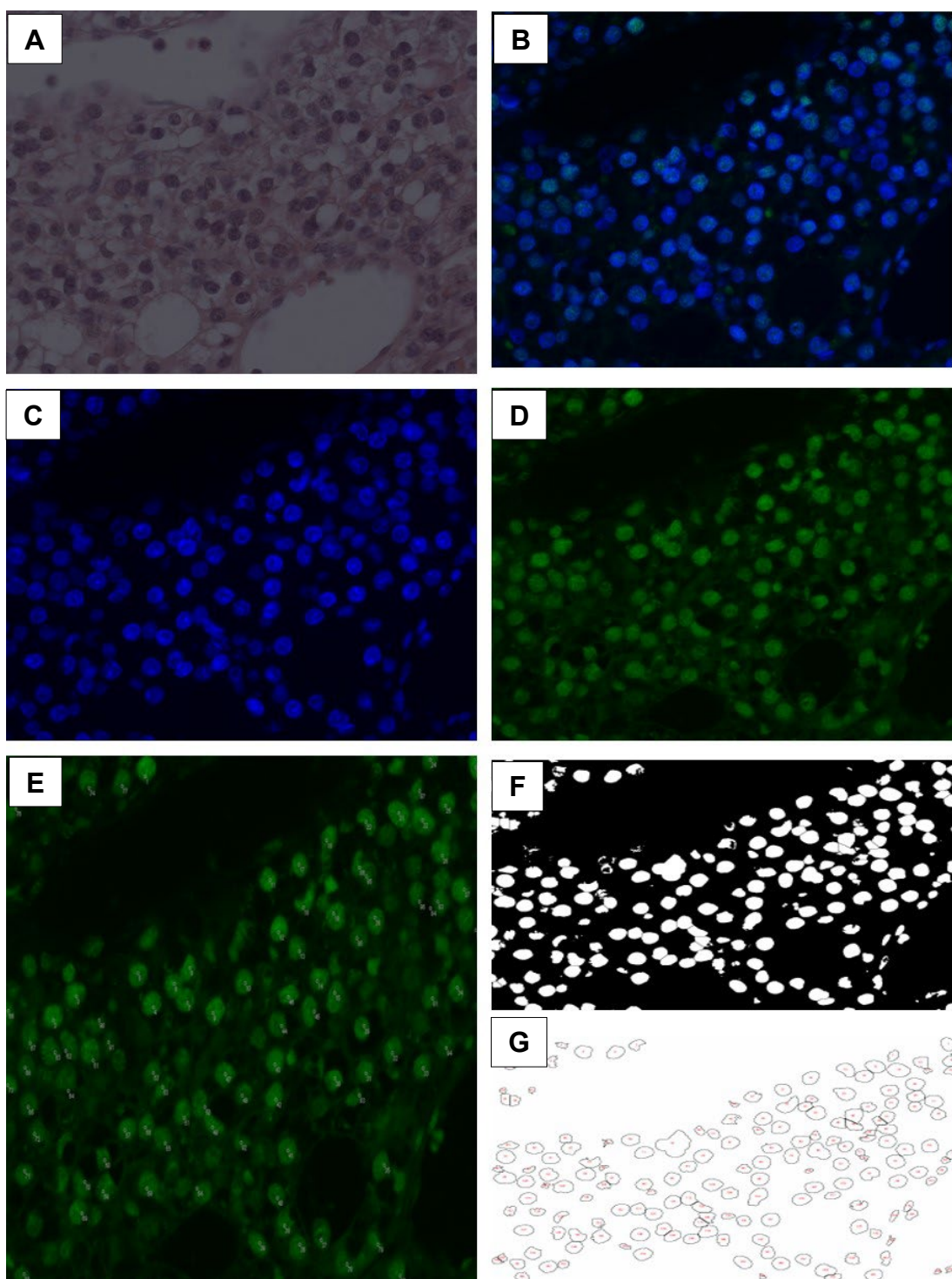


Figura 56 - Paciente 18: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Separação. **(F)** Contagem

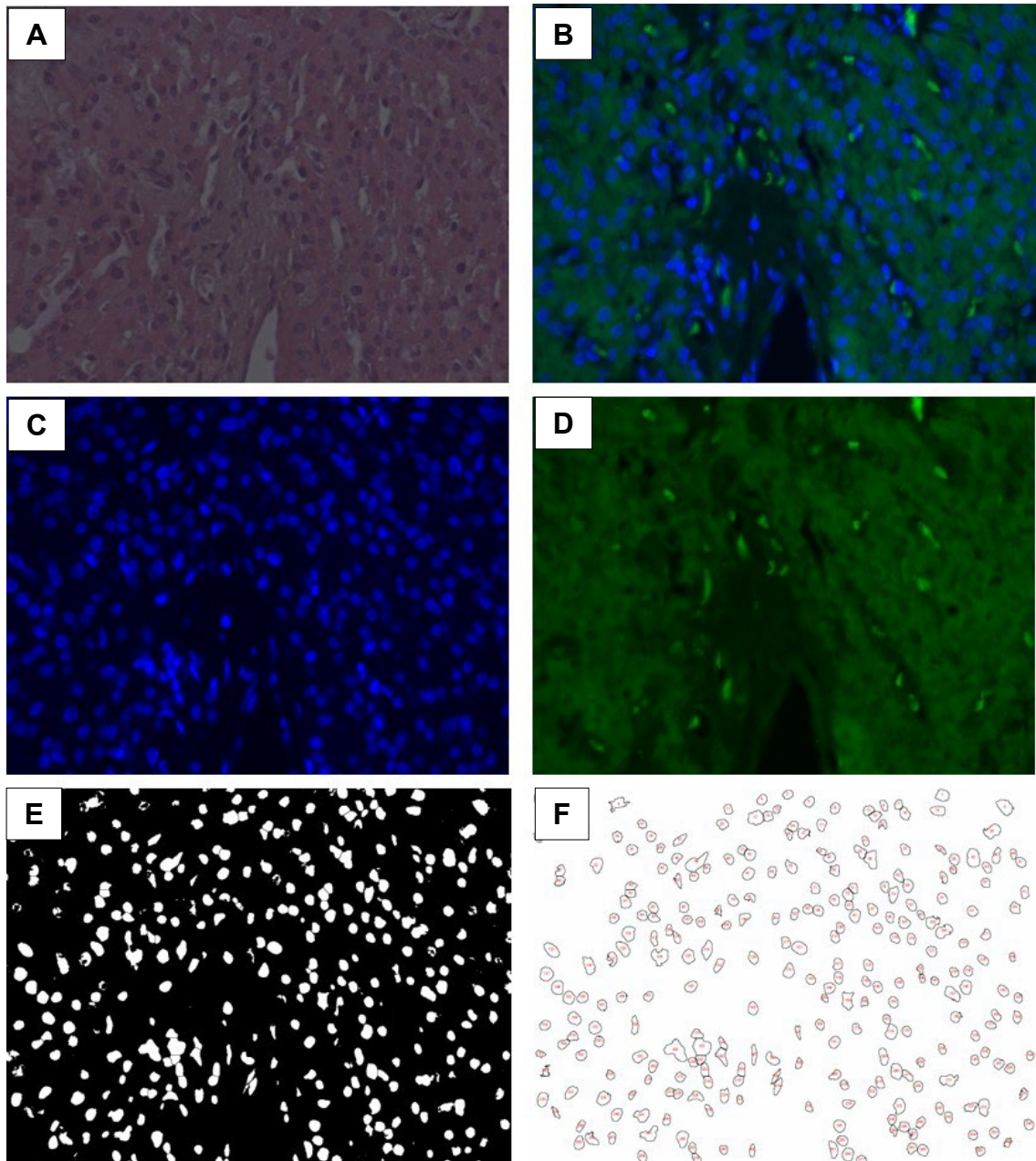


Figura 57 - Paciente 19: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul

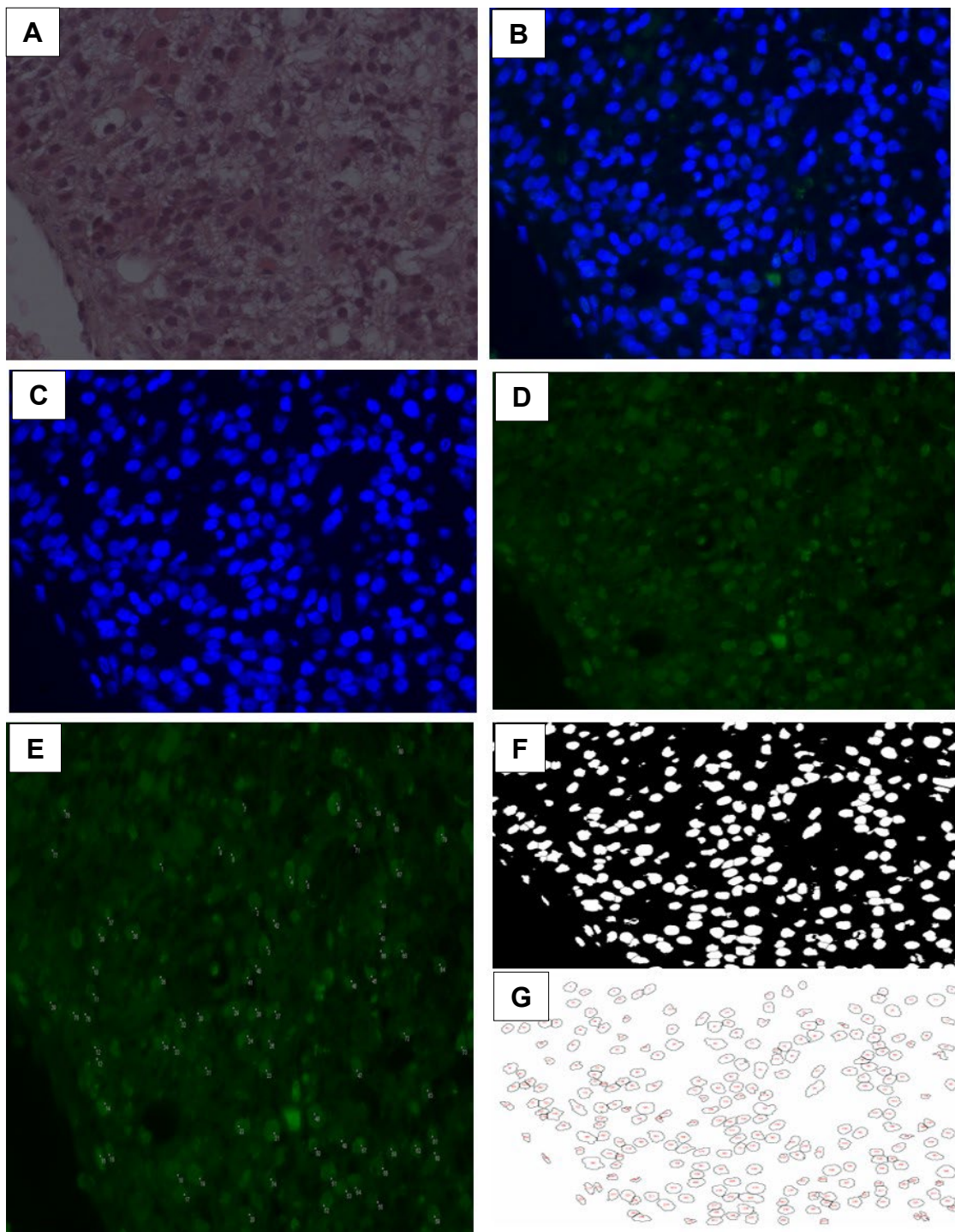


Figura 58 - Controle 01: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul

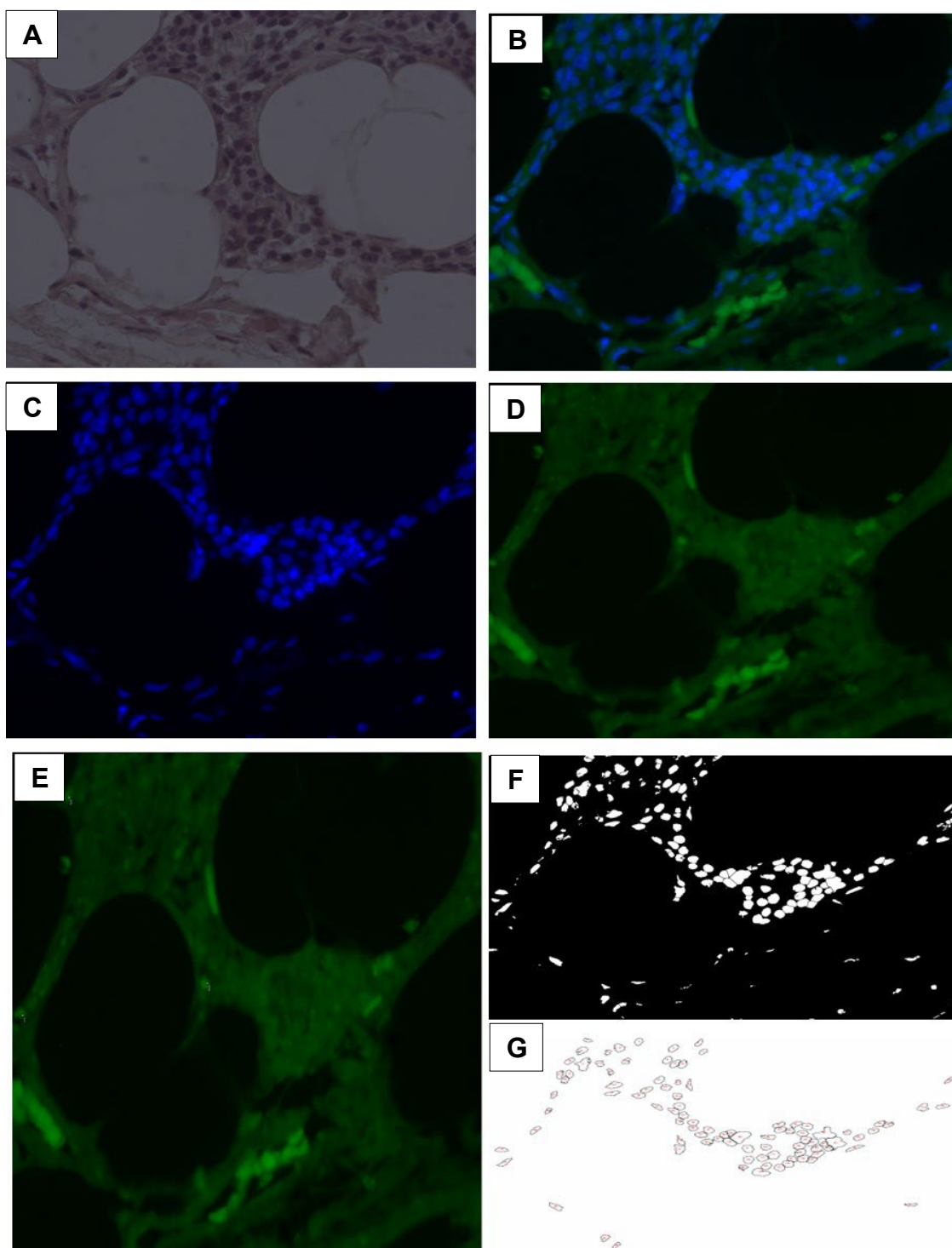


Figura 59 - Controle 02: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul

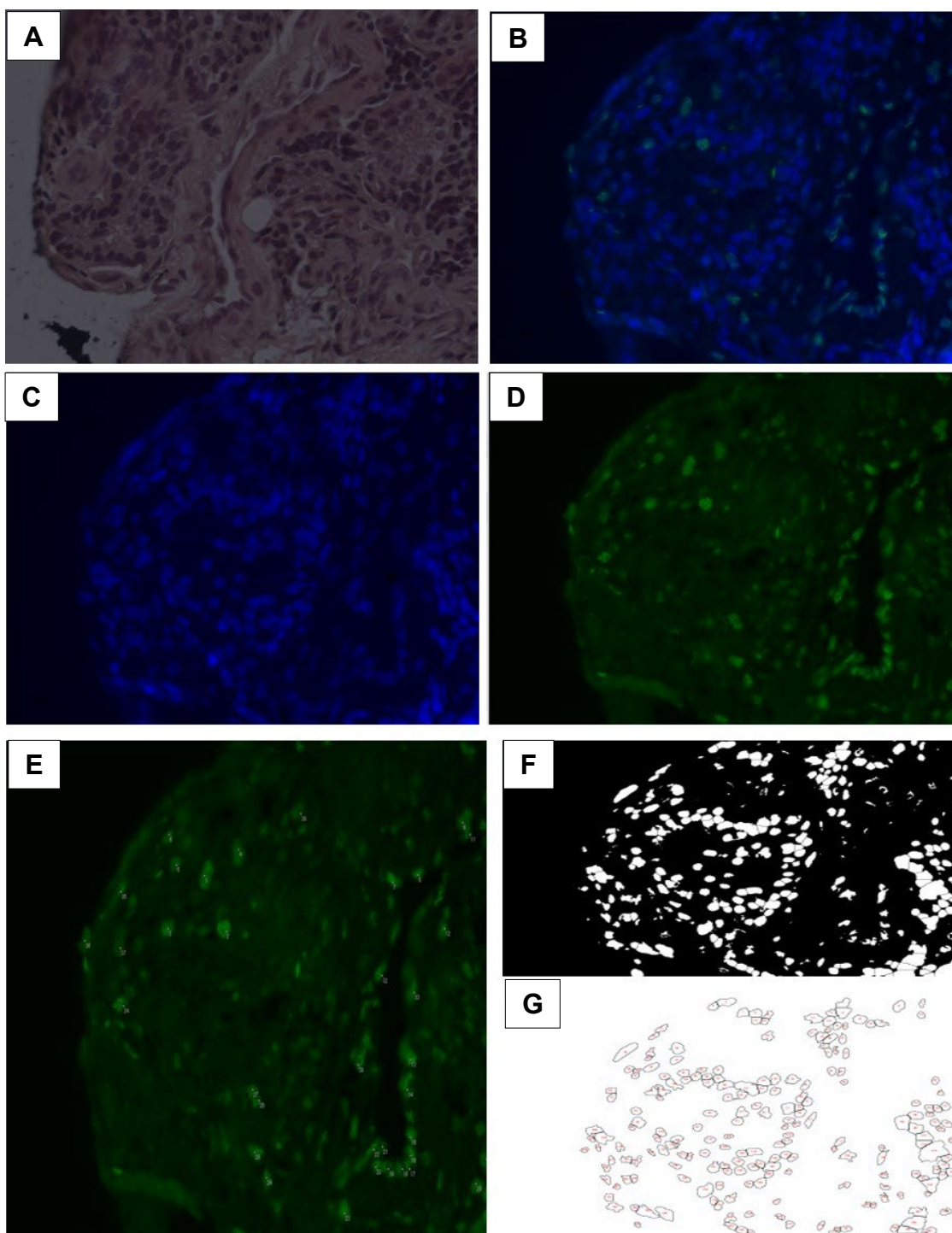


Figura 60 - Controle 03: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Separação. **(F)** Contagem

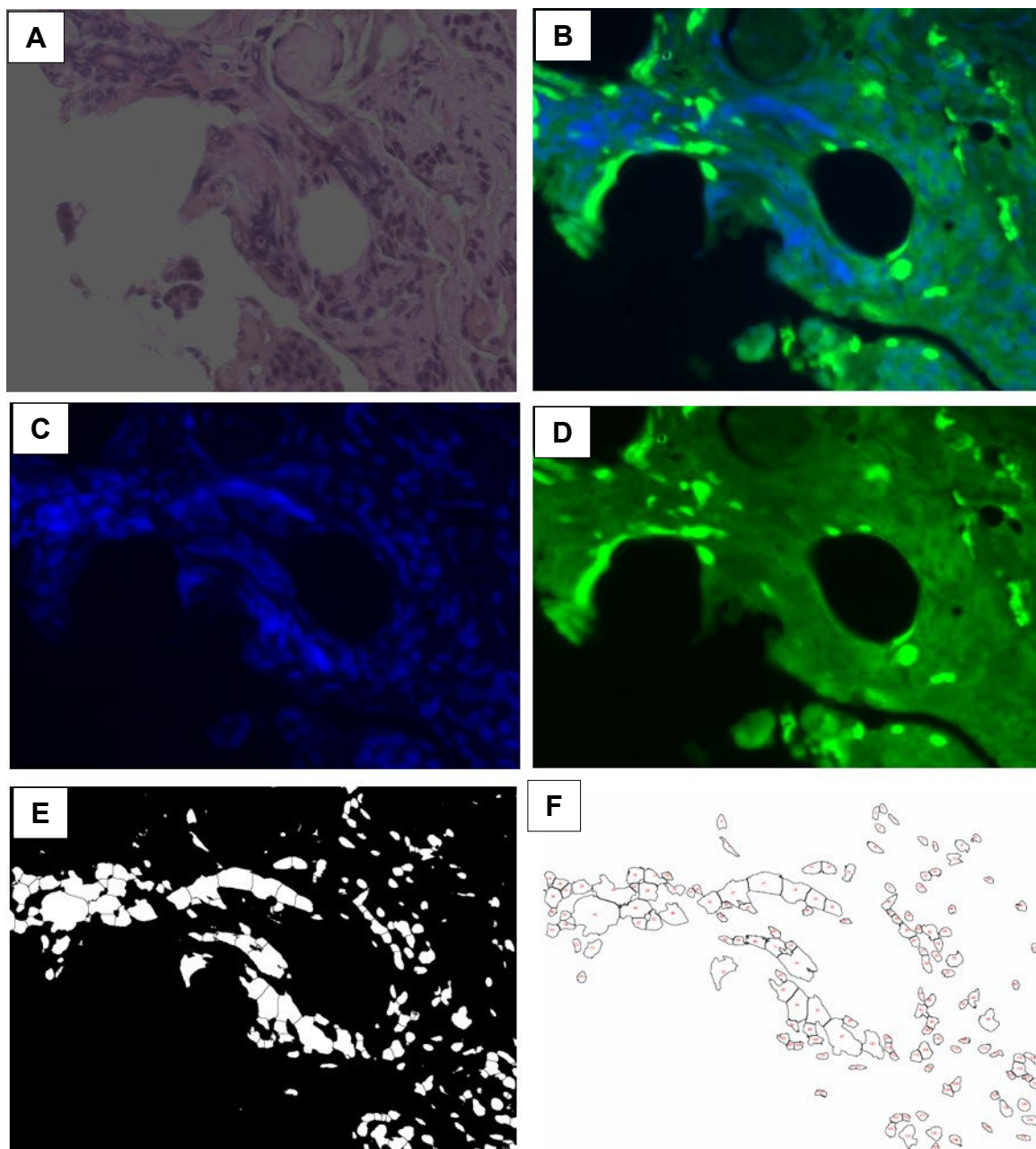


Figura 61 - Controle 04: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Contagem manual das células em verde. **(F)** Separação automatizada das células em azul. **(G)** Contagem automatizada das células em azul

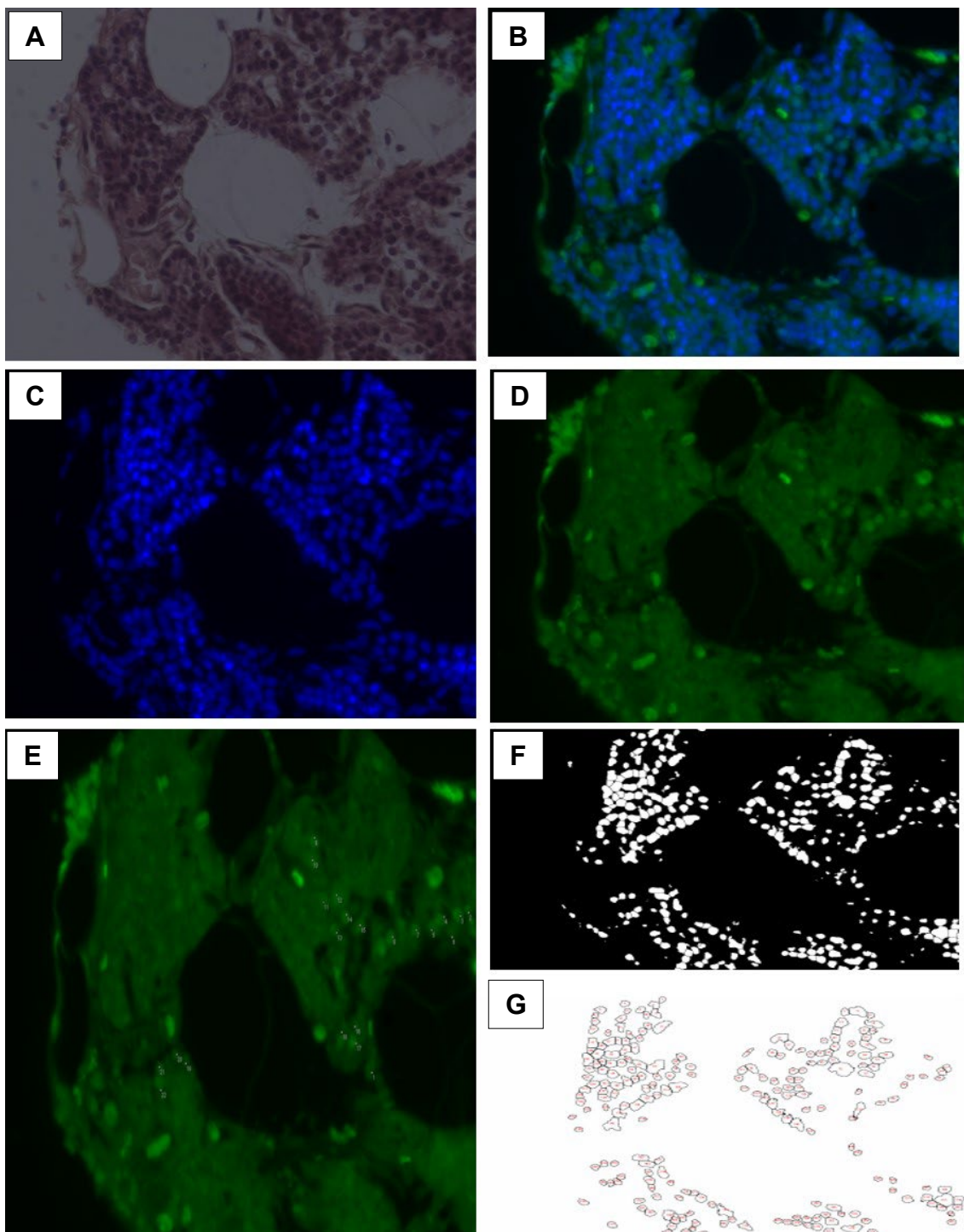
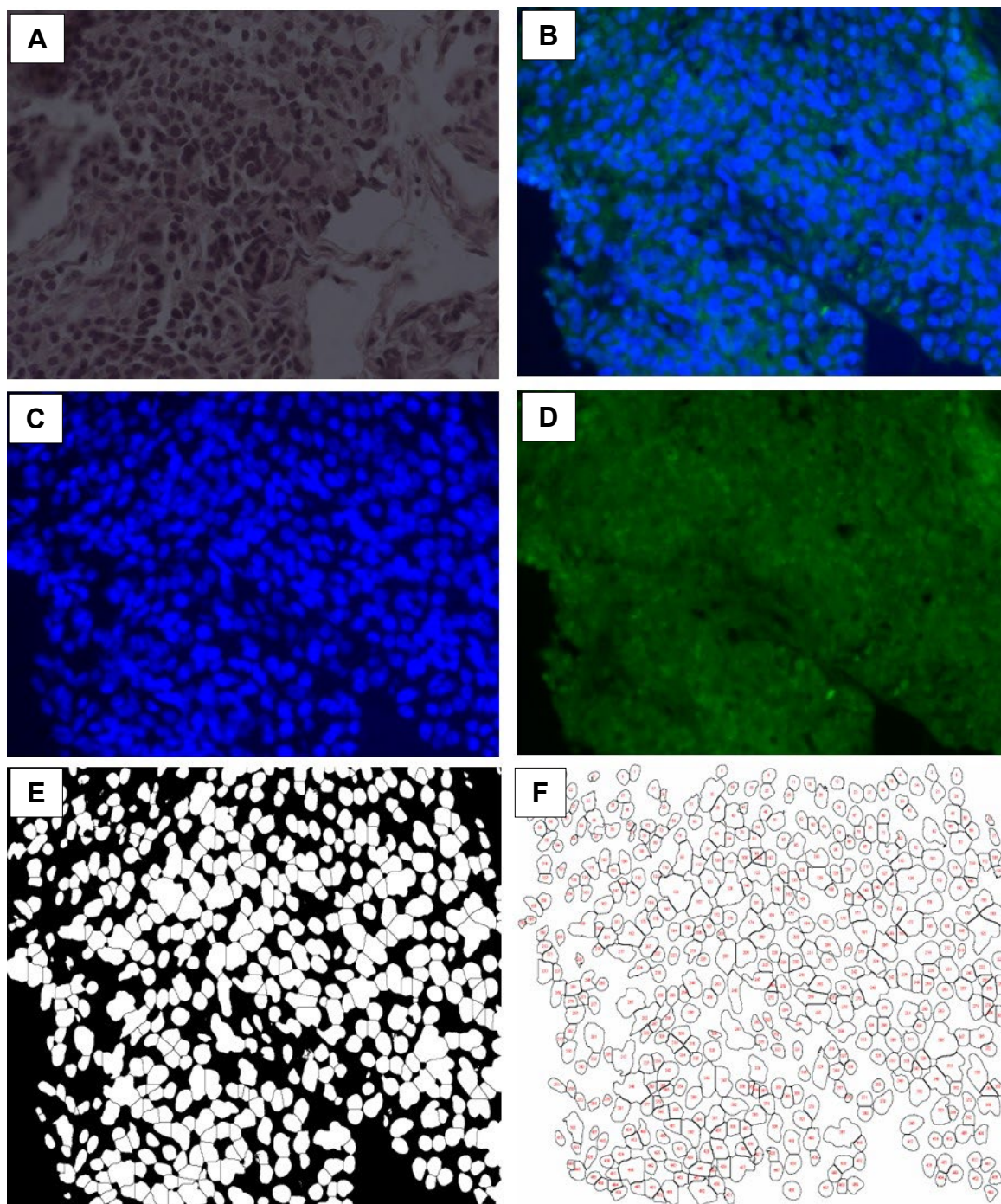


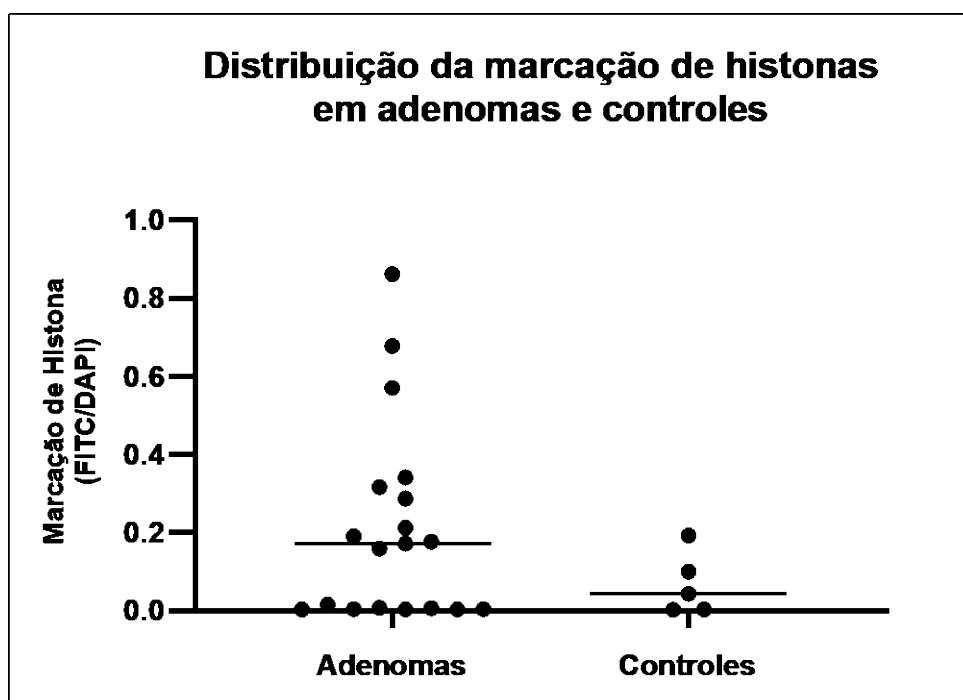
Figura 62 - Controle 05: **(A)** Lâmina do tumor corada em hematoxilina-eosina no aumento de 400x. **(B)** Imagem adquirida em microscopia convencional evidenciando células com marcação em imunofluorescência para núcleos (azul) e da histona H3K27ac (verde). **(C)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J), evidenciando células com marcação nuclear (azul). **(D)** Imagem gerada após seleção RGB (Image J) evidenciando células com marcação H3K27ac (verde). Processo de contagem de células (Image J): **(E)** Separação. **(F)** Contagem



5.5 Análise estatística: imunofluorescência

Os dados referentes à relação FITC/DAPI em ambos os grupos (Casos de adenomas x Controles) estão representados no gráfico de dispersão (Figura 62). Ao se analisarem esses dados observou-se maior dispersão na distribuição desta relação para os casos de adenoma, porém o valor de p foi de 0,18, portanto não houve diferença significativa entre os dois grupos.

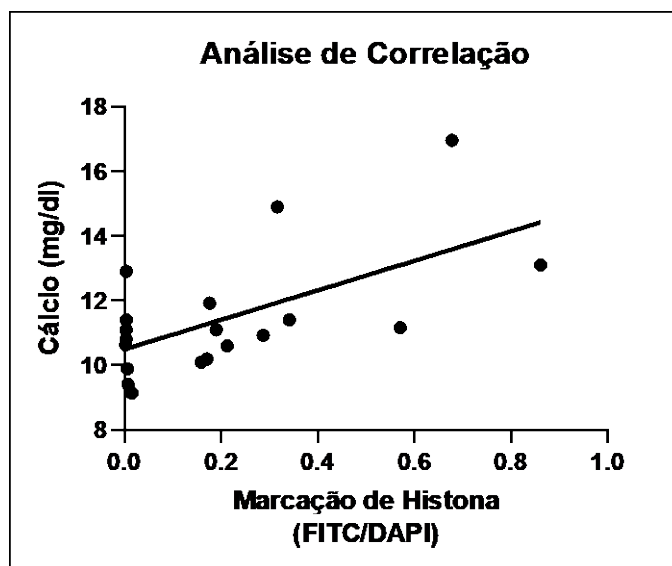
Figura 63 - Distribuição da marcação da histona (H3K27ac) nos Grupos Caso e Controle



FITC: Isotiocianato de fluoresceína, **DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenil-indol. Teste de Mann-Whitney (P=0,1869).

As próximas Figuras apresentarão gráficos de dispersão da correlação da expressão de imunofluorescência entre amostras de adenoma e dados clínico-laboratoriais indicadores de evolução da doença. O gráfico da Figura 64 mostra discreta correlação positiva com significância estatística ($p < 0,05$) entre os níveis de cálcio (mg/dL) e a relação FITC/DAPI nos 19 casos de adenoma.

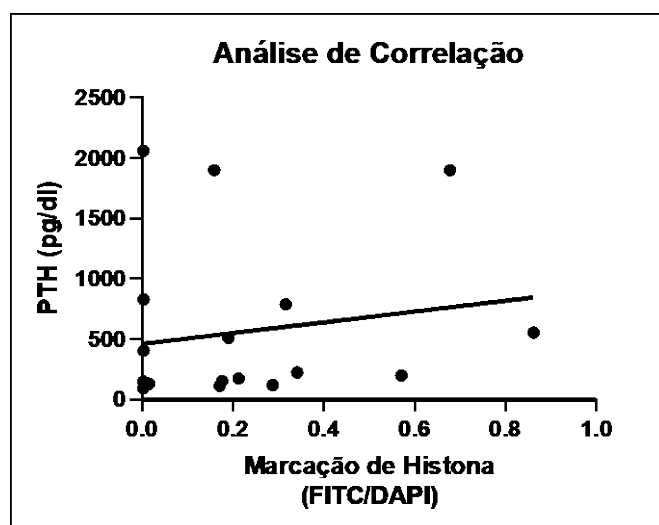
Figura 64 - Análise da correlação entre os níveis de cálcio e histona H3K27ac



FITC: Isotiocianato de fluoresceína, **DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenil-indol. Teste de Spearman (* $P=0,0499$), ($r= 0,4557$).

Nos casos de adenoma, ao se avaliar a correlação entre os níveis de PTH (pg/dL) e as células marcadas para histona H3K27ac (FITC/DAPI), notou-se que não houve correlação entre estes dados, e esta análise não evidenciou significância estatística ($p<0,05$) (Figura 65).

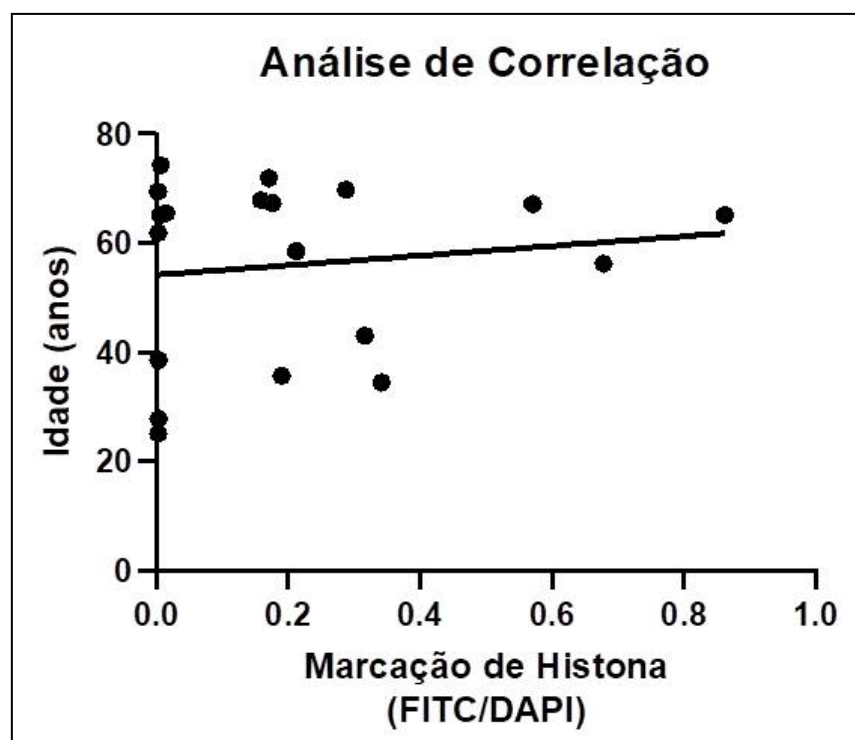
Figura 65 - Análise da correlação entre os níveis de PTH e histona H3K27ac



PTH: Paratormônio, **FITC:** Isotiocianato de fluoresceína, **DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenil-indol. Teste de Spearman ($p=0,3767$), ($r= 0,2150$).

Também foi avaliada a correlação entre a idade (anos) dos pacientes e as células marcadas para histona H3K27ac (FITC/DAPI). Conforme o gráfico abaixo, estes dados não possuem correlação e não houve significância estatística (Figura 66).

Figura 66 - Análise da correlação entre idade e histona H3K27ac

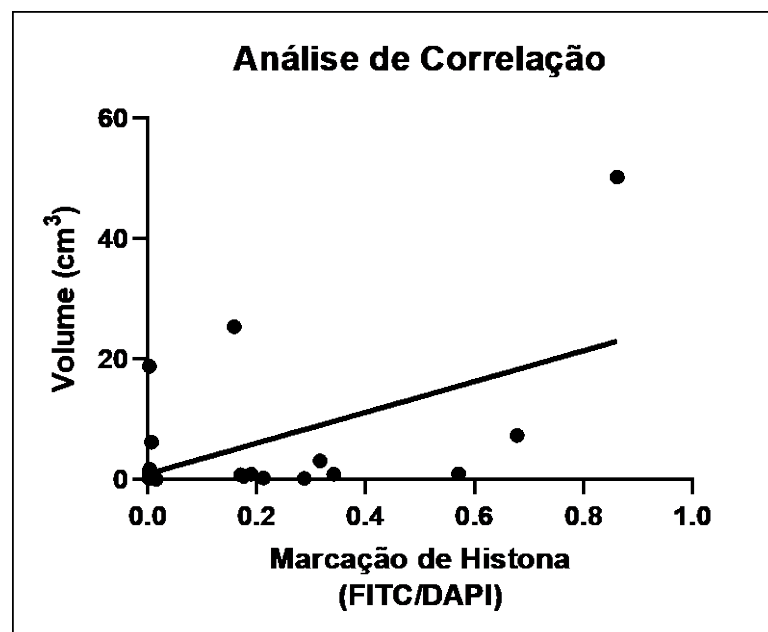


FITC: Isotiocianato de fluoresceína, **DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenil-indol. Teste de Spearman ($p=0,9943$), ($r=-0,001754$).

A análise da correlação entre o volume do adenoma (cm^3) e as células marcadas para histona H3K27ac (FITC/DAPI) mostrou que não houve correlação entre esses dados e que a diferença não foi significativa (Figura 67). A Figura 68 demonstra no gráfico que a correlação entre o volume do adenoma (cm^3) e os níveis de cálcio (mg/dL) foi discretamente positiva, mas esta análise não evidenciou significância estatística. O gráfico da Figura 69, que representa a correlação entre o volume do adenoma (cm^3) e os níveis de PTH (pg/dL) mostra correlação positiva com confirmação estatística ($p<0,05$). A Figura 70 apresenta o gráfico de dispersão

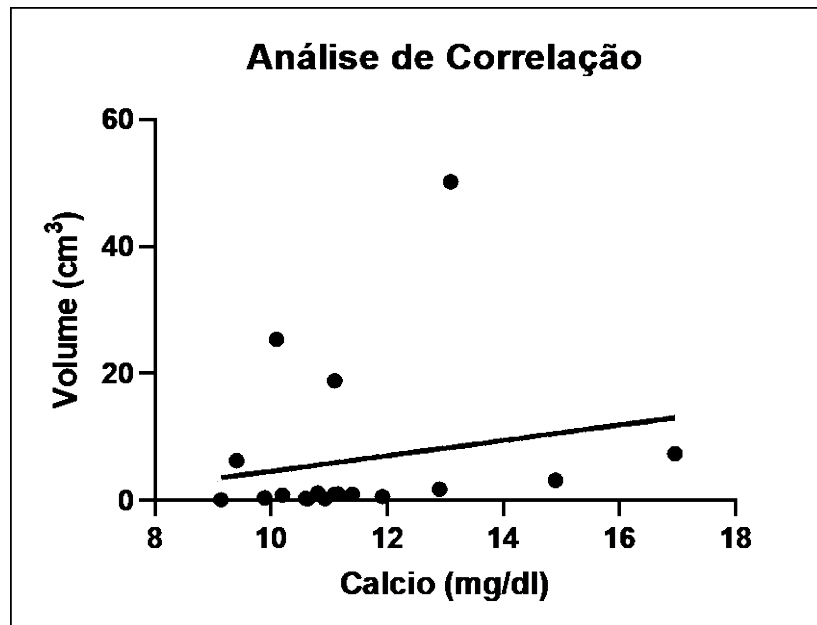
em que não houve correlação e nem significância estatística entre o volume do adenoma (cm^3) e a idade (anos) dos pacientes. Já a correlação entre a idade (anos) dos pacientes e os níveis de PTH (pg/dL) esteve presente, sendo negativa, ou seja, os níveis de PTH foram maiores nos indivíduos mais jovens e a diferença foi significativa com $p < 0,05$ (Figura 71).

Figura 67 - Análise da correlação entre o volume do adenoma e a histona H3K27ac



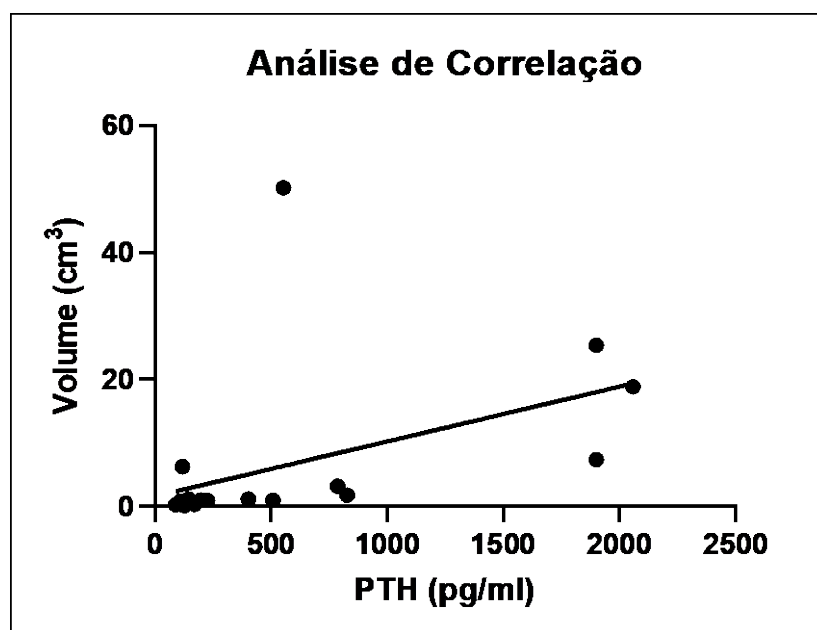
FITC: Isotiocianato de fluoresceína, **DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenil-indol. Teste de Spearman ($p=0,6064$), ($r= 0,1263$).

Figura 68 - Análise da correlação entre o volume do adenoma e os níveis de cálcio



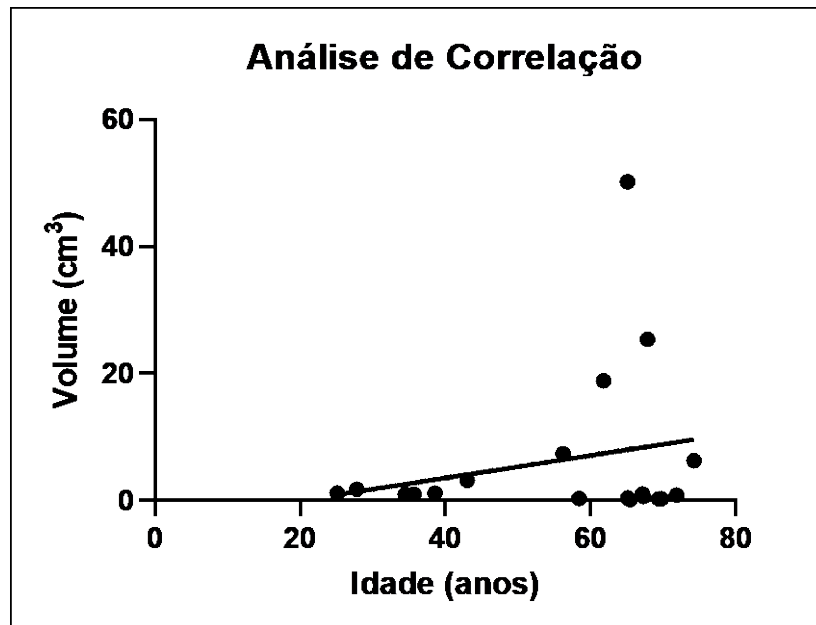
Teste de Spearman, ($p=0,0636$), ($r=0,4337$).

Figura 69 - Análise da correlação entre o volume do adenoma e os níveis de PTH



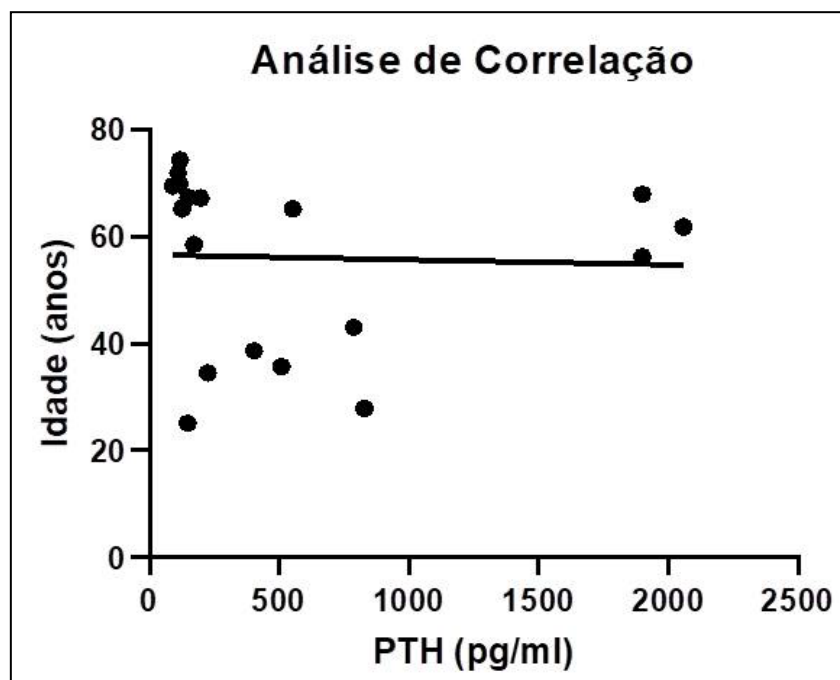
Teste de Spearman, ($***p=0,0003$), ($r=0,7442$).

Figura 70 - Análise da correlação entre o volume do adenoma e a idade



Teste de Spearman, ($p=0,3515$), ($r= -0,2263$).

Figura 71 - Análise da correlação entre a idade e o paratormônio



Teste de Spearman, ($*p=0,0160$), ($r= -0,5441$).

6. *Discussão*

No presente estudo, os dados demográficos para o AP são concordantes com a literatura no que diz respeito à maior prevalência no sexo feminino e na faixa etária dos cinquenta aos sessenta anos, como confirmam os estudos de Costa-Guda e Arnold (2014) e de Silva, Cusano e Bilezikian (2018), respectivamente. A maioria dos pacientes do Grupo Caso era do sexo feminino (16:3) e a idade média de 56 anos.

Shinjo *et al.* (2009) observaram que a maioria dos pacientes com AP apresenta aumento discreto dos níveis de PTH e de cálcio sérico; contudo, no estudo em questão, embora os níveis de cálcio mostrem leve aumento, alguns pacientes apresentaram níveis elevados de PTH, o que pode ser explicado pelo fato de que o mecanismo de controle de cálcio pelo PTH é muito sensível e ligeiras alterações dos níveis de cálcio são capazes de alterar diretamente os níveis de PHT (CONTI-FREITAS; CASTILHO; SQUARIZE, 2022). Os achados do presente estudo apontaram níveis de cálcio e PTH no pré-cirúrgico de 9,1 a 16,96 mg/dL e 89,6 a 2059 pg/mL, respectivamente, níveis elevados se considerados os valores de referência de 8,8 a 10,4 mg/dL para o cálcio e 10 a 65 pg/mL para o PTH.

A distribuição topográfica desses adenomas foi heterogênea, sem evidenciar predileção aparente por sítio. Nenhum dos pacientes do Grupo Caso apresentou adenoma ectópico, em 10 deles o adenoma estava localizado nas PTs inferiores; nos outros 9 casos o adenoma estava nas glândulas superiores. De acordo com a literatura, o AP pode ser mais frequente nas glândulas inferiores, no entanto há controvérsia (HAMIDI *et al.*, 2007), mesmo porque neoplasias benignas, como o AP, podem surgir em qualquer glândula e não há fatores oncogênicos associados à topografia (FANCY; GALLAGHER; HORNIG, 2010; SPINELLI *et al.*, 2012).

Neste estudo optou-se pela avaliação da medição dos tumores baseada no volume. As PTs têm peso médio de 40 a 60 mg (FANCY; GALLAGHER; HORNIG, 2010), porém no adenoma, o peso pode atingir dimensões elevadas como 10 g de peso e 10 cm de diâmetro (LLOYD, 1968). No presente estudo, o volume médio dos adenomas foi de $6,3 \pm 12,8$ cm³. Além dos já citados, Wieneke e Smith (2008) demonstraram que os adenomas apresentam variação ampla de dimensões (de 300 mg a vários gramas e de milímetros até mais de 10 cm) o que se mostrou verdadeiro também neste estudo.

Quando analisados os dados de seguimento pós-operatório, verificou-se que todos os pacientes do Grupo Caso tiveram os níveis de cálcio e PTH reduzidos após a cirurgia, alcançando critérios de cura após o sexto mês. Os níveis previamente elevados desse hormônio eram a causa do pHPT devido a presença de um único adenoma (~85% dos casos) (WESTIN, 2016) e essa dinâmica laboratorial evidenciada nos resultados se dá pela retirada do tumor, cursando com queda imediata do PTH (previamente elevado por conta da neoplasia).

A dinâmica do cálcio e fósforo se dá pelo seguinte: o PTH aumenta a reabsorção renal de cálcio nos túbulos da porção distal e reduz a absorção de fosfato dos túbulos proximais (TFELT-HANSEN; BROWN, 2005). O PTH regula fortemente a concentração sérica de cálcio e a mineralização óssea (WESTIN, 2016), agindo como principal regulador fisiológico de cálcio ionizado circulante (KHUNDMIRI; MURRA; LEDERER, 2016). A vitamina D e o PTH mantêm a homeostase do cálcio e do fosfato, bem como o desenvolvimento e a manutenção da saúde óssea (KHUNDMIRI; MURRAY; LEDERER, 2016). Geralmente, a secreção autônoma elevada de PTH pode incluir a presença de hipofosfatemia, o que também se observou neste estudo. Notou-se, ainda, que apesar das oscilações todos os casos tiveram aumento dos níveis séricos de fósforo no período pós-cirurgia, como esperado, uma vez que níveis elevados de PTH aumentam a reabsorção de cálcio, magnésio e a excreção de fosfato e bicarbonato (POTTS, 2001). São considerados valores de referência para fósforo de 2,5 a 4,5 mg/dL.

Os níveis de creatinina dos pacientes do Grupo Caso apresentaram pico de elevação próximo ao período da cirurgia, com subsequente melhora desses níveis (valor de referência 0,60 a 1,12 mg/dl, para mulheres e 0,70 a 1,3 mg/dl, para homens). O pHPT pode se apresentar em diversas manifestações clínicas decorrentes da hipercalcemia sérica, podendo ocorrer litíase renal, cálculos renais e nefrocalcinose, culminando em doença renal (SHINJO *et al.*, 2009), sendo necessário o monitoramento da creatinina. A retirada do tecido hiperfuncionante na paratireoidectomia diminui os níveis de PTH circulante ainda no intraoperatório em pacientes com função renal normal, a queda rápida pode ocorrer de 5 a 10 minutos, entretanto em pacientes com função renal comprometida a queda é mais

lenta, uma vez que há aumento da meia-vida do PTH (molécula intacta) na insuficiência renal (6,6 minutos, contra 2,2 minutos) (BROSSARD *et al.*, 1996).

O AP geralmente se inicia assintomático, porém pode ser ocasionalmente detectado em exames laboratoriais de rotina e costuma apresentar evolução clínica, lenta e progressiva (ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 1996). Na hipercalcemia assintomática, a queixa mais comum é decorrente de cálculos renais (18%), as patologias ósseas são diagnosticadas radiologicamente e 1% dos casos, no entanto, à densitometria ou biópsia, a alteração óssea está presente na maioria dos pacientes (BILEZIKIAN *et al.*, 2014). Neste estudo não se aprofundou sobre as manifestações clínicas dos pacientes, mas chamam atenção alguns casos como a paciente do Caso 04 que foi diagnosticada com hiperparatireoidismo após investigação para hidronefrose obstrutiva à esquerda associada à nefrocalcinose à direita com nefrolitíase bilateral, ou a paciente do Caso 02 que teve seu diagnóstico após quadro de tumor marrom em tíbia direita.

À histologia, as PTs normais são circundadas por uma fina cápsula de tecido conjuntivo e consiste principalmente de dois tipos de células: células principais (predominantes) e oxifílicas. As células principais, por meio de receptores, são a chave para síntese e secreção do PTH (WENIG, 2008). No presente estudo, as amostras não adenomatosas mostraram composição habitual com variedade celular: principais, oxifílicas e adipócitos, sem particularidades.

Já nos 19 adenomas, a histologia evidenciou composição mononuclear com predomínio da célula neoplásica causadora do tumor, sendo 15 do tipo principais, 3 do tipo oxifílicas e 1 misto. De acordo com Paul *et al.* (2015), a variante oxifílica é rara, representando menos de 6% dos casos. Neste estudo, a prevalência deste foi de 15,7%. Ressalta-se, ainda, a ocorrência de um caso de adenoma atípico, caracterizado pela presença de septos e padrão de crescimento trabecular, sem características inequívocas de malignidade, como descrito por Delellis (2011).

A modificação da histona H3K27 (H3K27ac) por acetilação abriu nova possibilidade de pesquisa na identificação de marcadores diagnósticos e alvos terapêuticos (CONTI DE FREITAS; CASTILHO; SQUARIZE, 2022). Na presente amostra, procurou-se entender como esta variável, as células marcadas para histona H23K27ac (FITC/DAPI), se relacionava com as características clínico-laboratoriais

dos portadores de AP: variáveis como níveis séricos de cálcio, PTH e volume do adenoma, visando identificar se existia alguma relação entre elas, lembrando que essas são informações que indicam progressão da doença.

Nas análises de imunofluorescência não se observou significância estatística quando comparados os Grupos em estudo (Caso e Controle) na relação FITC/DAPI. No presente estudo, alguns dos adenomas ficaram bem marcados, outros não, o que, devido à grande dispersão de dados, junto ao número pequeno de controles, pode justificar tal achado. Isso ficou bem evidenciado na Figura 63. Nas demais análises, identificou-se discreta correlação positiva com significância estatística entre os níveis de cálcio (mg/dL) e a relação FITC/DAPI nos 19 casos de adenoma. Este eletrólito, tanto na hipercalcemia sérica como na hipocalciúria, é importante sinalizador de comprometimento das PTs (GUILMETTE; SADOW, 2019), pois esse mineral é considerado o principal determinante da secreção de PTH (MALBERTI; FARINA; MBASCIATI, 1999). Nas análises referentes à marcação das histonas: PTH x FITC/DAPI; Idade x FITC/DAPI; Volume do adenoma x FITC/DAPI; não se evidenciou correlação entre as variáveis.

As análises adicionais foram realizadas entre os fatores clínico-laboratoriais e demográficos. Quando avaliada a correlação de variáveis como volume do adenoma, idade, níveis séricos de cálcio, PTH entre si, observou-se: 1) correlação direta (positiva) moderada entre o volume do adenoma e os níveis de cálcio, dentro do esperado, porém sem significância estatística; 2) correlação positiva expressiva com diferença estatística entre o volume do adenoma e os níveis séricos de PTH, dado concordante com a literatura, em que se vê, geralmente, correlação direta entre o tamanho dos adenomas e o nível sérico de PTH; embora esta afirmativa não seja válida em casos de grande degeneração cística ou necrose (PETTI; KIRK, 1996); 3) ausência de correlação entre o volume do adenoma e a idade; 4) correlação presente e negativa entre as variáveis idade e níveis séricos de PTH, ou seja, os pacientes mais jovens tendem a ter níveis de PTH mais altos.

Outros estudos, com outros tipos de patologia, tentam encontrar associação entre as modificações nas histonas e a evolução ou gravidade das doenças em questão. Gebremedhin e Rademacher (2016) desenvolveram um estudo sobre alterações na acetilação de histonas H3 no córtex motor primário de portadores de

Doença de Parkinson. Foram observados índices elevados de acetilação de H3K14 e H3K18, bem como redução da acetilação do H3K9, porém os autores concluíram que mesmo com esses achados, ainda fica difícil definir se os mesmos caracterizam uma resposta secundária à doença, ou ao próprio fenótipo celular, e sugerem novos estudos para aprofundar o entendimento e a aplicabilidade clínica desses dados. No presente estudo foram encontrados dados semelhantes a esses.

Os mecanismos moleculares envolvidos nos APs permanecem ainda pouco conhecidos e a literatura mostra que são poucos os genes diretamente relacionados ao aparecimento de tumores de PTs. Oncogenes, genes supressores de tumor, como MEN1 e CDC73 (anteriormente denominado HRPT2), estão envolvidos na patogênese das PTs, bem como a modificação de histonas (PORTELA; ESTELLER, 2010). As histonas regulam o mecanismo de condensação de DNA, podendo sofrer modificação em sua estrutura por meio de eventos epigenéticos; o desequilíbrio entre acetilação e desacetilação pode favorecer o desenvolvimento de tumores (ARIF *et al.*, 2010). A acetilação das histonas promove a descondensação do DNA, “abrindo” o DNA e favorecendo a transcrição de diversos genes (CONTI DE FREITAS; CASTILHO; SQUARIZE, 2022). Não existem dados sobre os perfis de expressão gênica e modificações epigenéticas de PTs. Variações no número de cópias e mutações somáticas nessas glândulas foram encontradas em série relativamente pequena de amostras de tumor, variavelmente caracterizadas pelo fundo genético, expressão gênica e biomarcadores clínicos; além disso essas variações estão limitadas à metilação do DNA, expressão de histonas, modificação pós-transcricional e miRNAs. Portanto, a paisagem retratada pelos dados disponíveis abre interessantes perspectivas (VERDELLI; CORBETTA, 2017).

Modificações genéticas da histona H3K27 são marca registrada da transformação em muitos tipos de câncer. Várias vias epigenéticas trabalham em conjunto em vários mecanismos envolvidos em algumas doenças, fornecendo assim inúmeras abordagens para o direcionamento.

Os genes afetados pelo H3K27 desregulado são controladores específicos na oncogênese. A identificação de outros fatores de transcrição e reguladores epigenéticos também presentes nesses genes afetados pode fornecer informações

cruciais para o desenho de novas estratégias de combinação e para a identificação de biomarcadores de resposta aos agentes já testados na clínica, como o EZH2.

Muitas questões sobre como as perturbações no padrão H3K27 que levam à tumorigênese permanecem, principalmente devido a relatos conflitantes de diferenças nos papéis da metilação e acetilação de H3K27 em diferentes tecidos e até mesmo em diferentes estágios de desenvolvimento. Isso destaca a necessidade de novos estudos, mais robustos, para validação cuidadosa dos medicamentos direcionados à histona H3K27ac, a fim de se obter uma imagem mais completa da importância dessa marca epigenética, especialmente no AP.

A epigenética, a modificação da cromatina sem alterar a própria sequência de DNA, determina se um gene é expresso e quanto de um gene é expresso. Nenhuma marca de histona sozinha determina a prontidão transcricional geral de uma região da cromatina, a desregulação de outras marcas de cromatina também pode ter consequências dramáticas (NICHOL *et al.*, 2016). Nucleossomo contendo histona H3K27ac é uma marca epigenética importante de cromatina ativa (ZHANG *et al.*, 2022). A expressão gênica eucariótica é regulada pela ligação do DNA a fatores de transcrição e fatores epigenéticos associados à cromatina. As cromatinas associadas a fatores epigenéticos cooperam com modificações pós-traducionais em caudas de histonas na regulação da transcrição de genes. Entre as diferentes modificações das histonas, a acetilação está quase sempre correlacionada com a ativação transcricional, independentemente dos sítios de acetilação. A acetilação da histona H3 na lisina 27 (H3K27ac) é a mais estudada, e é considerada como a marca para potenciadores ativos em muitos ensaios de imunoprecipitação de cromatina (CREYGHTON *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2020).

O que se discute neste estudo é como o conhecimento sobre o perfil de acetilação de histonas em APs pode melhorar a compreensão dos mecanismos epigenéticos envolvidos nessa desordem endocrinológica para aprimorar o manejo de futuros portadores da doença, aperfeiçoar o diagnóstico e identificar alvos específicos para novas terapias.

As limitações encontradas no presente estudo incluíram: dificuldades em relação à aquisição de amostras de controles, uma vez que se fazia necessária a biópsia de PT saudável, atraso significativo na programação prevista por

consequência da pandemia, que cursou com o fechamento dos laboratórios por período prolongado e escassez de dados na literatura por se tratar de assunto novo e ainda pouco estudado, o que limitou a análise comparativa.

Dessa forma, sugere-se que novos estudos sejam desenvolvidos para se compreender melhor o papel de outras histonas H3 e H4 no processo de gênese de patologias, além de se realizar avaliação molecular detalhada da expressão de genes ligados a mecanismos de controle da acetilação e desacetilação de histonas, bem com a identificação de proteínas envolvidas nessa regulação celular.

7. Conclusões

Após análise dos resultados, notou-se que o perfil de acetilação da histona H3K27 em AP de pacientes portadores de hiperparatireoidismo primário mostrou-se muito heterogêneo. Essa variedade no perfil ficou evidente nas análises, sendo que em 50% dos casos não se observou acetilação da histona H3K27; em 25% esta marcação foi muito discreta e nos 25% restantes, a marcação foi expressiva.

- A grande variedade no perfil de acetilação da histona H3K27 entre os adenomas não permitiu estabelecer diferença entre glândulas adenomatosas e não adenomatosas.
- Dentre os critérios clínico-laboratoriais indicativos de doença em progressão/piora, notou-se correlação positiva entre a acetilação dessa histona e os níveis séricos de cálcio, o que pode indicar que o aumento da acetilação da histona H3K27 relaciona-se com a progressão do hiperparatireoidismo e consequente elevação dos níveis séricos de cálcio total. Os demais critérios analisados (valor do PTH, idade do paciente e volume do adenoma) não demonstraram correlação com os índices de marcação da histona H3K27.

8. Referências Bibliográficas¹

¹Elaboradas de acordo com as Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP: Documento Eletrônico e Impresso - Parte I (ABNT) 4ª ed. São Paulo: SIBi/USP, 2020.

AHUJA, N.; SHARMA, A. R.; BAYLIN, S. B. Epigenetic therapeutics: A new weapon in the war against cancer. **Annual Review of Medicine**, v. 67, p. 73-89, 2016.

AKERSTRÖM, G.; MALMAEUS, J.; BERGSTRÖM, R. Surgical anatomy of human parathyroid glands. **Surgery**, v. 95, n. 1, p. 14-21, Jan. 1984.

ALLAMEH, A. *et al.* Promoter DNA methylation and mRNA expression level of p16 gene in oral squamous cell carcinoma: Correlation with clinicopathological characteristics. **Pathology Oncology Research**, v. 25, n. 4, p. 1535-1543, Oct. 2019.

ALLEN, E.; FINGERET, A. **Anatomy, Head and Neck, Thyroid**. 2022 Jul 25. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.

ALVELOS, M. I.; MENDES, M.; SOARES, P. Molecular alterations in sporadic primary hyperparathyroidism. **Genetics Research International**, p. 275802, Sep. 2011.

ANDRICOVICH, J. *et al.* Loss of KDM6A Activates super-enhancers to induce gender-specific squamous-like pancreatic cancer and confers sensitivity to BET inhibitors. **Cancer Cell**, v. 33, n. 3, p. 512-526.e8, Mar. 2018.

APAYDIN, T.; YAVUZ, D. G. Seven cases of parathyroid carcinoma and review of the literature. **Hormones**, v. 20, n. 1, p. 189-195, Mar. 2021.

ARIF, M. *et al.* Nitric oxide-mediated histone hyperacetylation in oral cancer: target for a water-soluble HAT inhibitor, CTK7A. **Chemistry & Biology**, v. 17, n. 8, p. 903-913, Aug. 2010.

ARIK, D. *et al.* Water-clear cell adenoma of the mediastinal parathyroid gland. Water-clear cell adenoma of the mediastinal parathyroid gland. **Turk Patoloji Dergisi**, v. 35, n. 2, p. 157-161, 2019.

ARYA, A. K. *et al.* Promoter hypermethylation inactivates CDKN2A, CDKN2B and RASSF1A genes in sporadic parathyroid adenomas. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3123, Jun. 2017.

ASARE, E. A. *et al.* Parathyroid carcinoma: An update on treatment outcomes and prognostic factors from the National Cancer Data Base (NCDB). **Annals of Surgical Oncology**, v. 22, n. 12, p. 3990-3995, Nov. 2015.

ASARE, E. A. *et al.* Risk of distant metastasis in parathyroid carcinoma and its effect on survival: A retrospective review from a high-volume center. **Annals of Surgical Oncology**, v. 26, n. 11, p. 3593-3599, Oct. 2019.

AUTIER, P. *et al.* Vitamin D status and ill health: a systematic review. **The Lancet. Diabetes & Endocrinology**, v. 2, n. 1, p. 76-89, Jan. 2014.

BARAZEGHI, E. *et al.* 5-Hydroxymethylcytosine discriminates between parathyroid adenoma and carcinoma. **Clinical Epigenetics**, v. 8, p. 31, Mar. 2016.

BILEZIKIAN, J. P. *et al.* Guidelines for the management of asymptomatic primary hyperparathyroidism: summary statement from the Fourth International Workshop. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, n. 10, p. 3561-3569, Oct. 2014.

BILEZIKIAN, J. P. *et al.* Hyperparathyroidism. **Lancet**, v. 391, n. 10116, p. 168-178, Jan. 2018.

BJÖRKLUND, P.; AKERSTRÖM, G.; WESTIN, G. An LRP5 receptor with internal deletion in hyperparathyroid tumors with implications for deregulated WNT/beta-catenin signaling. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 11, p. e328, Nov. 2007.

BJÖRKLUND, P. *et al.* Stabilizing mutation of CTNNB1/beta-catenin and protein accumulation analyzed in a large series of parathyroid tumors of Swedish patients. **Molecular Cancer**, v. 7, p. 53, Jun. 2008.

BRACKEN, A. P. *et al.* EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 20, p. 5323-5335, Oct. 2003.

BRICAIRE, L. *et al.* Frequent large germline HRPT2 deletions in a French National cohort of patients with primary hyperparathyroidism. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, p. 98, n. 2, p. E403-E408, Feb. 2013.

BROSSARD, J. H. *et al.* Accumulation of a non-(1-84) molecular form of parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assay in renal failure: importance in the interpretation of PTH values. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 81, n. 11, 3923-3929, 1996.

BUCHWALD, P. C.; AKERSTRÖM, G.; WESTIN, G. Reduced p18INK4c, p21CIP1/WAF1 and p27KIP1 mRNA levels in tumours of primary and secondary hyperparathyroidism. **Clinical Endocrinology**, v. 60, n. 3, p. 389-393, Jun. 2004.

CALVO, M. S.; URIBARRI, J. Public health impact of dietary phosphorus excess on bone and cardiovascular health in the general population. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 98, n. 1, p. 6-15, Jul. 2013.

CAO, L. L. *et al.* Histone deacetylase HDAC1 expression correlates with the progression and prognosis of lung cancer A meta-analysis. **Medicine**, v. 96, n. 31, p. e7663, Aug 2017.

CARLING, T. *et al.* Parathyroid MEN1 gene mutations in relation to clinical characteristics of nonfamilial primary hyperparathyroidism. **The Journal of clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 8, p. 2960-2963, Aug. 1998.

CARLING, T. *et al.* Intragenic allelic loss and promoter hypermethylation of the RIZ1 tumor suppressor gene in parathyroid tumors and pheochromocytomas. **Surgery**, v. 134, n. 6, p. 932-940, Sep. 2003.

CARPTEN, J. D. *et al.* HRPT2, encoding parafibromin, is mutated in hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. **Nature Genetics**, v. 32, n. 4, p. 676-680, Dec. 2002.

CASTILHO, R. M.; SQUARIZE, C. H.; ALMEIDA, L. O. Epigenetic modifications and head and neck cancer: Implications for tumor progression and resistance to therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1506, Jul. 2017.

CETANI, F.; TORREGROSSA, L.; MARCOCCI, C. A large functioning parathyroid lipoadenoma. **Endocrine**, v. 53, n. 2, p. 615-616, Aug. 2016.

CETANI, F. *et al.* Atypical parathyroid adenomas: challenging lesions in the differential diagnosis of endocrine tumors. **Endocrine-related Cancer**, v. 26, n. 7, p. R441-R464, Jun. 2019.

CHERVONA, Y.; COSTA, M. Histone modifications and cancer: biomarkers of prognosis? **American Journal of Cancer Research**, v. 2, n. 5, p. 589-597, 2012.

CHOUDHURY, J. H.; GHOSH, S. K. Promoter hypermethylation profiling identifies subtypes of head and neck cancer with distinct viral, environmental, genetic and survival characteristics. **PloS One**, v. 10, n. 6, p. e0129808, Jun. 2015.

COLE, A. J.; CLIFTON-BLIGH, R.; MARSH, D. J. Histone H2B monoubiquitination: roles to play in human malignancy. **Endocrine-related Cancer**, p. 22, n. 1, p. T19-T33, Feb. 2015.

COLLIP, J. B. The extraction of a parathyroid hormone which will prevent or control parathyroid tetany and which regulates the level of blood calcium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 63, n. 2, p.395-438, 1925.

CONTI DE FREITAS, L. C.; CASTILHO, R. M.; SQUARIZE, C. H. Histone modification on parathyroid tumors: A review of epigenetics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, p. 5378, May. 2022.

CORBETTA, S. *et al.* Differential expression of microRNAs in human parathyroid carcinomas compared with normal parathyroid tissue. **Endocrine-related Cancer**, p. 17, n. 1, p. 135-146, Feb. 2010.

COSTA-GUDA, J.; ARNOLD, A. Genetic and epigenetic changes in sporadic endocrine tumors: parathyroid tumors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 386, n. 1-2, p. 46-54, Apr. 2014.

CREYGHTON, M. P. *et al.* Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences of the United States of America, p. 107, n. 50, p. 21931-21936, Sep. 2010.

CROMER, M. K. *et al.* Identification of somatic mutations in parathyroid tumors using whole-exome sequencing. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 9, p. E1774-E1781, Sep. 2012.

DELELLIS, R. A. **Atlas of Tumor Pathology: Tumors of the parathyroid gland**. St. Louis, EUA: American Registry of Pathology, 1993. 102p.

DELELLIS, R. A. Parathyroid tumors and related disorders. **Modern Pathology**, v. 24, n. 2, p. S78-S93, Apr. 2011.

DREIJERINK, K. M. *et al.* Mechanisms of disease: multiple endocrine neoplasia type 1-relation to chromatin modifications and transcription regulation. **Nature Clinical Practice. Endocrinology & Metabolism**, v. 2, n. 10, p. 562-570, Oct. 2006.

DREIJERINK, K. M. *et al.* Regulation of vitamin D receptor function in MEN1-related parathyroid adenomas. *Molecular and cellular endocrinology*, v. 313, n. 1-2, p. 1-8, Dec. 2009.

DUAN, K.; METE, Ö. Parathyroid carcinoma: Diagnosis and clinical implications. **Turk Patoloji Dergisi**, v. 31, n. 1, p. 80-97, 2015.

DUAN, K.; GOMEZ HERNANDEZ, K.; METE, O. Clinicopathological correlates of hyperparathyroidism. **Journal of Clinical Pathology**, v. 68 n. 10, p. 771-787, Oct. 2015.

ENG, C. **Multiple Endocrine Neoplasia Type 2**. In: ADAM M. P. *et al.* (eds.). GeneReviews®. Seattle, EUA: University of Washington, 2019.

FARBER, L. J. *al.* The tumor suppressor parafibromin is required for posttranscriptional processing of histone mRNA. **Molecular Carcinogenesis**, v. 49, n. 3, p. 215-223, Mar. 2010.

FANCY, T.; GALLAGHER, D.; HORNIG, J. D. Surgical anatomy of the thyroid and parathyroid glands. **Otolaryngologic Clinics of North America**, p. 43, n. 2, p. 221-227, Apr. 2010.

FARIAS, M. L. F. Hiperparatireoidismo primário: importante confirmar primeiro, localizar depois. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 54, n. 4, p. 343-344, Jun. 2010.

FERRARO, V. *et al.* Current concepts in parathyroid carcinoma: a single Centre experience. **BMC Endocrine Disorders**, v. 19, n. 1, p. 46, May, 2019.

FIGUEIREDO, M.; NEVES, H. Two-step approach to explore early- and late-stages of organ formation in the avian model: The thymus and parathyroid glands

organogenesis paradigm. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 136, p. 57114, Jun. 2018.

FRAGA, M. F. *et al.* Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. **Nature Genetics**, v. 37, n. 4, p. 391-400, Apr 2005.

GALANI, A. *et al.* Atypical parathyroid adenoma: clinical and anatomical pathologic features. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 19, n. 1, p. 19, Jan. 2021.

GAO, Y. *et al.* Acetylation of histone H3K27 signals the transcriptional elongation for estrogen receptor alpha. **Communications Biology**, v. 3, n. 1, p. 165, Apr. 2020.

GAŹDZICKA, J. *et al.* Epigenetic modifications in head and neck cancer. **Biochemical Genetics**, v. 58, n. 2, p. 213-244, Apr. 2020.

GEBREMEDHIN, K. G.; RADEMACHER, D. J. Histone H3 acetylation in the postmortem Parkinson's disease primary motor cortex. **Neurosci Lett**. V. 627, p. 121-125, Aug 2016.

GIAGINIS, C. *et al.* Clinical significance of histone deacetylase (HDAC)-1, HDAC-2, HDAC-4, and HDAC-6 expression in human malignant and benign thyroid lesions. **Tumor Biology**, v. 35, n. 1, p. 61-71, Jan. 2014.

GIDDINGS, C. E.; RIMMER, J.; WEIR, N. History of parathyroid gland surgery: an historical case series. **The Journal of Laryngology and Otology**, v. 123, n. 10, p. 1075-1081, Oct. 2009.

GIUDICE, F. S. *et al.* Inhibition of histone deacetylase impacts cancer stem cells and induces epithelial-mesenchyme transition of head and neck cancer. *PloS one*, v. 8, n. 3, p. e58672, Mar. 2013.

GOMES, E. M. *et al.* Ectopic and extra numerary parathyroid glands location in patients with hyperparathyroidism secondary to end stage renal disease. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 105-109, Mar-Apr. 2007.

GUAN, B. *et al.* GCM2-Activating mutations in familial isolated hyperparathyroidism. **American Journal of Human Genetics**, p. 99, n. 5, p. 1034-1044, Nov. 2016.

GUILMETTE, J.; SADOW, P. M. Parathyroid Pathology. **Surgical Pathology Clinics**, 12(4), 1007-1019, Dec. 2019.

HAGLUND, F. *et al.* Lack of S37A CTNNB1/ β -catenin mutations in a Swedish cohort of 98 parathyroid adenomas. **Clinical Endocrinology**, v. 73, n. 4, p. 552-553, Oct. 2010.

HAHN, M. A. *et al.* CDC73/HRPT2 CpG island hypermethylation and mutation of 5'-untranslated sequence are uncommon mechanisms of silencing parafibromin in parathyroid tumors. **Endocrine-related Cancer**, v. 17, n. 1, p. 273-282, Feb. 2010.

HAMIDI, S. *et al.* N. Distribution of solitary parathyroid adenoma over the parathyroid glands and its surgical management. **Journal of the College of Physicians and Surgeons**, v. 17, n. 10, p. 619-621, Oct. 2007.

HAVEN, C. J. *et al.* Gene expression of parathyroid tumors: molecular subclassification and identification of the potential malignant phenotype. **Cancer Research**, v. 64, n. 20, p. 7405-7411, Oct. 2004.

HENDY, G. N.; COLE, D. E. Genetic defects associated with familial and sporadic hyperparathyroidism. **Frontiers of Hormone Research**, v. 41, p. 149-165, Mar. 2013.

HO, E.; CLARKE, J. D.; DASHWOOD, R. H. Dietary sulforaphane, a histone deacetylase inhibitor for cancer prevention. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 12, p. 2393-2396, Dec. 2009.

HOEL, D. G. *et al.* The risks and benefits of sun exposure 2016. **Dermato-Endocrinology**, v. 8 n. 1, p. e1248325, Oct. 2016.

HOWSON, P. *et al.* Oxyphil cell parathyroid adenomas causing primary hyperparathyroidism: A clinico-pathological correlation. **Endocrine Pathology**, p. 26, n. 3, p. 250-254, Sep. 2015.

HU, Z. C. *et al.* Upregulated histone deacetylase 6 associates with malignant progression of melanoma and predicts the prognosis of patients. **Cancer Management and Research**, v. 12, p. 12993-13001, Dec. 2020.

ILAHI, A.; MUCO, E.; ILAHI, T. B. **Anatomy, Head and Neck, Parathyroid**. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.

JANKOWSKA, A. M. *et al.* Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. **Blood**, v. 118, n. 14, p. 3932-3941, Oct. 2011.

JOHNSON, N. *et al.* Lipoadenoma. **ANZ Journal of Surgery**, p. 85, n. 6, p. 489-490, Mar. 2015.

JUHLIN, C. *et al.* Loss of parafibromin expression in a subset of parathyroid adenomas. **Endocrine-Related Cancer**, v. 13, n. 2, p. 509-523, Jun. 2006.

JUHLIN, C. C. *et al.* Frequent promoter hypermethylation of the APC and RASSF1A tumour suppressors in parathyroid tumours. **PloS One**, v. 5, n. 3, p. e9472, Mar. 2010.

JUHLIN, C. C.; ERICKSON, L. A. Genomics and Epigenomics in parathyroid neoplasia: from Bench to Surgical Pathology Practice. **Endocrine Pathology**, p. 32, n. 1, p. 17-34, Mar. 2021.

KAFETZIS, I. D. *et al.* The history of the parathyroid glands. **Hormones**, v. 10, n. 1, p. 80-84, Jan-Mar. 2011.

KALIN, J. H. *et al.* Investigation into the use of histone deacetylase inhibitor MS-275 as a topical agent for the prevention and treatment of cutaneous squamous cell carcinoma in an SKH-1 hairless mouse model. **PloS One**, v. 14, n. 3, p. e0213095, Mar. 2019.

KAMEYAMA, K. *et al.* Parathyroid carcinomas: can clinical outcomes for parathyroid carcinomas be determined by histologic evaluation alone? **Endocrine Pathology**, v. 13, n. 2, p. 135-139, 2002.

KIM, J. M. *et al.* Linker histone H1.2 establishes chromatin compaction and gene silencing through recognition of H3K27me3. **Scientific Reports**, v. 5, p. 16714, Nov. 2015.

KIM, K. H.; ROBERTS, C. W. Targeting EZH2 in cancer. **Nature Medicine**, v. 22, n. 2, p. 128-134, Feb. 2016.

KIRSCH, T. Determinants of pathological mineralization. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 18, n. 2, p. 174-180, Mar. 2006.

KOIKE, K. *et al.* Inactivation of dermatopontin via histone deacetylation in human oral cancer. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology**, v. 29, p. 400-404, Sep. 2017.

KHUNDMIRI, S. J.; MURRAY, R. D.; LEDERER, E. PTH and vitamin D. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 2, p. 561-601, Mar. 2016.

KOLLATAJ, W. *et al.* Witamina D - rekomendacje czy też konieczność indywidualizacji dawek? **Endokrynology Pediatric**, v. 1, n. 50, p. 11-21, 2015.

KRUIJFF, S. *et al.* Negative parafibromin staining predicts malignant behavior in atypical parathyroid adenomas. **Annals of Surgical Oncology**, v. 21, n. 2, p. 426-433, Feb. 2014.

LAWRENCE, M. S. *et al.* Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 495-501, Jan. 2014.

LEE, S.; LEE, J. W.; LEE, S. K. UTX, a histone H3-lysine 27 demethylase, acts as a critical switch to activate the cardiac developmental program. **Developmental Cell**, v. 22, n. 1, p. 25-37, Jan. 2012.

LI, T. *et al.* Histone deacetylase 6 in cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 11, n. 1, p. 111, Sep. 2018.

LLOYD, H. M. Primary hyperparathyroidism: an analysis of the role of the parathyroid tumor. **Medicine**, v. 47, n. 1, 53-71, 1968.

LLOYD, R. V. *et al.* **International Agency for Research on Cancer WHO classification of tumours of endocrine organs**, 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2017.

LUZI, E. *et al.* The negative feedback-loop between the oncomir Mir-24-1 and menin modulates the Men1 tumorigenesis by mimicking the "Knudson's second hit". **PLoS one**, v. 7, n. 6, p. e39767, Jun. 2012.

McGREGOR, D. H. *et al.* Functioning oxyphil adenoma of parathyroid gland. An ultrastructural and biochemical study. **The American Journal of Pathology**, v. 92, n. 3, p. 691-711, Sep. 1978.

MALBERTI, F.; FARINA, M.; IMBASCIATI, E. The PTH-calcium curve and the set point of calcium in primary and secondary hyperparathyroidism. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 14, n. 10, p. 2398-2406, Oct. 1999.

MARCOCCI, C.; CETANI, F. Clinical practice. Primary hyperparathyroidism. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 25, p. 2389-2397, Dec. 2011.

MARINI, F. *et al.* Parathyroid Tumors: Molecular Signatures. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 20, p. 11206, Oct. 2021.

MARX, S. J.; GOLTZMAN, D. Evolution of our understanding of the hyperparathyroid syndromes: A historical perspective. **Journal of Bone and Mineral Research**, p. 34, n. 1, p. 22-37, Jan. 2019.

MASTORAKI, A. *et al.* Assessment of synergistic contribution of histone deacetylases in prognosis and therapeutic management of sarcoma. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 24, n. 5, p. 557-569, Oct 2020.

MAZZIO, E. A.; SOLIMAN, K. F. Basic concepts of epigenetics: impact of environmental signals on gene expression. **Epigenetics**, v. 7, n. 2, p. 119-130, Feb. 2012.

MOHEBATI, A.; SHAHA, A. R. Anatomy of thyroid and parathyroid glands and neurovascular relations. **Clinical Anatomy**, v. 25, n. 1, p. 19-31, Jan. 2012.

MOVAFAGH, S.; MUNSON, A. Histone deacetylase inhibitors in cancer prevention and therapy. **Epigenetics of Cancer Prevention**, v. 8, p. 75-105, 2019.

MURAKAMI, K. *et al.* Water-clear cell adenoma associated with primary hyperparathyroidism: report of a case. **Surgery Today**, v. 44, n. 4, p. 773-777, Apr. 2014.

NASTOS, C. *et al.* Optimal extent of initial parathyroid resection in patients with multiple endocrine neoplasia syndrome type 1: A meta-analysis. **Surgery**, v. 169, n. 2, p. 302-310, Fev. 2021.

NICHOL, J. N. *et al.* H3K27 Methylation: A focal point of epigenetic deregulation in cancer. **Advances in Cancer Research**, v. 131, p. 59-95, 2016.

NTZIACHRISTOS, P. *et al.* Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v. 514, n. 7523, p. 513-517, Oct. 2014.

OGUS, M.; MAYIR, B.; DINCKAN, A. Mediastinal, cystic and functional parathyroid adenoma in patients with double parathyroid adenomas: a case report. **Acta Chirurgica Belgica**, v. 106, n. 6, p. 736-738, Nov-Dec. 2006.

ÖZDEN, S. *et al.* A rare cause of primary hyperparathyroidism: Parathyroid lipoadenoma. **Auris, Nasus, Larynx**, v. 45, n. 6, p. 1245-1248, Dec. 2018.

OSPINA, S. N. *et al.* Prevalence of parathyroid carcinoma in 348 patients with multiple endocrine neoplasia type 1 - case report and review of the literature. **Clinical Endocrinology**, v. 84, n. 2, p. 244-249, Feb. 2016.

PASCHON, V.; ALCARAZ, A. C.; KIHARA, A. H. Formação da memória está associada com mecanismos epigenéticos que são passados de geração para geração (Cérebro Lamarkiano). **Nanocell News**, v. 1, n. 11, p. 1-4, 2014.

PATEL, S. G. *et al.* Multimodal preoperative localization improves outcomes in reoperative p. parathyroidectomy: A 25-year surgical experience. **The American Surgeon**, 85, n. 9, p. 939-943, Sep. 2019.

PATRINOS, A. *et al.* An anatomic aberration and a surgical challenge: Mediastinal parathyroid adenoma anterior the pericardium. A case report. **International Journal of Surgery Case Reports**, v. 58, p. 153-156, Abr. 2019.

PAUL, A. *et al.* S. Oncocytic parathyroid adenoma. **European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases**, p. 132, n. 5, p. 301-303, Nov. 2015.

PEISSIG, K.; CONDIE, B. G.; MANLEY, N. R. Embryology of the Parathyroid Glands. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, p. 47, n. 4, p. 733-742, Dec. 2018.

PELLEGATA, N. S. *et al.* Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences of the United States of America, p. 103, n. 42, p. 15558-15563, Oct. 2006.

PETTI, G. J.; KIRK, G. A. Parathyroid imaging. **Otolaryngologic clinics of North America**, v. 29, n. 4, p. 681-691, 1996.

POLICENI, B. A.; SMOKER, W. R.; REEDE, D. L. Anatomy and embryology of the thyroid and parathyroid glands. **Seminars in Ultrasound, CT, and MR**, v. 33, n. 2, p. 104-114, Apr. 2012.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature Biotechnology**, v. 28, p. 10, p. 1057-1068, Oct. 2010.

PROSPERO, J. D. *et al.* Paratireoides: estrutura, funções e patologia, **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 53-57, 2009.

POTTS, J. T. Parathyroid hormone and parathyroid hormone related peptide in the regulation of calcium homeostasis and bone development. In: DEGROOT, L. J.; JAMESON, J. L. (eds.) **Endocrinology**. 4th Ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p. 969-998.

PUPPIN, C. *et al.* Levels of histone acetylation in thyroid tumors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 411, n. 4, p. 679-683, Aug. 2011.

RAHBARI, R. *et al.* Identification of differentially expressed microRNA in parathyroid tumors. **Annals of Surgical Oncology**, p. 18, n. 4, p. 1158-1165, Apr. 2011.

RICCARDI, A. *et al.* Analysis of Activating GCM2 Sequence Variants in Sporadic Parathyroid Adenomas. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 104, n. 6, p. 1948-1952, Jun. 2019.

RITTER, C. S. *et al.* Differential gene expression by oxyphil and chief cells of human parathyroid glands. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 97, n. 8, p. E1499-E1505, Aug. 2012.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Robbins Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. 1277p.

ROSEN, R. D.; BORDONI, B. **Embryology, Parathyroid**. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

ROSATO, R. R.; ALMENARA, J. A.; GRANT, S. The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1. **Cancer Research**, v 63, n. 13, p. 3637-3645, Jul. 2003.

- SÁNCHEZ-BEATO, M. *et al.* Variability in the expression of polycomb proteins in different normal and tumoral tissues. A pilot study using tissue microarrays. **Modern Pathology**, v. 19, n. 5, p. 684-694, May 2006.
- SCHIEDEL, M. *et al.* The Current State of NAD⁺ -Dependent Histone Deacetylases (Sirtuins) as Novel Therapeutic Targets. **Medicinal Research Reviews**, v. 38, n. 1, p. 147-200, Jan. 2018.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, Jul 2012.
- SANPAOLO, E. *et al.* EZH2 and ZFX oncogenes in malignant behaviour of parathyroid neoplasms. **Endocrine**, p. 54, n. 1, p. 55-59, Oct. 2016.
- SEIPEL, C. M. An English translation of Sandström's glandulae parathyroideae. **Bulletin of the Institute of the History of Medicine**, v. 6: p. 192-222, 1938.
- SILVA, B. C.; CUSANO, N. E.; BILEZIKIAN, J. P. Primary hyperparathyroidism. Best practice & research. **Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 32, n. 5, p. 593-607, Oct. 2018.
- SHINJO, S. K. *et al.* Manifestações musculoesqueléticas no hiperparatireoidismo primário. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 6, p. 703-711, Dez. 2009.
- SNOVER, D. C.; FOUCAR, K. Mitotic activity in benign parathyroid disease. **American Journal of Clinical Pathology**, v, 75, n. 3, p. 345-347, Mar, 1981.
- SPINELLI, C. *et al.* Primary hyperparathyroidism: fifth parathyroid intrathyroidic adenoma in a young patient. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 7-8, p. 781-784, 2012.
- STARKER, L. F. *et al.* The DNA methylome of benign and malignant parathyroid tumors. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 50, n. 9, p. 735-745, Set. 2011.
- STEELE-PERKINS, G. *et al.* protein-methyltransferase superfamily. **Genes & Development**, v. 15, n. 17, p. 2250-2262, Sep. 2001.
- STOJADINOVIC, A. *et al.* Parathyroid neoplasms: clinical, histopathological, and tissue microarray-based molecular analysis. **Human Pathology**, p. 34, n. 1, p. 54-64, Jan. 2003.
- SULAIMAN, L. *et al.* Global and gene-specific promoter methylation analysis in primary hyperparathyroidism. **Epigenetics**, v. 8, n. 6, p. 646-655, Jun. 2013.
- SUN, M. *et al.* Association between serum calcium and phosphorus levels and insulin-like growth factor-1 in Chinese children and adolescents with short stature. **International Journal of General Medicine**, p. 13, p. 1167-1173, Nov. 2020.

SUSHMA, P. S. *et al.* PTEN and p16 genes as epigenetic biomarkers in oral squamous cell carcinoma (OSCC): a study on south Indian population. **Tumour Biology**, v. 37, n. 6, p. 7625-7632, Jun. 2016.

SVEDLUND, J. *et al.* Aberrant WNT/ β -catenin signaling in parathyroid carcinoma. **Molecular Cancer**, v. 9, p. 294, Nov. 2010.

SVEDLUND, J. *et al.* Hypermethylated in cancer 1 (HIC1), a tumor suppressor gene epigenetically deregulated in hyperparathyroid tumors by histone H3 lysine modification. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 7, p. E1307-E1315, Jul. 2012.

SVEDLUND, J. *et al.* The histone methyltransferase EZH2, an oncogene common to benign and malignant parathyroid tumors. **Endocrine-related Cancer**, p. 21, n. 2, p. 231-239, Feb. 2014.

TANAKA, Y. *et al.* Oxyphil cell function in secondary parathyroid hyperplasia. **Nephron**, v. 73, n. 4, p. 580-586, 1996.

TFELT-HANSEN, J.; BROWN, E. M. The calcium-sensing receptor in normal physiology and pathophysiology: a review. **Critical reviews in Clinical Laboratory Sciences**, p. 42, n. 1, p. 35-70, 2005.

THEODORATOU, E. *et al.* Vitamin D and multiple health outcomes: umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies and randomised trials. **BMJ**, v. 348, p. g2035, Apr. 2014.

TRAN, N.; BROUN, A.; GE, K. Lysine demethylase KDM6A in differentiation, development, and cancer. **Molecular and Cellular Biology**, v. 40, n. 20, p. e00341-20, Sep. 2020.

TORRESAN, F.; IACOBONE, M. Clinical features, treatment, and surveillance of hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome: An up-to-date and review of the literature. **International Journal of Endocrinology**, p. 1761030, Dec. 2019. eCollection 2019.

UEMURA, M. *et al.* Overexpression of ribosomal RNA in prostate cancer is common but not linked to rDNA promoter hypomethylation. **Oncogene**, v. 31, n. 10, p. 1254-1263, Mar. 2012.

VAIRA, V. *et al.* The microRNA cluster C19MC is deregulated in parathyroid tumours. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 49, n. 2, p. 115-124, Jul. 2012.

VAIRA, V. *et al.* MicroRNAs in parathyroid physiopathology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 456, 9-15, Nov. 2017.

VAN DER WALT, J. Pathology of the parathyroid glands. **Diagnostic Histopathologic**, v. 18, n. 6, p. 221-233, 2012.

VAN HAAFTEN, G. *et al.* Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. **Nature Genetics**, v. 41, n. 5, p. 521-523, May. 2009.

VARSHNEY, S. *et al.* Methylation status of the CpG islands in vitamin D and calcium-sensing receptor gene promoters does not explain the reduced gene expressions in parathyroid adenomas. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 10, p. E1631-E1635, Oct. 2013.

VERDELLI, C.; CORBETTA, S. Epigenetic Alterations in parathyroid cancers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 310, Fev. 2017.

WANG, F. L. *et al.* Clinical and anatomic study of preserving parathyroid specific adipose attachments in total thyroidectomy. **Zhonghua Wai Ke Za Zhi**, v. 54, p. 859-863, Nov. 2016.

WEBBER, L. P. *et al.* Hypoacetylation of acetyl-histone H3 (H3K9ac) as marker of poor prognosis in oral cancer. **Histopathology**, v. 71, n. 2, p. 278-286, Aug. 2017.

WEI, T. T. *et al.* Prevention of colitis and colitis-associated colorectal cancer by a novel polypharmacological histone deacetylase inhibitor. **Clin Cancer Res**, v. 22, n. 16, p. 4158-4169, Aug 2016. Erratum in: **Clin Cancer Res**, v. 24, n. 2, p. 499, Jan 2018.

WEI, Z. *et al.* Whole-exome sequencing identifies novel recurrent somatic mutations in sporadic parathyroid adenomas. **Endocrinology**, v. 159, n. 8, p. 3061-3068, Aug. 2018.

WEN, G., WANG, H.; ZHONG, Z. Associations of RASSF1A, RAR β , and CDH1 promoter hypermethylation with oral cancer risk: A PRISMA-compliant meta-analysis. **Medicine**, v. 97, n. 11, p. e9971, Mar. 2018.

WENIG, B. M. Embryology, anatomy, and histology. In: **Atlas of Head And Neck Pathology**, Elsevier Health Sciences; 2008. p. 1012-1028.

WESTIN, G. Molecular genetics and epigenetics of nonfamilial (sporadic) parathyroid tumors. **Journal of Internal Medicine**, v. 280, n. 6, p. 551-558, Dec. 2016.

WIENEKE, J. A; SMITH, A. Parathyroid adenoma. **Head and Neck Pathology**, p. 2, n. 4, p. 305-308, Dec. 2008.

WERMERS, R. A. *et al.* Incidence of primary hyperparathyroidism in Rochester, Minnesota, 1993-2001: An update on the changing epidemiology of the disease. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 21, n. 1, p. 171-177, Dec. 2006.

XU, Y. *et al.* Secondary hyperparathyroidism and adverse health outcomes in adults with chronic kidney disease. **Clinical Kidney Journal**, v. 14, n. 10, p. 2213-2220, Jan. 2021.

YEH, M. W. *et al.* Incidence and prevalence of primary hyperparathyroidism in a racially mixed population. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 3, p. 1122-1129, Mar. 2013.

YOO, K. H. *et al.* Histone demethylase KDM6A controls the mammary luminal lineage through enzyme-independent mechanisms. **Molecular and Cellular Biology**, v. 36, n. 16, p. 2108-2120, Jul. 2016.

YOON, S.; EOM, G. H. HDAC and HDAC Inhibitor: From cancer to cardiovascular diseases. **Chonnam Medical Journal**, v. 52, n. 1, p. 1-11, Jan. 2016.

YUAN, Z. *et al.* Loss of MEN1 activates DNMT1 implicating DNA hypermethylation as a driver of MEN1 tumorigenesis. **Oncotarget**, v. 7, n. 11, p. 12633-12650, Mar. 2016.

ZHANG, S. *et al.* H3K27ac nucleosomes facilitate HMGN localization at regulatory sites to modulate chromatin binding of transcription factors. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 159, 2022.

9. Anexo

COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização do perfil de acetilação de histonas H3K9 em patologias cirúrgicas das glândulas paratireoides

Pesquisador: LUIZ CARLOS CONTI DE FREITAS

Área Temática: Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

Versão: 2

CAAE: 57680622.8.0000.5440

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RPUSP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.570.024

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas das Informações Básicas do Projeto, arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1868499.pdf", gerado pela Plataforma Brasil em 08/04/2022.

INTRODUÇÃO

O hiperparatireoidismo primário é mais comumente causado por um adenoma em uma das quatro glândulas paratireoides, enquanto cerca de 15 a 20% decorre de hiperplasia, e apenas 1% é causado por carcinoma. O hiperparatireoidismo secundário é em grande parte associado à falência renal. As características histopatológicas frequentemente não permitem um diagnóstico preciso e, além disso, não estão completamente esclarecidos os mecanismos moleculares envolvidos no processo de agravamento da doença. Mecanismos associados ao controle da expressão gênica têm sido estudados com o objetivo identificar características que diferenciem neoplasias e ajudem na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos, dentre os quais, a acetilação de histonas. O desequilíbrio entre a acetilação e a desacetilação de histonas parece favorecer o desenvolvimento de tumores. Esse estudo tem o objetivo de demonstrar o perfil de acetilação da histona 3 (H3K9) em diferentes tipos de patologias das glândulas paratireoides, tais como a hiperplasia, adenoma e

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.570.024

carcinoma de paratireoide. Serão analisadas 50 paratireoides de pacientes submetidos a paratireoidectomia por hiperparatireoidismo entre 2014 e 2019 no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do campus da USP em Ribeirão Preto. Serão coletados dados clínicos, demográficos e laboratoriais dos pacientes incluídos e será determinado ao grau de acetilação de histonas nos tecidos de paratireoides removidos assim como de biopsias de paratireoides normais. Para isso, as amostras serão encaminhadas ao laboratório de biologia epitelial da Universidade de Michigan, onde serão classificadas quanto a positividade para H3K9ac, por detecção imunohistoquímica. Dados clínicos e imuno-histoquímicos serão avaliados para determinar sua correlação com o grau de acetilação em amostras de hiperplasia e adenomas. Além disso, será analisada a aplicação da acetilação de histonas na diferenciação entre neoplasias benignas e malignas.

HIPÓTESE

Pouco se conhece, até o momento, sobre os mecanismos de regulação da expressão gênica envolvidos nas doenças das paratireoides. Especificamente, quanto à acetilação de histonas, trata-se de um novo campo de investigação totalmente inexplorado. A associação entre mecanismos de modificação de histonas por acetilação e a tumorigênese abriu uma nova possibilidade de pesquisa na identificação de marcadores diagnósticos e alvos terapêuticos. Após a observação inicial de redução na acetilação de lisina 16 na histona H4 em células neoplásicas (87), outros estudos buscaram associar acetilação de histonas ao prognóstico (39, 88-91) ou diagnóstico (92) diferencial de neoplasias benignas e malignas. A elevada desacetilação de histonas em diferentes neoplasias motivou estudos que avaliaram a capacidade de inibidores da desacetilação de histonas de prevenir o desenvolvimento do câncer. O sulforaphane, um inibidor de histona deacetilase (HDAC), em câncer de cólon e próstata levou a aumento da acetilação, com interrupção do ciclo celular ou apoptose, prevenindo o câncer (93-95). Formulações para aplicação tópica de inibidores de HDAC, MS-275 têm sido testadas no carcinoma espinocelular de pele em tumores induzidos por radiação UVB em ratos, parecendo promissor inclusive para uso em quimioprevenção(96). Assim, diante reconhecida importância do mecanismo regulação por acetilação de histonas na tumorigênese em diversos tecidos humanos, torna-se relevante a pesquisa do perfil de acetilação em glândulas paratireoides. Os conhecimentos gerados a partir desse estudo podem ser aplicados à diferenciação entre tumores benignos e malignos de paratireoide, uma vez que o diagnóstico histopatológico é pouco característico, frequentemente não-conclusivo, e muitas vezes fundamentado em informação clínicas. No hiperparatireoidismo secundário, a definição do padrão de acetilação irá colaborar no entendimento da fisiopatologia e a inter-relação entre essas

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.570.024

alterações e a evolução da doença. Adicionalmente, os dados obtidos podem determinar se as doenças das paratireoides são potencialmente suscetíveis a tratamentos direcionados ao perfil de histonas, uma vez que aplicação de inibidores da HDAC em patologias de paratireoide não foi sistematicamente estudada até o momento.

METODOLOGIA

Serão selecionadas retrospectivamente e aleatoriamente amostras de paratireoide de 50 pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto submetidos a paratireoidectomia no período de 2014 a 2019. Serão incluídas amostras de pacientes cujo diagnóstico clínico estabelecido foi de hiperparatireoidismo primário ou secundário e a análise histopatológica confirmou a existência de hiperplasia, adenoma ou carcinoma. As amostras parafinadas serão selecionadas no serviço de Patologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e encaminhadas para confecção das lâminas para imunoistoquímica. As lâminas para imuno-histoquímica serão enviadas ao Laboratory of Epithelial Biology, University of Michigan School of Dentistry, Ann Arbor, Michigan, USA onde serão processadas e analisadas. Os pacientes terão seus dados coletados em prontuário médico quanto as características demográficas e quanto as manifestações clínicas, tais como gênero, idade, ocupação e hábitos, bem como características da doença, e sintomas associados, tempo de doença, critérios considerados para definição de tratamento cirúrgico, perfil laboratorial relativo ao metabolismo do cálcio (medidas séricas de cálcio total, albumina, cálcio iônico, 25-hidroxi- colecalciferol, creatinina, fósforo, magnésio, fosfatase alcalina, paratormônio, medida da calciúria), determinação da condição cardíaca medida através de ecocardiograma, pesquisa de cálculos renais e nefrocalcinose. Serão excluídos os portadores de hiperparatireoidismo de origem familiar, doenças ósseas concomitantes não relacionadas, idade inferior aos 18 anos e pacientes que não realizaram o seguimento no Serviço. Para fins de comparação entre os tecidos, serão estudas amostras contendo os principais diagnósticos patológicos possíveis em glândulas paratireoides: hiperplasia, adenoma e carcinoma. Serão compostos 4 grupos, sendo 10 amostras de hiperplasias, 10 amostras de adenomas esporádicos, 5 amostras de carcinoma de paratireoide e um último grupo composto de 5 amostras de tecidos normais, coletados de pacientes com HPP, nos quais as glândulas normais tenham sido identificadas e biopsiadas. Os casos selecionados para o grupo de hiperplasias serão em sua totalidade portadores de insuficiência renal crônica. O menor número de amostras malignas deve-se a reduzida incidência de carcinomas de paratireoides. Histopatológica e imuno-histoquímica. Para os ensaios imunoistoquímicos, os cortes serão desparafinizados em dois banhos de xilol: um

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.570.024

de 16 horas e outro de 15 minutos, ambos em temperatura ambiente. Após desparafinação, os cortes serão hidratados em soluções aquosas de etanol em concentrações decrescentes (100%, 95% e 80%), por cinco minutos cada. Para a remoção do pigmento formólico, os cortes serão imersos em solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol a 95% por dez minutos seguidos de sete lavagens em água destilada. Para detecção de H3K9ac, a recuperação antigênica será realizada com os cortes imersos em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA 1,0mM), pH 8,0, em ciclo de quinze minutos, em câmara eletrônica de pressão (Decloaking Chamber NxGen, Biocare Medical, Pike Lane, Concord, CA, EUA) a 110oC e pressão de 6 a 8PSI. Expressão de H3K9ac em paratireoide como segue: H3K9ac (C5B11 9649, sinalização celular, tampão citrato em banho-maria a 90 ° C por 18 h, 1: 500, 1 h). As seções são então incubadas com tetrahidrocloro de diaminobenzidina (DAB) (Novocastra, Newcastle upon Tyne, Reino Unido) e contrastadas com hematoxilina de Mayer. Os controles negativos serão obtidos substituindo os anticorpos primários por soro não imune. Os controles positivos serão com seções de câncer de mama para H3K9ac.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Serão selecionadas aleatoriamente amostras de paratireoide de 50 pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto submetidos a paratireoidectomia no período de 2014 a 2019. Serão incluídas amostras de pacientes cujo diagnóstico clínico estabelecido foi de hiperparatireoidismo primário ou secundário e a análise histopatológica confirmou a existência de hiperplasia, adenoma ou carcinoma.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Serão excluídos os portadores de hiperparatireoidismo de origem familiar, doenças ósseas concomitantes não relacionadas, idade inferior aos 18 anos.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO

O objetivo do presente estudo é demonstrar o perfil de acetilação da histona 3 (H3K9) em diferentes tipos de patologias cirúrgicas das glândulas paratireoides, que se apresentam como hiperparatireoidismo, tais como, o adenoma esporádico, o carcinoma de paratireoide e a hiperplasia induzida por doença renal crônica comparativamente a paratireoides normais

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

a) Avaliar se o perfil de acetilação de histonas é capaz de diferenciar tumores benignos e malignos

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.570.024

das glândulas paratireoides de pacientes portadores de hiperparatireoidismo primário, comparando adenomas esporádicos e carcinomas de paratireoide.

b) Avaliar se o perfil de acetilação de histonas é capaz de se correlacionar com parâmetros clínicos e/ou laboratoriais em pacientes portadores hiperparatireoidismo primário causado por adenoma esporádico, ou hiperparatireoidismo secundário causado por hiperplasia de paratireoides em indivíduos portadores de doença renal crônica, submetidos a paratireoidectomia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Os riscos são exclusivamente relacionados a exposição de dados médicos ou pessoais sigilosos.

BENEFÍCIOS

Não há benefício direto aos pacientes que serão estudados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esse estudo tem o objetivo de demonstrar o perfil de acetilação da histona 3 (H3K9) em diferentes tipos de patologias das glândulas paratireoides, tais como a hiperplasia, adenoma e carcinoma de paratireoide. Serão analisadas 50 paratireoides de pacientes submetidos a paratireoidectomia por hiperparatireoidismo entre 2014 e 2019 no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do campus da USP em Ribeirão Preto. Serão coletados dados clínicos, demográficos e laboratoriais dos pacientes incluídos e será determinado ao grau de acetilação de histonas nos tecidos de paratireoides removidos assim como de biópsias de paratireoides normais. Para isso, lâminas serão encaminhadas ao laboratório de biologia epitelial da Universidade de Michigan, onde serão classificadas quanto a positividade para H3K9ac, por detecção imuno-histoquímica. Dados clínicos e imunohistoquímicos serão avaliados para determinar sua correlação com o grau de acetilação em amostras de hiperplasia e adenomas. Além disso, será analisada a aplicação da acetilação de histonas na diferenciação entre neoplasias benignas e malignas.

Grupo:

Pacientes submetidos a paratireoidectomia por hiperparatireoidismo entre 2014 e 2019 no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do campus da USP em Ribeirão Preto.

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**

Continuação do Parecer: 5.570.024

Previsão do número de participantes de pesquisa a serem incluídos no Brasil: 50.

O Protocolo propõe dispensa do TCLE.

Justificativa: Pesquisa apresenta caráter retrospectivo, por se tratar de levantamento de dados junto ao prontuário médico e utilização de amostra de tecido armazenado no Serviço de Patologia de pacientes submetidos a cirurgia e que já se encontram de alta ambulatorial. Serão confeccionadas lâminas que serão objeto do estudo. Os dados serão mantidos em sigilo e não há previsão de novo contato com o paciente, evitando assim aumento do risco de exposição de dados dos doentes.

Previsão de início do estudo: 02/05/2022.

Previsão de encerramento do estudo: 28/02/2023

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de análise de resposta ao parecer pendente nº 5.456.025, emitido pela Conep em 04/07/2022:

1. Quanto ao justificativa de dispensa do TCLE, arquivo "dispensa.pdf" submetido na Plataforma Brasil em 06/04/2022:

Na página 1 de 1, lê-se: Vimos por meio deste documento solicitar a dispensa de obtenção de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do projeto intitulado Caracterização do perfil de acetilação de histonas H3K9 em patologias cirúrgicas das glândulas paratireoides proposto por Luiz Carlos Conti de Freitas para os participantes sem possibilidades de contato (sem

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.570.024

acompanhamento regular na instituição), impossibilitando a obtenção do mesmo.". A justificativa apresentada pelo pesquisador para dispensa de TCLE está inadequada, uma vez que é possível solicitar o consentimento dos participantes com acompanhamento regular na instituição. De acordo com o exposto, solicita-se que seja inserido na Plataforma Brasil o TCLE adequadamente elaborado para que seja realizada a devida análise ética (Norma Operacional CNS nº 001 de 2013, item 3.3.g).

RESPOSTA: Ao me referir à pacientes sem possibilidades de contato, estava me referindo à totalidade dos pacientes estudados. Aceite minhas desculpas pela falha na elaboração do texto que mostrou dubiedade, dificultando o entendimento adequado. Reafirmo que estou impossibilitado de acessar os pacientes para assinatura de TCLE. Procedi, assim, com uma modificação no texto encaminhado previamente com o intuito de deixar claro que os pacientes do estudo não são mais acompanhados no Serviço. Solicito dessa maneira que seja reconsiderada a solicitação de dispensa do TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Quanto ao orçamento, arquivo intitulado "OrçamentoCEP.pdf", postado em 06/04/2022:

Solicita-se que seja apresentado orçamento financeiro mais detalhado, que especifique TODOS os recursos, fontes e destinação (Norma Operacional CNS nº 001 de 2013, item 3.3.e).

RESPOSTA: Conforme a solicitação, o orçamento foi ajustado com inserção das informações requeridas reverentes aos recursos, fontes e destinação.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.570.024

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|---------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1868499.pdf | 11/07/2022 18:34:01 | | Aceito |
| Outros | CARTARESPOSTA.pdf.pdf | 11/07/2022 18:31:40 | LUIZ CARLOS CONTI DE FREITAS | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | dispensaCONEPversaolimpa.pdf | 11/07/2022 18:30:52 | LUIZ CARLOS CONTI DE FREITAS | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | dispensaCONEPcommarcacao.pdf | 11/07/2022 18:30:18 | LUIZ CARLOS CONTI DE FREITAS | Aceito |
| Orçamento | OrcamentoCONEPcommarcacao.pdf | 11/07/2022 18:26:34 | LUIZ CARLOS CONTI DE FREITAS | Aceito |
| Orçamento | OrcamentoCONEPversaolimpa.pdf | 11/07/2022 18:22:50 | LUIZ CARLOS CONTI DE FREITAS | Aceito |
| Folha de Rosto | FolhaDeRostoAssinada1.pdf | 08/04/2022 14:33:34 | LUIZ CARLOS CONTI DE FREITAS | Aceito |
| Orçamento | AprovacaoOrcamento.pdf | 07/04/2022 17:29:20 | LUIZ CARLOS CONTI DE FREITAS | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Brochura.pdf | 06/04/2022 19:16:34 | LUIZ CARLOS CONTI DE FREITAS | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | instituicaodoexperiortraduzida.pdf | 06/04/2022 19:14:57 | LUIZ CARLOS CONTI DE FREITAS | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 12 de Agosto de 2022

Assinado por:
Laís Alves de Souza Bonilha
(Coordenador(a))

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br