

BUSCA DE MARCADORES MOLECULARES PREDITIVOS DO ACOMETIMENTO DE LINFONODOS EM CARCINOMAS PAPILÍFEROS DE TIREOIDE

MOLECULAR MARKERS PREDICTIVE OF LYMPH NODE INVOLVEMENT IN PAPILLARY THYROID CARCINOMAS

Maria Luiza Lopes de Oliveira¹
João Vitor Alcântara da Costa²
Luana Araujo da Silva³
Joyce Nascimento Santos⁴
Renata de Azevedo Canevari⁵

Resumo: O câncer de tireoide é a neoplasia que mais cresce em incidência todos os anos, sendo o carcinoma papilífero de tireoide (CPT) o subtipo mais comum. Em muitos casos estes tumores podem se tornar agressivos, ocasionando metástases linfonodais. A determinação de marcadores moleculares pela análise de expressão gênica é uma importante ferramenta para a determinação do prognóstico destes tumores. Considerando o papel dos genes *NEDD9*, *B3GNT7*, *PHB*, *BAD*, *PAXIP1*, *PPM1D* e *PIK3R5* na etiologia de diversos cânceres, este estudo consistiu em verificar pela técnica de RT-qPCR se os mesmos podem ser marcadores moleculares preditivos do acometimento de linfonodos e se estão relacionados ao desenvolvimento destes tumores. No presente estudo não foi observada expressão diferencial significativa dos genes analisados entre os grupos amostrais de CPT *versus* MCPT (microcarcinomas) e entre os grupos de CPT linfonodo positivo *versus* CPT linfonodo negativo, indicando que estes genes não estão relacionados ao desenvolvimento tumoral e não podem ser considerados marcadores preditivos de metástases em linfonodos em CPT.

Palavras-chave: Câncer de tireoide. Linfonodo. Expressão gênica. Marcador molecular.

Abstract: Thyroid cancer is the neoplasm with the fastest growing incidence every year, with papillary thyroid carcinoma (PTC) being the most common subtype. In many cases, these tumors can become aggressive, causing lymph node metastases. The determination of molecular markers by gene expression analysis is an important tool to determine the prognosis of these tumors. Considering the role of genes *NEDD9*, *B3GNT7*, *PHB*, *BAD*, *PAXIP1*, *PPM1D*, and *PIK3R5* in the etiology of several cancers, this study consisted in verifying, by the RT-qPCR technique, whether they can be molecular markers predictive of lymph node involvement, and if they are related to the development of these tumors. In the present study, no significant differential expression of the genes analyzed were observed between the sample groups of PTC *versus*

¹ Graduanda em Biomedicina, Iniciante Científica do laboratório de Biologia Molecular do Câncer, da Universidade do Vale do Paraíba – Univap. E-mail: malulopesdeoliveira@gmail.com.

² Graduando em Biomedicina, Iniciante Científica do laboratório de Biologia Molecular do Câncer, da Universidade do Vale do Paraíba – Univap. E-mail: joaovalcosta@gmail.com.

³ Graduanda em Biomedicina, Iniciante Científica do laboratório de Biologia Molecular do Câncer, da Universidade do Vale do Paraíba – Univap. E-mail: luana.araujo2000.LA@gmail.com.

⁴ Biomédica, habilitada em Análises clínica e Biologia molecular. E-mail: santosjoyce@gmail.com.

⁵ Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica - Mestrado Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D, na Universidade do Vale do Paraíba. E-mail: rcanevari@univap.br.

PTMC (microcarcinoma) and between the groups of lymph node-positive PTC *versus* lymph node-negative PTC, indicating that these genes are not related to tumor development and cannot be considered predictive markers of lymph node metastasis in PTC.

Key words: Thyroid cancer. Lymph node. Gene expression. Molecular marker.

Data de submissão: 02.12.2021

Data de aprovação: 28.03.2022

Identificação e disponibilidade:

(<https://revista.univap.br/index.php/revistaunivap/article/view/4350>,
<http://dx.doi.org/10.18066/revistaunivap.v28i59.4350>).

1 INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide é a nona malignidade mais incidente no mundo e desde as últimas décadas o número de casos tem aumentado consideravelmente (Youssef et al. 2022). Estima-se que para cada ano do triênio, sejam diagnosticados no Brasil, 13.780 novos casos de câncer de tireoide (Instituto Nacional do Cancer [INCA], 2019). Dentre os tipos histológicos, o carcinoma papilífero de tireoide (CPT) é a forma mais frequente, representando 80% de todas as malignidades da glândula (Xiang et al., 2020). Em estágios iniciais de desenvolvimento, esta neoplasia pode ter menos que 1.0 cm de diâmetro, e então ser definida como um microcarcinoma papilífero de tireoide (MCPT) (Malik et al. 2022). Em ambos os casos, há uma alta taxa de metástases linfonodais, o que pode causar um maior risco de recidiva e diminuição da qualidade de vida do paciente (Medas et al., 2020).

O protocolo para diagnóstico de nódulos tireoidianos inclui a avaliação clínica do paciente, ultrassonografia (US) e punção aspirativa por agulha fina (PAAF) (Borges et al. 2022). Entretanto, mesmo que a PAAF seja considerada o método padrão ouro para a caracterização dos nódulos de tireoide, a técnica é subjetiva, apresentando de 5 a 10% de resultados falsos negativos (San Laureano et al., 2020) e 15 a 30% de resultados indeterminados, fazendo com que na maioria das vezes seja necessária a realização da ressecção do nódulo (Oczko-Wojciechowska et al., 2020; Seneldir et al., 2020; Hejaz et al. 2022). Tendo em vista as dificuldades no diagnóstico preciso destes tumores, uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares que contribuem para a carcinogênese da tireoide poderá auxiliar na conduta clínica dos pacientes com nódulos citologicamente indeterminados pela PAAF e assim permitir um diagnóstico mais acurado e eficaz (Rodrigues et al., 2019; Xia et al. 2021; Chen et al. 2022), evitando cirurgias desnecessárias de ressecção, além de auxiliar em novas opções de prognóstico e tratamento dos pacientes (Joo et al. 2022).

Os eventos de migração e invasão celular são cruciais para o estabelecimento de metástases em diversos tipos de cânceres, e os genes *NEDD9*, *B3GNT7*, *PHB*, *BAD*, *PAXIP1*, *PPM1D* e *PIK3R5* são descritos por estarem relacionados ao desenvolvimento mais agressivo em inúmeros tipos tumorais. Estes genes possuem importantes funções, tais como reguladores da proliferação celular, diferenciação celular, migração, invasão, angiogênese, apoptose, quimiotaxia, contribuindo também para a divisão e sobrevivência celular (Paula et al., 2017; Fang et al., 2020; Dehghan et al., 2021; Liu et al. 2021; Yue et al. 2021; Bemmerlein et al. 2022).

Considerando a existência da relação dos genes *NEDD9*, *B3GNT7*, *PHB*, *BAD*,

PAXIP1, *PPM1D* e *PIK3R5* com o desenvolvimento de vários tipos de cânceres e ao aparecimento de metástases, e a escassez de estudos centrados na busca de marcadores moleculares preditivos de acometimento de linfonodos em CPT, principalmente de análise de expressão gênica, o presente trabalho possui o objetivo de avaliar se estes genes estão relacionados ao desenvolvimento do CPT e se possuem potencial para serem considerados marcadores preditivos do envolvimento de linfonodos nestes tumores.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob os números 4.242.722/CEP/2020 e 4.535.266/CEP/2020. Um total de 48 amostras provenientes de procedimentos cirúrgicos de biópsia excisional foram obtidas do Biobanco do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – USP/ICESP, sendo 18 amostras de CPT com acometimento de linfonodo (CPT+), 19 amostras de CPT sem acometimento de linfonodo (CPT-), 04 amostras de MCPT e 07 amostras de tecido não tumoral de tireoide, constituindo o grupo normalizador da RT-qPCR. Os tecidos utilizados foram analisados histopatologicamente, seguindo os critérios de diagnóstico da Sociedade Brasileira de Patologia para câncer de tireoide e foram utilizadas apenas as amostras com a presença de no mínimo 80% de células tumorais no fragmento de tecido tireoidiano obtido.

A extração do RNA foi realizada utilizando os métodos *Rneasy Mini Kit (Qiagen)* e *SV Total RNA Isolation System (Promega)*. A purificação do RNA e digestão do DNA foram realizadas de acordo com os protocolos *RNeasy® MinElute TM Cleanup Kit (Qiagen)* e *RNase-FreeDNase Set (Qiagen)*, respectivamente. A quantificação e qualidade do RNA foram analisadas pela espectroscopia de absorção ultravioleta no equipamento *NanoDrop (NanoDrop Inc., Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)* e a integridade avaliada pela eletroforese em gel de agarose a 2%. A síntese de cDNA foi realizada de acordo com o protocolo de pré-amplificação *ImProm-II TM Reverse Transcription System (Promega)*.

2.2 ANÁLISE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

Os iniciadores para amplificação dos genes selecionados *NEDD9*, *B3GNT7*, *PHB*, *BAD*, *PAXIP1*, *PPM1D* e *PIK3R5*, e do gene endógeno *MRPL19* foram desenhados no software Primer Express (versão 3.0) (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme tabela 1, atendendo as condições padrão para garantir especificidade com a sequência alvo. A detecção de alterações de expressão gênica por RT-qPCR foi realizada no equipamento *ABI PRISM 7500 Sequence Detection Systems (Life Technologies, USA)*, utilizando o protocolo *GoTaq® qPCR Master Mix (Promega)*. As condições da RT-qPCR consistiram em: desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguidos de quarenta ciclos com três etapas: desnaturação a 95°C por 4 quinze segundos, anelamento a 50°C por trinta segundos e extensão a 60°C por um minuto; e por fim, uma fase final a 4°C.

A curva de amplificação e de dissociação foram realizadas para todos os genes, e demonstraram uma correta amplificação dos genes alvo e também especificidade dos iniciadores utilizados e ausência de formação de *primers dimers*. Os *thresholds* foram

definidos em todas as análises de RT-qPCR.

A análise de expressão relativa dos genes alvo foi realizada pelo método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), onde o valor médio de Cts (*cyclethreshold*) obtido para o gene alvo foi comparado com a média do Cts do gene endógeno e, posteriormente, normalizado pela média das amostras normais. Os valores de QR (quantificação relativa) que consiste no valor obtido da expressão do gene normalizado no grupo experimental, dividido pela expressão do gene normalizado no grupo controle, foi calculado para cada gene analisado pela fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Os valores de QR menores ou iguais a 0.5 ($QR \leq 0.5$) indicam diminuição de expressão do gene alvo; os valores de QR superiores a 2.0 ($QR > 2.0$) indicam aumento de expressão do gene alvo, e valores de QR entre 0.5 e 2.0 indicam expressão normal.

A análise estatística dos dados da RT-qPCR foi realizada utilizando o programa *GraphPad Prism In Stat* (versão 6.00, San Diego, CA, EUA), incluindo o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* para a determinação significativa entre os grupos analisados. Os resultados foram considerados significativamente estatísticos com valores de $p \leq 0.05$.

Tabela 1 - Genes avaliados pela RT-qPCR, localização cromossômica, tamanho do amplicon e sequência dos iniciadores.

Gene	Localização cromossômica	Tamanho do amplicon	Sequência dos iniciadores
<i>NEDD9</i>	6p25-24	81 pb	5'-AGGCCCCTGACTGTAGCAGC-3' 5'-CCTTACCCTGTAGGTGGACGTAATC-3'
<i>B3GNT7</i>	2q37.1	81 pb	5'-CCACGTCCCCTTCATTTTCA-3' 5'-TGCCGGTCAGCCAGAAATT-3'
<i>PHB</i>	17q21-21	81 pb	5'-CCAGCATCGGAGAGGACTATGAT-3' 5'-CAAAGCGAGCCACCACTGAC-3'
<i>BAD</i>	11q13.1	81 pb	5'-CTTTAAGAAGGGACTTCCTCGCC-3' 5'-AAGACTCGCGTCCAGCTGG-3'
<i>PAXIP1</i>	7q36.2	81 pb	5'-AATGGCTTATTTGGCAGGTGC-3' 5'-CCAGTTGGTTCCTTACAGATGAGGACT-3'
<i>PPM1D</i>	17q23.2	81 pb	5'-TTGGAATATGATTCCACCACAAGA-3' 5'-CCATGCTCACCCATCAGGTATTT-3'
<i>PIK3R5</i>	17p13.1	79 pb	5'-ACGCTACGTGTTGTGGTCTTTG-3' 5'-CCAGCCGCCGAAGGTT-3'
<i>MRPL19</i>	2p11.1-q11.1	70 pb	5'-CAGAGATCAGGAAGAGGACTTGGA-3' 5'-TCTCGACACCTTGTCTTCGA-3'

Fonte: Os autores, 2021.

3 RESULTADOS

Todas as amostras de RNA extraídas apresentaram ausência de contaminação por proteínas e reagentes, representados pelas razões 260/280 e 260/230, respectivamente. As amostras também demonstraram integridade, sendo possível realizar a visualização das bandas 28S e 18S na eletroforese em gel de agarose, evidenciando pureza e qualidade necessárias para a realização das análises de expressão gênica pela RT-qPCR.

Duas análises foram realizadas para os valores de QR obtidos: a análise 1, que comparou os valores de expressão dos genes entre as amostras de CPT *versus* MCPT com o objetivo de avaliar se estes genes estão relacionados ao desenvolvimento destes tumores; e a análise 2, que comparou os valores de expressão entre as amostras de CPT+ *versus* CPT-, para verificar se estes genes possuem potencial preditivo de acometimento de linfonodos. Para ambas análises não foi observada diferença estatisticamente significativa (Teste de *Mann-Whitney*).

Tabela 2 - Valores de quantificação relativa (QR) para os genes *NEDD9*, *B3GNT7*, *PHB*, *BAD*, *PAXIP1*, *PIK3R5* e *PPM1D* e *p-value* obtidos pela comparação entre amostras de CPT *versus* MCPT (análise 1).

Amostra	Tipo histológico	Valores de QR para cada gene						
		<i>NEDD9</i>	<i>B3GNT7</i>	<i>PHB</i>	<i>BAD</i>	<i>PAXIP1</i>	<i>PIK3R5</i>	<i>PPM1D</i>
1	CPT+	0,61	14,06	0,21	1,24	106,9	5,55	0,26
2	CPT+	0,09	19,57	0,33	0,12	0,15	228,7	4,32
3	CPT+	0,021	6,52	0,64	0,11	0,22	2,56	2,56
4	CPT+	0,97	17,49	0,35	1,39	0,13	1,37	2,77
5	CPT+	0,07	271,6	0,21	0,81	0,33	0,32	2
6	CPT+	1,82	453,5	37,98	1,61	3,97	7,5	0,15
7	CPT+	2,67	634,9	8,79	1,92	8,61	35,32	4,11
8	CPT+	0,14	146,3	2,6	0,08	1,64	5148,7	0,09
9	CPT+	0,32	263,1	7,47	0,4	1,97	1,28	0,005
10	CPT+	4,01	23,54	4,69	1,23	1,55	16,36	4,3
11	CPT+	2,53	15,17	3,02	1,6	1,67	7,09	3,02
12	CPT+	1,38	59,21	7,8	1,41	2,7	2,77	1,89
13	CPT+	3,48	629,2	37,67	2,5	25,31	0,39	1,6
14	CPT+	3,01	230,4	14	1,95	11,49	10,18	4,73
15	CPT+	0,83	6,11	1,19	0,72	0,57	1,9	1,3
16	CPT+	1,24	34,24	1,48	0,96	1,28	3,88	2,62
17	CPT+	2,54	134,3	6,02	7,64	3,05	16,57	6,33
18	CPT+	2,53	334,4	18,66	1,47	6,33	6,02	0,68
19	CPT-	2,2	5683,2	46,37	12,84	196,2	22211,2	7,75
20	CPT-	16,84	13,61	29,5	0,011	1,87	486	60,77
21	CPT-	0,17	35,32	0,17	0,31	1,06	30,65	4,41
22	CPT-	48,67	1495,5	42,82	8,41	33,56	259,5	7,73
23	CPT-	6,37	2238,7	33,2	2,37	18,55	95,14	0,009
24	CPT-	0,51	0,82	1,43	0,45	0,52	0,71	0,44
25	CPT-	0,41	12,11	0,3	1,07	0,003	4,52	0,32

26	CPT-	0,9	2,5	0,18	0,47	0,7	0,16	0,025
27	CPT-	1,73	169,7	5,06	2,28	5,81	21,11	2,26
28	CPT-	3,28	1400,2	36,4	4,82	31,63	16349,4	2
29	CPT-	0,34	92,18	2,95	0,6	1,86	0,28	0,68
30	CPT-	1,19	26,9	3,38	0,54	1,23	1,05	2,47
31	CPT-	0,79	190,6	11,34	0,71	4,81	4,23	0,68
32	CPT-	0,97	0,08	0,76	0,47	0,89	1,02	1,47
33	CPT-	3,42	74,25	5,52	1,43	1,52	26,87	1,75
34	CPT-	6,26	23,76	0,11	7,09	2,7	NA	0,6
35	CPT-	1,45	0,002	0,02	0,12	0,01	0,001	0,23
36	CPT-	0,09	68,98	0,08	190,41	17,13	1,75	0,35
37	CPT-	2,89	0,83	12,08	7,18	0,92	5278,8	55,11
38	MCPT	8,77	1117,9	25,08	4,58	10,16	9,11	6,8
39	MCPT	0,53	0,08	0,03	0,009	0,02	0,37	0,32
40	MCPT	2,13	34,24	2,68	2,09	1,69	44,46	3,3
41	MCPT	1,84	119	6,67	2,02	4,34	5,4	5,36
Valor de P		0,5240	0,9825	0,8778	0,6445	0,9825	0,9461	0,2719

Legenda – QR: quantificação relativa, onde $QR \leq 0,5$: diminuição de expressão gênica em relação ao tecido não tumoral e $QR > 2,0$: aumento de expressão gênica em relação ao tecido não tumoral; CPT+: carcinoma papilífero de tireoide com acometimento de linfonodo; CPT-: carcinoma papilífero de tireoide sem acometimento de linfonodo. MCPT: microcarcinoma papilífero de tireoide.

Fonte: Os autores, 2021.

Tabela 3 - Valores de quantificação relativa (QR) para os genes NEDD9, B3GNT7, PHB, BAD, PAXIP1, PIK3R5 e PPM1D e p-value obtidos pela comparação entre amostras de CPT+ versus CPT- (análise 2).

Amostra	Tipo histológico	Valores de QR para cada gene						
		<i>NEDD9</i>	<i>B3GNT7</i>	<i>PHB</i>	<i>BAD</i>	<i>PAXIP1</i>	<i>PIK3R5</i>	<i>PPM1D</i>
1	CPT+	0,61	14,06	0,21	1,24	106,9	5,55	0,26
2	CPT+	0,09	19,57	0,33	0,12	0,15	228,7	4,32
3	CPT+	0,021	6,52	0,64	0,11	0,22	2,56	2,56
4	CPT+	0,97	17,49	0,35	1,39	0,13	1,37	2,77
5	CPT+	0,07	271,6	0,21	0,81	0,33	0,32	2
6	CPT+	1,82	453,5	37,98	1,61	3,97	7,5	0,15
7	CPT+	2,67	634,9	8,79	1,92	8,61	35,32	4,11
8	CPT+	0,14	146,3	2,6	0,08	1,64	5148,7	0,09
9	CPT+	0,32	263,1	7,47	0,4	1,97	1,28	0,005
10	CPT+	4,01	23,54	4,69	1,23	1,55	16,36	4,3
11	CPT+	2,53	15,17	3,02	1,6	1,67	7,09	3,02
12	CPT+	1,38	59,21	7,8	1,41	2,7	2,77	1,89
13	CPT+	3,48	629,2	37,67	2,5	25,31	0,39	1,6
14	CPT+	3,01	230,4	14	1,95	11,49	10,18	4,73
15	CPT+	0,83	6,11	1,19	0,72	0,57	1,9	1,3
16	CPT+	1,24	34,24	1,48	0,96	1,28	3,88	2,62
17	CPT+	2,54	134,3	6,02	7,64	3,05	16,57	6,33

18	CPT+	2,53	334,4	18,66	1,47	6,33	6,02	0,68
19	CPT-	2,2	5683,2	46,37	12,84	196,2	22211,2	7,75
20	CPT-	16,84	13,61	29,5	0,011	1,87	486	60,77
21	CPT-	0,17	35,32	0,17	0,31	1,06	30,65	4,41
22	CPT-	48,67	1495,5	42,82	8,41	33,56	259,5	7,73
23	CPT-	6,37	2238,7	33,2	2,37	18,55	95,14	0,009
24	CPT-	0,51	0,82	1,43	0,45	0,52	0,71	0,44
25	CPT-	0,41	12,11	0,3	1,07	0,003	4,52	0,32
26	CPT-	0,9	2,5	0,18	0,47	0,7	0,16	0,025
27	CPT-	1,73	169,7	5,06	2,28	5,81	21,11	2,26
28	CPT-	3,28	1400,2	36,4	4,82	31,63	16349,4	2
29	CPT-	0,34	92,18	2,95	0,6	1,86	0,28	0,68
30	CPT-	1,19	26,9	3,38	0,54	1,23	1,05	2,47
31	CPT-	0,79	190,6	11,34	0,71	4,81	4,23	0,68
32	CPT-	0,97	0,08	0,76	0,47	0,89	1,02	1,47
33	CPT-	3,42	74,25	5,52	1,43	1,52	26,87	1,75
34	CPT-	6,26	23,76	0,11	7,09	2,7	NA	0,6
35	CPT-	1,45	0,002	0,02	0,12	0,01	0,001	0,23
36	CPT-	0,09	68,98	0,08	190,41	17,13	1,75	0,35
37	CPT-	2,89	0,83	12,08	7,18	0,92	5278,8	55,11
	Valor de P	0,3864	0,4752	0,7962	0,5228	0,9458	0,6925	0,6927

Legenda – QR: quantificação relativa, onde $QR \leq 0,5$: diminuição de expressão gênica em relação ao tecido não tumoral e $QR > 2,0$: aumento de expressão gênica em relação ao tecido não tumoral; CPT+: carcinoma papilífero de tireoide com acometimento de linfonodo; CPT-: carcinoma papilífero de tireoide sem acometimento de linfonodo.

Fonte: Os autores, 2021.

Na análise 1, quando comparado o grupo de CPT *versus* MCPT, os genes *NEDD9* ($P = 0,5240$), *B3GNT7* ($P = 0,9825$), *PHB* ($P = 0,8778$), *BAD* ($P = 0,6445$), *PAXIP1* ($P = 0,9825$), *PPM1D* ($P = 0,2719$) e *PIK3R5* ($P = 0,9461$) não apresentaram expressão diferencial com relação aos grupos avaliados (figura 1). E com relação à análise 2, quando comparado o grupo de CPT+ *versus* CPT-, os genes *NEDD9* ($P = 0,3864$), *B3GNT7* ($P = 0,4752$), *PHB* ($P = 0,7962$), *BAD* ($P = 0,5228$), *PAXIP1* ($P = 0,9458$), *PPM1D* ($P = 0,6927$) e *PIK3R5* ($P = 0,6925$) também não apresentaram expressão diferencial com relação aos grupos avaliados (figura 2).

A determinação de um possível potencial diagnóstico de cada um desses genes também pode ser obtido por meio da observação dos valores de QR de cada gene para cada amostra tumoral (CPT+ e CPT-) quando comparados com os valores de QR considerados normais ($0,5 < QR < 2,0$). Para o gene *NEDD9*, sete amostras de CPT+ apresentaram expressão aumentada ($QR = 2,53$ a $4,01$); cinco amostras de CPT+ expressão reduzida ($QR = 0,021$ a $0,32$); seis amostras de CPT+ expressão normal ($QR = 0,61$ a $1,82$); oito amostras de CPT- expressão aumentada ($QR = 2,2$ a $48,67$); quatro amostras de CPT- expressão reduzida ($QR = 0,09$ a $0,41$); e sete amostras de CPT- apresentaram expressão dentro dos valores normais ($QR = 0,51$ a $1,73$). No grupo de amostras de MCPT duas amostras obtiveram expressão aumentada ($QR = 2,13$ a $8,77$), duas amostras tiveram expressão normal ($QR = 0,53$ a $1,84$) e em nenhuma amostra foi observado redução de expressão.

Para o gene *B3GNT7*, observou-se que todas as dezoito amostras de CPT+ apresentaram expressão aumentada ($QR = 6,11$ a $634,9$); quinze amostras de CPT-

expressão aumentada (QR = 2,5 a 5683,2); duas amostras de CPT- expressão reduzida (QR = 0,002 e 0,08); e duas amostras de CPT- expressão normal (QR = 0,82 e 0,83). No grupo de amostras de MCPT foi possível observar que todas três amostras apresentaram valores de expressão aumentada (QR = 34,24 a 1117,9) e uma amostra expressão reduzida (QR = 0,08).

Para o gene *PHB*, onze amostras de CPT+ apresentaram expressão aumentada (QR = 2,6 a 37,98); quatro amostras de CPT+ expressão reduzida (QR = 0,21 a 0,35); três amostras de CPT+ expressão normal (QR = 0,64 a 1,48); onze amostras de CPT- expressão aumentada (QR = 2,95 a 46,37); seis amostras de CPT- expressão reduzida (QR = 0,02 a 0,30); e duas amostras de CPT- expressão dentro dos valores normais (QR = 0,76 e 1,43). No grupo amostral de MCPT foi observada expressão aumentada em três amostras (QR = 2,68 a 25,08), duas amostras expressão normal (QR = 0,53 a 1,84) e uma amostra apresentou redução de expressão (QR = 0,03).

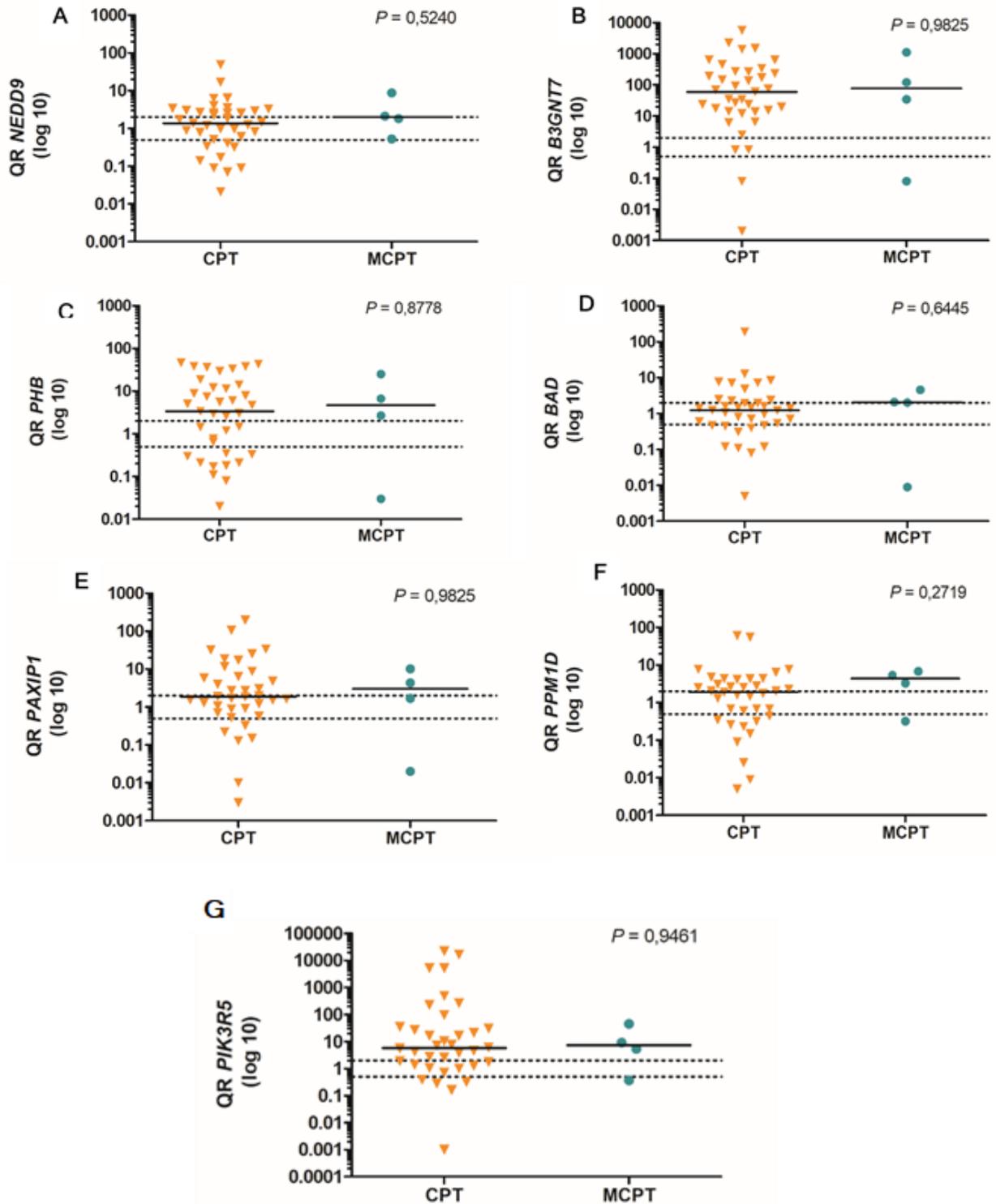
Para o gene *BAD*, observou-se que duas amostras de CPT+ apresentaram expressão aumentada (QR = 2,5 a 7,64); quatro amostras de CPT+ expressão reduzida (QR = 0,08 a 0,40) e doze amostras de CPT+ expressão normal (QR = 0,72 a 1,92); oito amostras de CPT- expressão aumentada (QR = 2,28 a 190,41); seis amostras de CPT- expressão reduzida (QR = 0,011 a 0,47); e cinco amostras de CPT- expressão normal (QR = 0,54 a 1,43). No grupo de amostras de MCPT foi possível observar que três amostras apresentaram expressão aumentada (QR = 2,02 a 4,58), e uma amostra expressão reduzida (QR = 0,009), não tendo nenhuma amostra com valor normal de expressão.

Para o gene *PAXIP1*, oito amostras de CPT+ apresentaram expressão aumentada (QR = 2,7 a 106,9); quatro amostras de CPT+ expressão reduzida (QR = 0,13 a 0,33) e seis amostras de CPT+ expressão normal (QR = 0,57 a 1,97); oito amostras de CPT- expressão aumentada (QR = 2,7 a 33,56); três amostras de CPT- expressão reduzida (QR = 0,003 a 0,091); e oito amostras de CPT- expressão dentro dos valores normais (QR = 0,52 a 1,87). No grupo de amostras de MCPT foi possível observar que duas amostras apresentaram expressão aumentada (QR = 4,34 a 10,16), uma amostra expressão reduzida (QR = 0,02), e uma amostra obteve valor normal de expressão (QR = 1,69).

Para o gene *PPM1D*, nove amostras de CPT+ apresentaram expressão aumentada (QR = 2,62 a 6,33); cinco amostras de CPT+ expressão reduzida (QR = 0,005 a 0,68) e quatro amostras de CPT+ expressão normal (QR = 1,3 a 2,0); sete amostras de CPT- expressão aumentada (QR = 4,41 a 60,77); cinco amostras de CPT- expressão reduzida (QR = 0,009 a 0,44); e sete amostras de CPT- expressão dentro dos valores normais (QR = 0,35 a 2,0). No grupo de amostras de MCPT foi possível observar que três amostras apresentaram expressão aumentada (QR = 3,3 a 6,8), e uma amostra expressão reduzida (QR = 0,32), não tendo nenhuma amostra com valor normal de expressão.

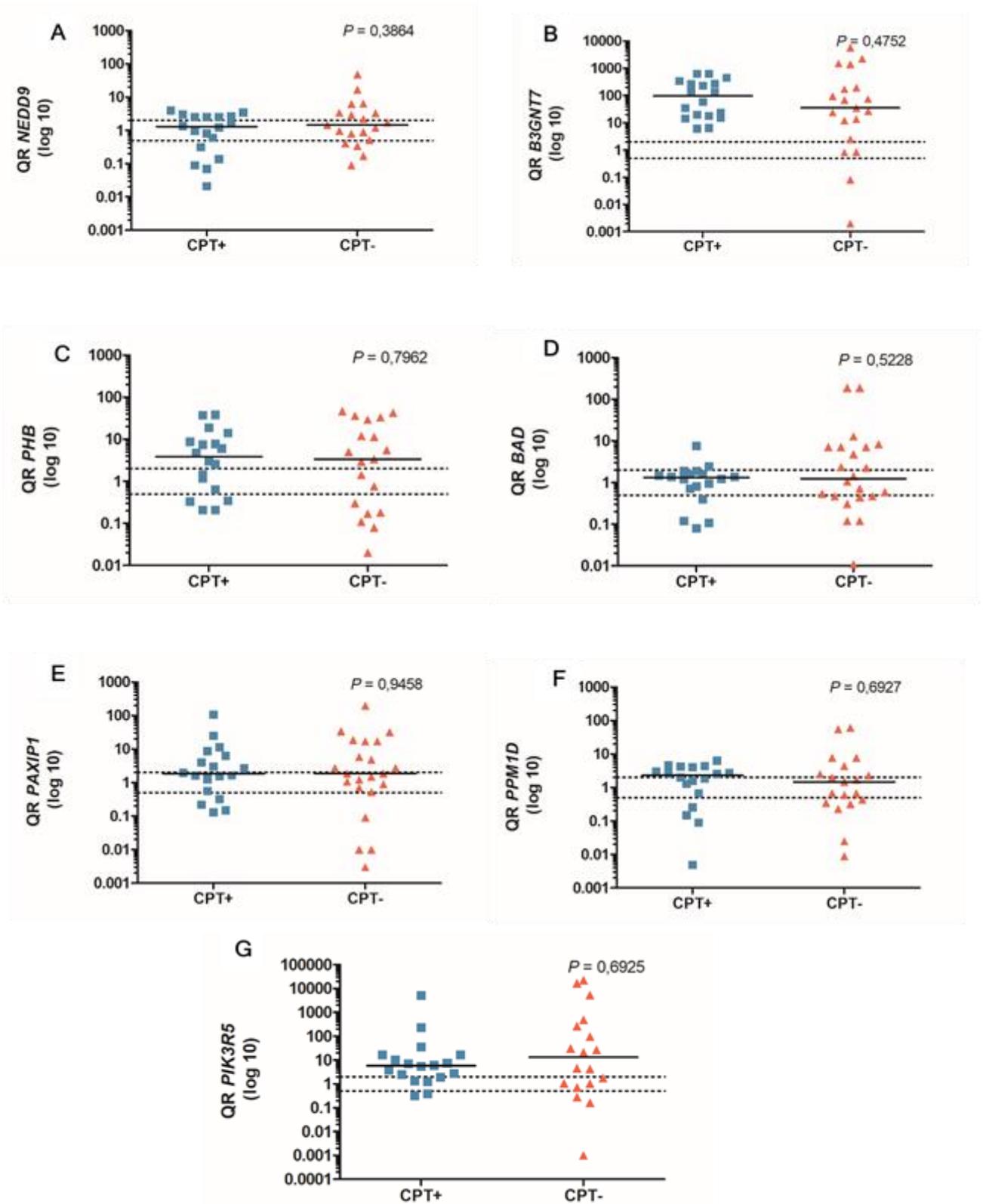
Para o gene *PIK3R5*, treze amostras de CPT+ apresentaram expressão aumentada (QR = 2,56 a 5148,7); duas de CPT+ expressão reduzida (QR = 0,32 a 0,39); três amostras de CPT+ expressão normal (QR = 1,28 a 1,90); onze amostras de CPT- expressão aumentada (QR = 4,23 a 22211,2); quatro amostras de CPT- expressão reduzida (QR = 0,001 a 0,28); e três amostras de CPT- expressão normal (QR = 0,71 a 1,05). No grupo de amostras de MCPT foi possível observar que três amostras apresentaram expressão aumentada (QR = 5,4 a 44,46), e uma amostra expressão reduzida (QR = 0,37).

Figura 1 - Comparação entre as medianas dos níveis de expressão gênica pela RT-qPCR dos genes *NEDD9* (A), *B3GNT7* (B), *PHB* (C), *BAD* (D), *PAXIP1* (E), *PPM1D* (F) e *PIK3R5* (G). Amostras de CPT versus MCPT. QR: quantificação relativa do gene. Cada símbolo na figura abaixo representa uma amostra.



Fonte: Os autores, 2021.

Figura 2 - Comparação entre as medianas dos níveis de expressão gênica pela RT-qPCR dos genes *NEDD9* (A), *B3GNT7* (B), *PHB* (C), *BAD* (D), *PAXIP1* (E), *PPM1D* (F) e *PIK3R5* (G). Amostras de CPT com acometimento de linfonodo (CPT+) versus CPT sem acometimento de linfonodo (CPT-). QR: quantificação relativa do gene. Cada símbolo na figura abaixo representa uma amostra.



Fonte: Os autores, 2021.

4 DISCUSSÃO

Nos estudos clínicos e patológicos realizados em tumores de tireoide, sabe-se que na grande maioria dos casos o primeiro sítio de metástase são os linfonodos cervicais, podendo acometer até 80% dos casos (Kim et al., 2020; Xiang et al., 2020). Em função disso, a identificação de genes marcadores com potencial preditivo que indiquem a presença de metástases linfonodais é de extrema importância, visto que estes marcadores moleculares poderão auxiliar na conduta clínica dos pacientes acometidos por estes tumores (Liu et al., 2019; Yu et al., 2020), diferenciando os casos que necessitam de ressecção dos linfonodos daqueles casos onde o procedimento pode ser descartado (Da Silva et al., 2020).

No presente estudo, para compreender melhor o perfil gênico no desenvolvimento dos CPTs e o potencial preditivo de genes específicos relacionados com migração celular, entre outras funções, foi avaliada a expressão de sete genes: *NEDD9*, *B3GNT7*, *PHB*, *BAD*, *PAXIP1*, *PPM1D* e *PIK3R5*, os quais além de possuírem papel de migração e proliferação celular, também desempenham funções associadas ao aparecimento de metástases e ao desenvolvimento mais agressivo de diversos tipos de tumores (Paula et al., 2017; Li et al., 2019; Fang et al., 2020; Bumbat et al., 2020; Wie, 2020; Liu et al. 2021; Bemmerlein et al. 2022). Nas duas análises realizadas não foi observada diferença estatisticamente significativa (CPT *versus* MCPT e CPT+ *versus* CPT-) para todos os genes analisados.

Para o nosso conhecimento, não existem estudos de literatura descritos que avaliem o poder preditivo desses genes em tumores de tireoide, sendo este um estudo pioneiro com esta abordagem. Previamente, em um estudo do nosso grupo, Paula et al. (2017) avaliaram o poder preditivo de envolvimento de linfonodos destes genes em tumores de mama utilizando a mesma técnica de RT-qPCR. Foi observado que apenas o gene *PIK3R5* exibiu expressão diferencial em amostras de tumores primários de CPT com envolvimento de linfonodos em comparação com tumores primários sem envolvimento de linfonodos, caracterizando este gene como marcador preditivo de envolvimento de linfonodos em tumores mamários.

O gene *NEDD9* atua na regulação de oncogenes e as suas implicações na iniciação tumoral e no desenvolvimento de metástases o torna um alvo importante a ser investigado como marcador molecular de doenças invasivas ou metastáticas (Yue et al. 2021). Embora a expressão deste gene esteja relacionada a um pior prognóstico, e desenvolvimento de metástases em vários tipos de cânceres, tais como tumores de mama (Bemmerlein et al. 2022), colorretal (Meng et al., 2019), pâncreas (Xue et al., 2021), renal (Ledinsky Opačić et al., 2019), estômago (Zhang et al., 2019), pulmão (Deneka et al. 2021) e hepatocelular (Zhou et al., 2017), no presente estudo não foi observada a sua relação com o desenvolvimento e predição do envolvimento de linfonodos nos tumores de tireoide. O papel do gene *NEDD9* tem sido determinante em uma progressão desfavorável de muitos tumores, mostrado inclusive por estudos que relacionaram a elevada expressão desse gene com resistência à quimioterápicos, e sobrevida reduzida (Hua et al. 2021).

O gene *B3GNT7* possui um importante papel na função migratória das células, bem como atua no ciclo e sobrevivência celular, promoção da motilidade e invasão tecidual (Lu et al., 2014; Paula et al., 2017). De acordo com Canevari et al. (2016), a expressão elevada deste gene está relacionada a um pior prognóstico e ao favorecimento de metástases em câncer de mama. Já em tecidos metastáticos de câncer de pulmão, Leiphakpam et al. (2019), notaram uma diminuição da expressão quando comparado com o tumor primário, e Lu et al. (2014) correlacionaram o

aparecimento de metástases em câncer de cólon com a supressão da expressão deste gene. Em câncer de tireoide, há poucos trabalhos relacionando este gene diretamente com o desenvolvimento destes tumores, como o estudo de Nikolova et al. (2008), que observou expressão aumentada deste gene nas 18 amostras de CPT avaliadas por meio da análise de *microarray*. Em nosso estudo não foi identificada expressão diferencial para o gene *B3GNT7* nas análises realizadas.

Na literatura, o gene *PHB* possui papel controverso, com função de regulador negativo da proliferação celular e também, responsável por desempenhar um papel importante na regulação e progressão do ciclo celular pela inibição da replicação do DNA, com estudos o evidenciando como supressor tumoral em carcinoma pancreático, nasofaríngeo, e ovariano (Barbier-Torres & Lu, 2020; Fang et al., 2020) e outros, sugerindo sua ação oncogênica, principalmente em carcinomas mamários e hepáticos (Liu et al., 2017; Barbier-Torres & Lu, 2020). No presente estudo, embora não tenha sido constatada a relação deste gene com a predição do envolvimento de linfonodos e com o desenvolvimento do CPT, a sua expressão aumentada observada em grande parte das amostras de CPT e MCPT sugere que os pacientes acometidos por estes tumores podem apresentar um pior prognóstico, uma vez que a sua expressão elevada em tumores de tireoide, de acordo com a literatura, está associada a um pior prognóstico (Yang et al., 2018; Spartalis et al., 2021).

O gene *BAD*, membro da família do gene *BCL2* com função de promover a apoptose e inibição do ciclo celular, tem sido sugerido como um marcador prognóstico com bons resultados clínicos em diversos tipos de câncer, porém os resultados nos diferentes estudos ainda são discordantes (Mann et al., 2019; Dehghan et al., 2021). Embora este gene tenha sido demonstrado como marcador de bom prognóstico em vários tumores (Wei et al., 2017; Bumbat et al., 2020), o mesmo resultado não foi detectado no presente estudo.

De acordo com estudos de literatura, o gene *PAXIP1* possui um importante papel na manutenção da estabilidade do genoma, condensação da cromatina e progressão da mitose (Jhuraney et al., 2017). A expressão reduzida deste gene foi significativamente relacionada a uma baixa sobrevida em câncer de ovário (Chen et al., 2021), e em câncer de mama (De Gregoriis et al., 2017) sugerindo que os seus níveis de expressão podem impactar diretamente no prognóstico do paciente. Entretanto, nesse estudo não foi possível observar expressão diferencial desse gene nas análises realizadas.

O gene *PPM1D* é um oncogene, com função de codificar proteínas conhecidas por regularem de forma negativa a resposta celular ao estresse, desempenhando também funções biológicas tais como apoptose e proliferação (Yin et al., 2019; Machiela et al., 2019). De acordo com Deng et al. (2020), este gene possui expressão aumentada em diversos tipos tumorais e sua alta expressão danifica a função do p53, promovendo tumorigênese, e culminando na ativação de outros oncogenes. Estudos do papel desse gene em tecidos de tireoide são escassos. Lu et al., (2020) evidenciaram o aumento da expressão do gene *PPM1D* em CPT quando comparado ao tecido normal, e que o *knockdown* deste gene suprimiu a proliferação, migração e invasão tecidual, demonstrando assim que *PPM1D* regula vias de sinalização do p38, MAPK e p53, além de promover a progressão do câncer de tireoide. Além disso, foi observado que este gene possui uma alta frequência de alterações genéticas, sendo um potencial biomarcador de diagnóstico e alvo terapêutico para o tratamento do câncer de tireoide (Lu et al., 2020). Entretanto, no presente estudo não foi observada a relação do gene *PPM1D* com o desenvolvimento e predição do envolvimento de linfonodos nas amostras analisadas.

O *PIK3R5* é um gene envolvido na proliferação, crescimento, diferenciação e motilidade celular, sendo classificado como um oncogene (Liu et al. 2021). De acordo estudos publicados, *PIK3R5* pode ser considerado um marcador preditivo de envolvimento linfonodal em tumores de mama (Paula et al., 2017), oncocitoma renal (Li et al., 2019) e em carcinoma ovariano (Li et al., 2019), sendo que em câncer de ovário este gene também está relacionado à quimioresistência. No presente estudo não foi observado diferença estatisticamente significativa em ambas análises realizadas.

Apesar de existirem estudos que detectaram marcadores moleculares, poucos têm sido utilizados efetivamente na rotina clínica com implicação preditiva ou prognóstica em câncer de tireoide, havendo assim a necessidade de pesquisas adicionais, com o objetivo de reduzir o número de pacientes que serão submetidos a procedimentos cirúrgicos, e assim tornar o tratamento mais efetivo. Os nossos resultados mostram que ainda que tenha sido observado expressão diferencial dos genes avaliados nas amostras de CPT em relação à expressão considerada normal, sugerindo um potencial diagnóstico nestes tumores, concluímos que estes genes não estão relacionados ao desenvolvimento tumoral e não podem ser considerados preditivos de metástases em linfonodos em CPT.

5 CONCLUSÃO

A ausência de expressão diferencial significativa dos genes *NEDD9*, *B3GNT7*, *PHB*, *BAD*, *PAXIP1*, *PPM1D* e *PIK3R5* na comparação entre os grupos amostrais de CPT *versus* MCPT e entre os grupos de CPT+ *versus* CPT-, indica que estes genes não estão relacionados ao desenvolvimento tumoral e não podem ser considerados preditivos de metástases em linfonodos em CPT. Contudo, ressalta-se a necessidade de estudos adicionais com um maior número amostral para validar estes resultados, destacando-se também a importância da busca de novos marcadores moleculares que possam auxiliar no diagnóstico e tratamento dos pacientes acometidos por esta neoplasia.

REFERÊNCIAS

- Barbier-Torres, L. & Lu, S. C. (2020). Prohibitin 1 in liver injury and cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 245(5), 385–394.
- Bemmerlein, L., Deniz, I. A., Karbanová, J., Jacobi, A., Drukewitz, S., Link, T., Göbel, A., Sevenich, L., Taubenberger, A. V., Wimberger, P., Kuhlmann, J. D. & Corbeil, D. (2022). Decoding Single Cell Morphology in Osteotropic Breast Cancer Cells for Dissecting Their Migratory, Molecular and Biophysical Heterogeneity. *Cancers*, 14(3), 603.
- Borges, F. A., Camilo-Júnior, D. J., Yamamoto, F. M., & Xavier-Júnior, J. C. C. (2022). Thyroid FNA performed by cytopathologists accompanied by radiologists guiding the ultrasound provide high-level quality results: A retrospective observational study. *Annals of Diagnostic Pathology*, 58, 151912
- Bumbat, M., Wang, M., Liang, W., Ye, P., Sun, W., & Liu, B. (2020). Effects of Me2SO and trehalose on the cell viability, proliferation, and Bcl-2 family gene

- (BCL-2, BAX, and BAD) expression in cryopreserved human breast cancer cells. *Biopreservation and Biobanking*, 18(1), 33-40.
- Canevari, R. A., Marchi, F. A., Domingues, M. A., de Andrade, V. P., Caldeira, J. R., Verjovski-Almeida, S., Rogatto, S. R. & Reis, E. M. (2016). Identification of novel biomarkers associated with poor patient outcomes in invasive breast carcinoma. *Tumor Biology*, 37(10), 13855-13870.
- Chen, B., Lu, X., Zhou, Q., Chen, Q., Zhu, S., Liu, H., & Li, G. (2021). LncRNA PAXIP1-AS1 is a Prognostic Biomarker and Correlated with Immune Infiltrates in Ovarian Cancer. *Research Square*, 12. DOI=10.3389/fgene.2021.697471
- Chen, J. V., Morgan, T. A., Liu, C., Khanafshar, E., & Choi, H. H. (2022). Cervical Lymph Node Features Predictive of Suboptimal Adequacy During Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration in Thyroid Cancer Patients. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 41(1), 135-145.
- Da Silva, R. M., Pupin, B., Bhattacharjee, T. T., Kulcsar, M. A. V., Uno, M., Chammas, R., & de Azevedo Canevari, R. (2020). ATR-FTIR spectroscopy and CDKN1C gene expression in the prediction of lymph nodes metastases in papillary thyroid carcinoma. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 228, 117693.
- De Gregoriis, G., Ramos, J. A., Fernandes, P. V., Vignal, G. M., Brianese, R. C., Carraro, D. M., Monteiro, A. N., Struchiner, C. J., Suarez-Kurtz, G., Vianna-Jorge, R. & de Carvalho, M. A. (2017). DNA repair genes PAXIP1 and TP53BP1 expression is associated with breast cancer prognosis. *Cancer biology & therapy*, 18(6), 439-449.
- Dehghan, M. H., Hedayati, M., Shivaee, S., Shakib, H., & Rajabi, S. (2021). Tamoxifen triggers apoptosis of papillary thyroid cancer cells by two different mechanisms. *Gene Reports*, 24, 101266.
- Deneka, A. Y., Kopp, M. C., Nikonova, A. S., Gaponova, A. V., Kiseleva, A. A., Hensley, H. H., Flieder, D. B., Serebriiskii, I. G., & Golemis, E. A. (2021). Nedd9 Restrains Autophagy to Limit Growth of Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer research*, 81(13), 3717-3726.
- Deng, W., Li, J., Dorrah, K., Jimenez-Tapia, D., Arriaga, B., Hao, Q., Cao, W., Gao, Z., Vadgama, J. & Wu, Y. (2020). The role of PPM1D in cancer and advances in studies of its inhibitors. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 125, 109956.
- Fang, C. H., Lin, Y. T., Liang, C. M., & Liang, S. M. (2020). A novel c-Kit/phospho-prohibitin axis enhances ovarian cancer stemness and chemoresistance via Notch3 - PBX1 and β -catenin - ABCG2 signaling. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 1-18.
- Hejaz, H. A., Abuzaina, I., Aldeen, R. N., & Saad, S. (2022). Currently Used and New Molecular Markers for Thyroid Cancer Diagnosis. *Middle East Journal of Cancer*, 13(2), 193-215.

- Hua, S., Feng, T., Yin, L., Wang, Q., & Shao, X. (2021). NEDD9 overexpression: Prognostic and guidance value in acute myeloid leukaemia. *Journal of cellular and molecular medicine*, 25(19), 9331-9339.
- Jhuraney, A., Woods, N. T., Wright, G., Rix, L., Kinose, F., Kroeger, J. L., Remily-Wood, E., Cress, W. D., Koomen, J. M., Brantley, S. G., Gray, J. E., Haura, E. B., Rix, U. & Monteiro, A. N. (2016). PAXIP1 Potentiates the Combination of WEE1 Inhibitor AZD1775 and Platinum Agents in Lung Cancer PAXIP1 Potentiates WEE1 Inhibitor Action. *Molecular cancer therapeutics*, 15(7), 1669-1681.
- Joo, L., Na, D., Kim, J., & Seo, H. (2022). Comparison of Core Needle Biopsy and Repeat Fine-Needle Aspiration in Avoiding Diagnostic Surgery for Thyroid Nodules Initially Diagnosed as Atypia/Follicular Lesion of Undetermined Significance. *Korean Journal of Radiology*, 23(2), 280-288.
- Kim, J., Kim, M., Choi, S., Choi, S., Choi, H., Lee, C., Kang, S.-W., Lee, J., Jeong, J. J., Nam, K.-H. & Chung, W. (2020). Cystic Lateral Lymph Node Metastases From Papillary Thyroid Cancer Patients. *The Laryngoscope*, 130(12), E976-E981.
- Li, L., Kim, H., Park, S., Lee, S., Kim, L., Lee, J., Kim, S., Kim, Y. T., Kim, S. W. & Nam, E. (2019). Genetic Profiles Associated with Chemoresistance in Patient-Derived Xenograft Models of Ovarian Cancer. *Cancer Research and Treatment*, 51(3), 1117-1127.
- Leiphrakpam, P. D., Patil, P. P., Remmers, N., Swanson, B., Grandgenett, P. M., Qiu, F., Yu, F. & Radhakrishnan, P. (2019). Role of keratan sulfate expression in human pancreatic cancer malignancy. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Ledinsky Opačić, I., Gršić, K., Šitić, S., Penavić, I., Pastorčić Grgić, M., & Šarčević, B. (2019). Positive expression of NEDD9 in head and neck cancer is related to better survival period. *Acta Clinica Croatica*, 58(4.), 655-660.
- Liu, P., Xu, Y., Zhang, W., Li, Y., Tang, L., Chen, W., Sun, Q. & Guan, X. (2017). Prohibitin promotes androgen receptor activation in ER-positive breast cancer. *Cell cycle*, 16(8), 776-784.
- Liu, T., Zhou, S., Yu, J., Guo, Y., Wang, Y., Zhou, J., & Chang, C. (2019). Prediction of lymph node metastasis in patients with papillary thyroid carcinoma: a radiomics method based on preoperative ultrasound images. *Technology in cancer research & treatment*, 18, 1533033819831713.
- Liu, Y., Jing, X. B., Wang, Z. C., & Han, Q. K. (2021). HCP5, as the sponge of miR-1291, facilitates AML cell proliferation and restrains apoptosis via increasing PIK3R5 expression. *Human genomics*, 15(1), 1-10.

- Lu, C. H., Wu, W. Y., Lai, Y. J., Yang, C. M., & Yu, L. C. (2014). Suppression of B3GNT7 gene expression in colon adenocarcinoma and its potential effect in the metastasis of colon cancer cells. *Glycobiology*, 24(4), 359-367.
- Lu, Z. W., Wen, D., Wei, W. J., Han, L. T., Xiang, J., Wang, Y. L., Wang, Y., Liao, T. & Ji, Q. H. (2020). Silencing of PPM1D inhibits cell proliferation and invasion through the p38 MAPK and p53 signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Oncology reports*, 43(3), 783-794.
- Machiela, M. J., Myers, T. A., Lyons, C. J., Koster, R., Figg, W. D., Colli, L. M., Jessop, L., Ahearn, T. U., Freedman, N. D., García-Closas, M. & Chanock, S. J. (2019). Detectible mosaic truncating PPM1D mutations, age and breast cancer risk. *Journal of human genetics*, 64(6), 545-550.
- Malik, A. A., Aziz, F., Beshyah, S. A., & Aldahmani, K. M. (2022). Characteristics and management of papillary thyroid microcarcinoma in the United Arab Emirates: Experience from a large tertiary hospital. *Saudi Journal of Medicine and Medical Sciences*, 10(1), 42.
- Mann, J., Githaka, J. M., Buckland, T. W., Yang, N., Montpetit, R., Patel, N., Li, L., Baksh, S., Godbout, R., Lemieux, H. & Goping, I. S. (2019). Non-canonical BAD activity regulates breast cancer cell and tumor growth via 14-3-3 binding and mitochondrial metabolism. *Oncogene*, 38(18), 3325-3339.
- Medas, F., Canu, G. L., Cappellacci, F., Boi, F., Lai, M. L., Erdas, E., & Calò, P. G. (2020). Predictive factors of lymph node metastasis in patients with papillary microcarcinoma of the thyroid: Retrospective analysis on 293 cases. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 551. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00551>
- Meng, H., Wu, J., Huang, Q., Yang, X., Yang, K., Qiu, Y., Zhu, J.-H., Li, B.-P., Wang, Z., & Qi, H. (2019). NEDD9 promotes invasion and migration of colorectal cancer cell line HCT116 via JNK/EMT. *Oncology Letters*, 18(4), 4022-4029.
- Instituto Nacional de Câncer “José Alencar Gomes da Silva”. (2019). *Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil*. Ministério da Saúde.
- Nikolova, D. N., Zembutsu, H., Sechanov, T., Vidinov, K., Kee, L. S., Ivanova, R., Becheva, E., Kocova, M., Toncheva, D. & Nakamura, Y. (2008). Genome-wide gene expression profiles of thyroid carcinoma: identification of molecular targets for treatment of thyroid carcinoma. *Oncology reports*, 20(1), 105-121.
- Oczko-Wojciechowska, M., Kotecka-Blicharz, A., Krajewska, J., Rusinek, D., Barczyński, M., Jarzab, B., & Czarniecka, A. (2020). European perspective on the use of molecular tests in the diagnosis and therapy of thyroid neoplasms. *Gland surgery*, 9(Suppl 2), S69.
- Paula, L. M., Moraes, L. H. F. D., Canto, A. L. D., Dos Santos, L., Martin, A. A., Rogatto, S. R., & Canevari, R. D. A. (2017). Analysis of molecular markers as predictive factors of lymph node involvement in breast carcinoma. *Oncology Letters*, 13(1), 488-496.

- Rodrigues, C. B. S., Silva, R. M., Pupin, B., & Canevari, R. A. (2019). Expressão do gene *cited1* em carcinoma papilífero de tireóide: um potencial marcador diagnóstico. *Revista Univap*, 25(49), 104-115.
- San Laureano, F. C., Alba, J. J. F., Heras, J. M. J., Millán, A. I. J., Fernández-Ladreda, M. T., & Ortega, M. D. C. A. (2020). Development and Internal Validation of a Predictive Model for Individual Cancer Risk Assessment for Thyroid Nodules. *Endocrine Practice*, 26(10), 1077-1084.
- Seneldir, H., Kir, G., Soylemez, T., Girgin, R. B., Ozbay, N., Ozen, F., Ankarali, H., Bas, G. & Alimoglu, O. (2020). Diagnostic accuracy of molecular testing with three molecular markers on thyroid fine-needle aspiration cytology with abnormal category. *Diagnostic Cytopathology*, 48(6), 507-515.
- Spartalis, E., Kotrotsios, K., Chrysikos, D., Spartalis, M., Paschou, S. A., Schizas, D., Tsamakis, K., Dimitroulis, D., Troupis, T. & Nikiteas, N. (2021). Histone Deacetylase Inhibitors and Papillary Thyroid Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 27(18), 2199-2208.
- Wei, Y., Yu, S., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhao, H., Xiao, Z., Yao, L., Chen, S. & Zhang, J. (2017). NDRG2 promotes adriamycin sensitivity through a Bad/p53 complex at the mitochondria in breast cancer. *Oncotarget*, 8(17), 29038.
- Wie, P. V. (2020). The role of NEDD9 in enhanced aggressiveness of hexavalent chromium transformed bronchial epithelial cells. *Toxicology and Cancer Biology*, p. 1–77.
- Xia, S., Chen, Y., Zhan, W., & Zhou, W. (2021). Ultrasound-guided fine-needle aspiration versus fine-needle capillary sampling in evaluation of lymph node metastasis of thyroid cancer. *Frontiers in oncology*, 11, 642142.
- Xiang, Z., Zhong, C., Chang, A., Ling, J., Zhao, H., Zhou, W., & Zhuo, X. (2020). Immune-related key gene *CLDN10* correlates with lymph node metastasis but predicts favorable prognosis in papillary thyroid carcinoma. *Aging (Albany NY)*, 12(3), 2825.
- Xue, Y., Wu, T., Sheng, Y., Zhong, Y., Hu, B., & Bao, C. (2021). MicroRNA-1252-5p, regulated by Myb, inhibits invasion and epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells by targeting NEDD9. *Aging (Albany NY)*, 13(14), 18924.
- Yang, J., Li, B., & He, Q. Y. (2018). Significance of prohibitin domain family in tumorigenesis and its implication in cancer diagnosis and treatment. *Cell death & disease*, 9(6), 1-10.
- Yin, Z., Yi, J., Nie, T., Yang, Z., Ding, N., Du, S. X., Liu, S. S. & Peng, T. (2019). Silencing of *PPMD1* inhibits proliferation of human colon cancer cells via induction of apoptosis and cell cycle arrest. *J BUON*, 24(4), 1464-1469.

- Youssef, M., Attia, A., Omar, M., Aboueisha, M., Freeman, M., Shama, M., & Kandil, E. (2022). Thyroid lobectomy as a cost-effective approach in low-risk papillary thyroid cancer versus active surveillance. *Surgery*, *171*(1), 190-196.
- Yu, J., Deng, Y., Liu, T., Zhou, J., Jia, X., Xiao, T., Zhou, S., Li, J., Guo, Y., Wang, Y., Zhou, J. & Chang, C. (2020). Lymph node metastasis prediction of papillary thyroid carcinoma based on transfer learning radiomics. *Nature communications*, *11*(1), 1-10.
- Yue, D., Liu, S., Zhang, T., Wang, Y., Qin, G., Chen, X., Zhang, H., Wang, D., Huang, D., Wang, F., Wang, L., Zhao, S. & Zhang, Y. (2021). NEDD9 promotes cancer stemness by recruiting myeloid-derived suppressor cells via CXCL8 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer biology & medicine*, *18*(3), 705.
- Zhang, C., Wang, T., Wu, H., Zhang, L., Li, K., Wang, F., Chen, Y., Jin, J. & Hua, D. (2019). HEF1 regulates differentiation through the Wnt5a/ β -catenin signaling pathway in human gastric cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, *509*(1), 201-208.
- Zhou, S., Xu, M., Shen, J., Liu, X., Chen, M., & Cai, X. (2017). Overexpression of NEDD9 promotes cell invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, *41*(6), 677-686.