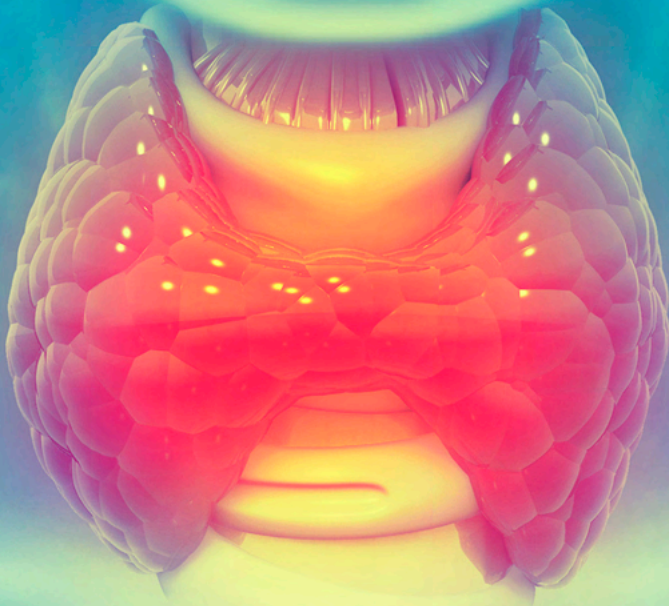


Amanda Carvalho Garcia  
Hans Graf



Boas Práticas Laboratoriais em  
Biologia Molecular em  
**Tireoide**

  
Ano 2022

Amanda Carvalho Garcia  
Hans Graf



Boas Práticas Laboratoriais em  
Biologia Molecular em

# Tireoide

 **Atena**  
Editora  
Ano 2022

**Editora chefe**

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

**Editora executiva**

Natalia Oliveira

**Assistente editorial**

Flávia Roberta Barão

**Bibliotecária**

Janaina Ramos

**Projeto gráfico**

Bruno Oliveira

Camila Alves de Cremo

Daphynny Pamplona

Luiza Alves Batista

Natália Sandrini de Azevedo

**Imagens da capa**

iStock

**Edição de arte**

Luiza Alves Batista

2022 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2022 Os autores

Copyright da edição © 2022 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo do texto e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

**Conselho Editorial****Ciências Biológicas e da Saúde**

Profª Drª Aline Silva da Fonte Santa Rosa de Oliveira – Hospital Federal de Bonsucesso

Profª Drª Ana Beatriz Duarte Vieira – Universidade de Brasília

Profª Drª Ana Paula Peron – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília

Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás



Prof. Dr. Cirênio de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira  
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco  
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará  
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí  
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. José Aderval Aragão – Universidade Federal de Sergipe  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Maurilio Antonio Varavallo – Universidade Federal do Tocantins  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá  
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Sheyla Mara Silva de Oliveira – Universidade do Estado do Pará  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Suely Lopes de Azevedo – Universidade Federal Fluminense  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Welma Emídio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco



## Boas práticas laboratoriais em biologia molecular em tireoide

**Diagramação:** Luiza Alves Batista  
**Correção:** Yaidy Paola Martinez  
**Indexação:** Amanda Kelly da Costa Veiga  
**Revisão:** Os autores  
**Autores:** Amanda Carvalho Garcia  
Hans Graf

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G216 Garcia, Amanda Carvalho  
Boas práticas laboratoriais em biologia molecular em  
tireoide / Amanda Carvalho Garcia, Hans Graf. – Ponta  
Grossa - PR: Atena, 2022.

Formato: PDF  
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader  
Modo de acesso: World Wide Web  
Inclui bibliografia  
ISBN 978-65-258-0461-3  
DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.613222007>

1. Biologia molecular. 2. Tireoide. I. Garcia, Amanda  
Carvalho. II. Graf, Hans. III. Título.

CDD 572.8

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

**Atena Editora**  
Ponta Grossa – Paraná – Brasil  
Telefone: +55 (42) 3323-5493  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
contato@atenaeditora.com.br



## DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao conteúdo publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que o texto publicado está completamente isento de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.



## DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, *desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.



## DEDICATÓRIA

*Dedico esta obra ao Senhor Jesus Cristo, Maravilhoso, Conselheiro, Deus Forte, Pai da Eternidade e Príncipe da Paz.*

*Aos meus pais, Mara Lúcia e Newton Cesar. Aos meus irmãos, Manoela e Jair Cesar.*

*Aos meus afilhados e sobrinhos, Maria Eduarda e Benjamim Emanuel.*

*Aos meus avós, Ana Henrieta e Jair Batista.*

*Aos meus avós, Alba e Manuel (in memoriam).*

*A minha família, pelo amor incondicional, por quem sou e por tudo o que alcancei.*

*Ao meu excelentíssimo orientador Professor Dr. Hans Graf e ao estimado Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.*

*Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES.*

*Aos meus amigos e Coordenadores do Programa PPGMICS-UFPFR.*



## EPÍGRAFE

*Teus, ó SENHOR, são a grandeza, o poder, a glória, a majestade e o esplendor, pois tudo o que há nos céus e na terra é teu. Teu, ó SENHOR, é o reino; tu estás acima de tudo. A riqueza e a honra vêm de ti; tu dominas sobre todas as coisas. Nas tuas mãos estão a força e o poder para exaltar e dar força a todos. Agora, nosso Deus, damos-te graças, e louvamos o teu glorioso nome.*

Bíblia NVI. 1 Crônicas, 2003, 29: 11-13

*A grandeza de um ser humano não está no quanto ele sabe, mas no quanto ele tem consciência que não sabe. Os que pensam ao contrário serão contaminados pelo orgulho, deixarão de ser construtores de novas ideias, passarão a ser repetidores de dados. Serão filhos do tédio e amantes da mesmice, e não desbravadores de novos espaços.*

Augusto Cury

## APRESENTAÇÃO

Esta obra é composta por nove capítulos, cujos conteúdos são direcionados as Boas Práticas Laboratoriais em Biologia Molecular de Tireoide, os quais integram os princípios de organização da base da vida nessa ampla diversidade de formas da lógica molecular. No primeiro capítulo, faremos uma introdução aos fundamentos básicos dos cuidados no laboratório e da importância de alguns princípios básicos do seu funcionamento. No segundo capítulo, abordaremos os princípios de pipetagem sobre o manuseio adequado pipetar, sendo uma fase que requer atenção do pesquisador para não ocorrer a dosagem do reagente ou insumo que está sendo utilizado.

No terceiro capítulo, trataremos das atividades de diluição dos primers, como prepará-lo para o uso, pois na grande maioria vem no estado liofilizado e precisa ser hidratado com o solvente correto, evitando assim a degradação do mesmo. Já no quarto capítulo, falaremos sobre o manejo dos reagentes e equipamentos no ambiente laboratorial, conhecer o insumo utilizado e manuseado é de extrema importância para a prevenção de acidentes e o manejo do mesmo, bem como da organização das atividades experimentais. Cada reagente tem suas propriedades físico-químicas assim como os equipamentos tem o modo e a forma correta de ser manejado.

No capítulo quinto descrevemos de modo sucinto sobre os nódulos de tireoide e a importância da sua classificação de acordo com o Sistema de Citopatologia de Tireoide Bethesda, que estabeleceu critérios que classificam os nódulos biopsiados provenientes da punção aspirativa por agulha de fina de tireoide (PAAF). Sabemos que a genética contribuiu muito para o avanço científico a qual influenciou positivamente na descoberta de biomarcadores para o câncer de tireoide, podemos ver no capítulo sexto. No capítulo 7, 8 e 9 abordamos sobre conceitos básicos que fundamentam a extração de DNA, a PCR e por fim a preparação do gel de agarose.

Desejamos que esta caminhada pelos das Boas Práticas Laboratoriais em Biologia Molecular de Tireoide contribua para a construção de um conhecimento básico teórico-prático. Este livro tem o objetivo de trazer informações que integram uma visão geral dos fundamentos básicos de biologia molecular em tireoide, que auxiliem aqueles que estão os primeiros passos ou que já tenham contato com o ambiente laboratorial.

Esperamos que, desse modo, o leitor possa ter uma maior clareza do conhecimento que fundamenta a lógica das noções das boas práticas laboratoriais em tireoide.

## SUMÁRIO














CUIDADOS NO LABORATÓRIO .....	1
PRINCÍPIOS DE PIPETAGEM.....	4
DILUIÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> .....	8
MANEJO DOS REAGENTES/EQUIPAMENTOS.....	11
NÓDULOS DE TIREOIDE.....	14
GENÉTICA DO CÂNCER DE TIREOIDE.....	22
EXTRAÇÃO DE DNA.....	26
PCR.....	29
PREPARAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DO GEL DE AGAROSE.....	32
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
REFERÊNCIAS.....	37
SOBRE OS AUTORES.....	39

# **CUIDADOS NO LABORATÓRIO**

## CUIDADOS NO LABORATÓRIO

No ambiente laboratorial procedimentos de segurança devem ser tomados, para o adequado desenvolvimento dos ensaios experimentais. O uso dos equipamentos de proteção individual (EPIs) é essencial para a segurança individual e coletiva.

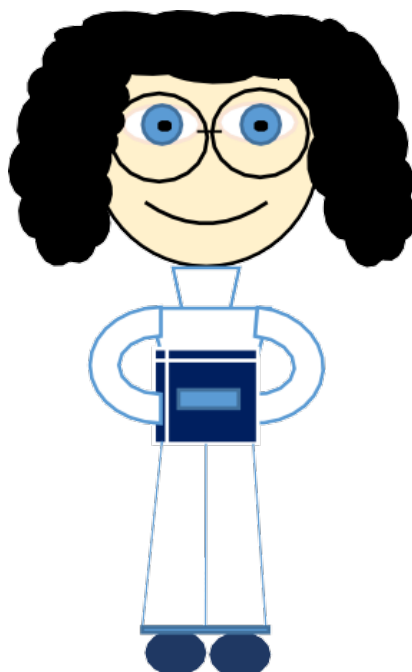
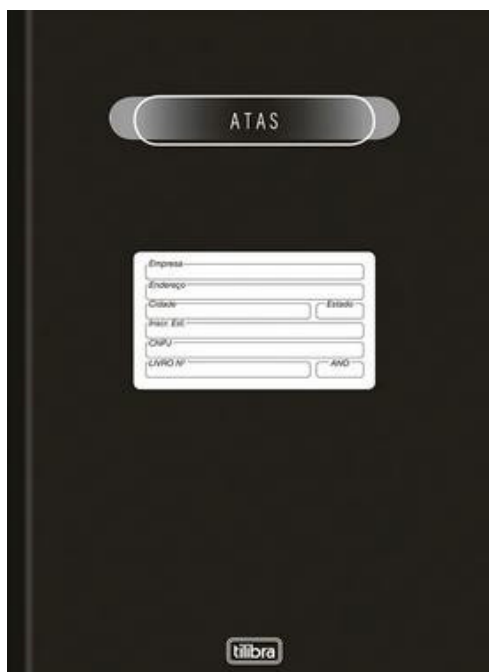
Algumas recomendações são importantes para trabalhar no laboratório:

-  Uso de jaleco ou avental de preferência de algodão, com mangas longas e na altura dos joelhos, que feche durante as realizações no laboratório de biologia molecular;
-  O uso de calçados fechados e calças compridas (para evitar o contato de reagente, caso respingue ou derrame);
-  É obrigatório o uso de EPIs (equipamentos de proteção individual) e EPCS (equipamentos de proteção coletiva);
-  É obrigatório o uso da capela de exaustão para descarte, pré-lavagem e o manuseio de recipientes com os reagentes químicos;
-  O uso de máscara com filtro apropriado para o manuseio de produtos voláteis e tóxicos;
-  Não alimentar, fumar ou usar produtos cosmético no laboratório;
-  O cuidado com lentes de contato é importante porque produtos voláteis podem causar danos e desconfortos;
-  Quando estiver lidando com reagentes ou amostra biológica evita-se levar as mãos aos olhos ou ao rosto;
-  Caso tenha algum equipamento de vidraria danificado, avise o responsável não use nos ensaios;
-  As amostras deverão ser armazenadas na temperatura adequada e certifique-se dos protocolos de ensaios antes de iniciar as atividades;
-  A identificação correta dos reagentes, amostras e produtos químicos é de extrema importância para não houver contaminação da amostra, uso inadequado dos insumos e resultando em danos no experimento;
-  Cuidado com equipamentos para os ensaios experimentais é essencial para o bom uso e desenvolvimento das atividades laboratoriais;
-  Nunca pipete com a boca, ou faça algum procedimento sem o devido conhecimento;

Cada reagente possui suas especificações a serem seguidas, bem como os protocolos dos ensaios experimentais, o descarte dos resíduos, a classificação dos produtos segundo a sua perigosidade e seu devido armazenamento, contribui para o gerenciamento do controle de qualidade e o desenvolvimento das atividades laboratoriais.

O conhecimento das boas práticas laboratoriais influencia nos resultados obtidos nos

experimentos. É recomendável anotar o roteiro de atividades a serem feitas, um caderno ata de protocolo é ideal para isso, pois, ter em mente a rotina de atividades é fundamental para o andamento adequado do experimento, pois diminui o risco de contaminação da amostra, o desperdício de reagentes ou insumos e de resultados não confiáveis.



# **PRINCÍPIOS DE PIPETAGEM**

## PRINCÍPIOS DE PIPETAGEM

As pipetas automáticas possuem capacidade de transferir volumes pequenos com alta reprodutibilidade e exatidão, onde apresenta volume ajustável e o volume máximo que pode dispensar. Sua exatidão proporciona dispensar volumes aproximados do volume de referência. A precisão das pipetas automáticas está relacionada com a reprodutibilidade de mensurações de um determinado volume expressa pelo desvio padrão (Tabela 1 e 2).

MODELO	VOLUME RECOMENDADO (ML)	VOLUME MÍNIMO (ML)
<b>p-2</b>	0,1 a 2	0,002
<b>P-10</b>	0,5 a 10	0,02
<b>P-20</b>	2 a 20	0,02
<b>p-100</b>	10 a 100	0,2
<b>P-200</b>	50 a 200	0,2
<b>p – 1000</b>	100 a 1000	2,0
<b>p – 5000</b>	500 a 5000	2,0

Tabela 1 – Volumes que as pipetas podem dispensar com exatidão e precisão.

PIPETA	VOLUME (ML)	EXATIDÃO ABSOLUTA (ML)	VOLUME MÍNIMO (ML)
<b>P-20</b>	2	0,1	0,04
	10	0,1	0,05
	20	0,2	0,06
<b>P-200</b>	50	0,5	0,2
	100	0,8	0,25
	200	1,6	0,3
<b>p – 1000</b>	100	3	0,61
	500	4	1
	1000	8	1,3

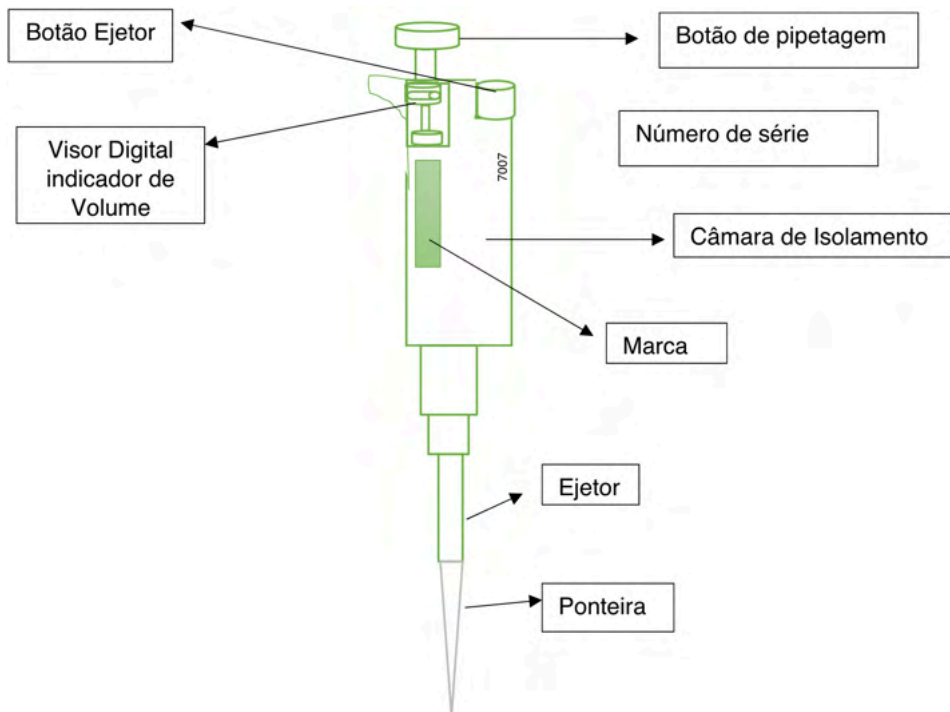
Tabela 2 – Exemplos de exatidão e precisão.

Na bancada experimental o uso de pipeta automática é de extrema importância para o preparo das reações, normalmente faz uso de pipeta monocal, pipeta multicanal com canaleta, estantes (racks) com as ponteiras conforme o volume e a pipeta a ser utilizada, recipientes para o descarte das ponteiras que foram utilizadas.

É importante ressaltar que cada pipeta possui o seu volume a ser dispensado, onde volumes fora da faixa de precisão resulta em erros de pipetagem e podem danificar as pipetas. Saber qual a pipeta a ser utilizada depende do volume dos reagentes, soluções ou amostras adequadas para aquela reação desejada.



Para o manuseio da pipeta algumas recomendações devem ser seguidas, entre elas, como ajustar o volume pelo botão de pipetagem para obter o volume desejado. O visor da pipeta é composto por três dígitos onde a leitura é realizada na direção do botão de pipetagem, sentido de encaixe da ponteira, e podem apresentar cores, vermelho para frações de números e preto para números inteiros (FIGURA 1).



Passos para pipetagem (Fig. 2):

1. Ajuste o volume desejado;
2. Aperte o botão de pipetagem até sentir o primeiro ponto de resistência;
3. Direcione a pipeta com o botão apertado até o eppendorf ou frasco contendo a amostra ou a solução a ser pipetada;
4. Coloque a pipeta na posição vertical para fazer a sucção do líquido e pressione devagar o botão para a posição inicial, para o líquido subir;
5. Verifique que o líquido sugado ocupou o volume desejado;
6. Direcione pipeta para o frasco ou eppendorf com cuidado e dispense o líquido até a primeira resistência, logo pressione até a segunda resistência, para que ocorra dispensação total do líquido na ponteira;

7. Mantenha o botão apertado no segundo ajuste e deslize com cuidado pela parede do recipiente, logo, volte o botão para a posição inicial;
8. Aperte o botão que ao lado do botão de pipetagem para efetuar o descarte da pipeta;

Em casos de líquido que possuem certa viscosidade é necessário o uso de pipetas específicas.

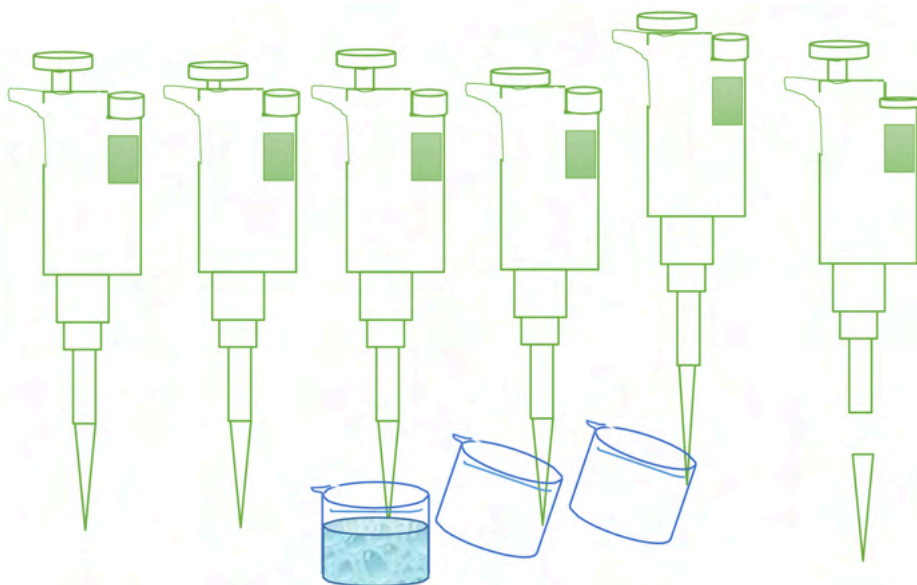


Fig. 2 – Procedimento de Pipetagem.

Alguns cuidados com que devem ser prestados para não danificar a pipeta automática e até perda da amostra:

- a. Não ultrapasse o volume máximo e não use o volume mínimo;
- b. Volume com densidade diferente da água deve ajustar empiricamente a densidade é a razão entre massa e volume, para não transferir volumes incorretos;
- c. Pipeta no sentido horizontal causa danos no sistema de armazenamento e pistões da pipeta;
- d. No uso de soluções corrosivas é necessário limpar adequadamente ou até mandar para uma assistência técnica;
- e. Na aspiração do líquido poderá ocorrer a formação de bolhas, por isso, é necessário dispensar o líquido no frasco de referência e prosseguir novamente com a aspiração;

# **DILUIÇÃO DOS *PRIMERS***

## DILUIÇÃO DOS PRIMERS

Os primers são sequências de oligonucleotídeos, ou seja, é a sequência específica a qual deseja amplificar através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Normalmente os primers chegam ao laboratório liofilizados, onde devemos reconstituí-los, para isso, é necessário seguir alguns procedimentos abaixo:

- Diluição dos primers esteja em uma concentração de  $>10\mu\text{M}$  para uso na rotina, já para armazenamento em estoque, recomenda-se deixar a  $100\mu\text{M}$ .
- Cuidados de assepsia com a manipulação dos primers para que não haja contaminação.

Realizar o cálculo para a diluição dos primers: o protocolo que vem juntamente com os primers possui o volume necessário para adicionar  $\text{H}_2\text{O}$  ou TE, caso não venha com o volume especificado, segue o cálculo a ser feito (Fig. 3):

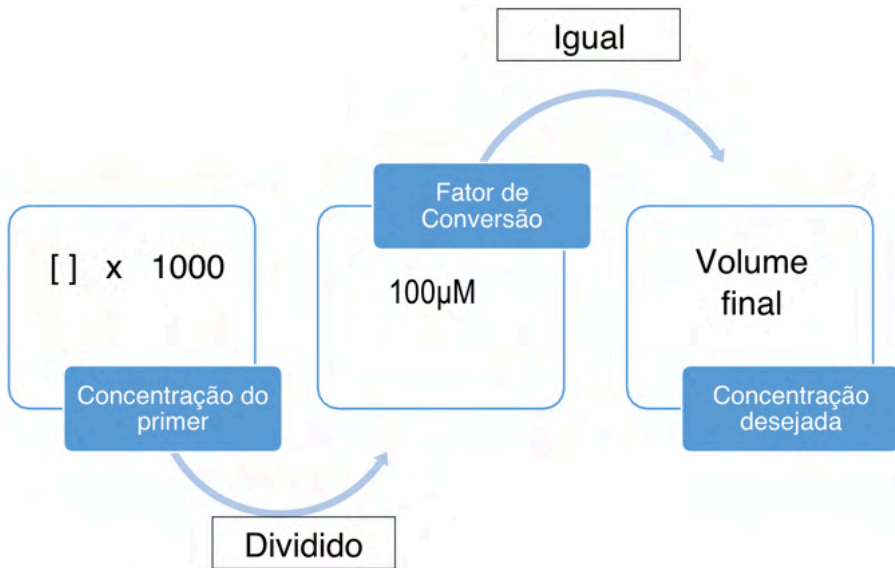


Fig.3 –Cálculo de solubilização dos *primers*.

- I. Centrifugue o tubo com o primer por alguns segundos (SPIN);
- II. Abra com cuidado o tubo de primer;
- III. Adicione  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura ou TE, deixe solubilizar por 2 minutos em temperatura ambiente;
- IV. Vortexar por 15 segundos;
- V. Alíquota o primer e armazena.

Os primers possuem um tempo de armazenamento:

-20°C = Material liofilizado possui estabilidade > 1 ano;  
-20°C = Material solubilizado possui estabilidade > 6 meses;  
4°C = Material solubilizado possui estabilidade até uma

**MANEJO DOS  
REGENTES/  
EQUIPAMENTOS**

## MANEJO DOS REAGENTES\EQUIPAMENTOS

Os reagentes devem ser manuseados seguindo as normas de padrões internacionais, considerando que todos material, sendo corrosivo, tóxico, radioativo, oxidante e desde o seu manejo, armazenamento, processamento, embalagem e transporte, podem causar danos a saúde, seguir as normas de segurança do laboratório é essencial para evitar acidentes.

Cada produto químico, reagente ou amostras devem ter identificação no rótulo ou no frasco, conforme a sua perigosidade para o devido armazenamento e ventilação específica que requer o produto em questão. Ao manipular os produtos utilize os equipamentos de segurança (EPIs), para evitar acidentes e contaminação do que está sendo manipulado.

Produtos devem ser guardados em frascos com identificação, adequada para a sua visualização; produtos ácidos devem ser locados para nas prateleiras inferiores; reagentes infláveis devem estar longe do alcance de fonte de ignição; soluções de hidróxidos inorgânicos devem ser armazenados em frascos de polietileno; produtos peroxidáveis devem ser armazenados em local escuro, seco e fresco. Após retirar alíquotas de reagentes feche o frasco e coloque no devido local de armazenamento.

Os produtos químicos são classificados de acordo com a sua perigosidade (Quadro 1):

Classes	Risco	Exemplos
<b>Tóxicos</b>	Envenamento através da inalação, absorção ou ingestão.	Benzeno, mercúrio, tetracloro de carbono
<b>Corrosivos</b>	Destroem tecidos vivos.	Ácidos e bases
<b>Inflamáveis</b>	Poder de combustão.	Acetona, ácido acético, álcool etílico.
<b>Explosivos</b>	Provocam choque ou Peróxido, perclorato impactado expostos ao de magnésio, calor, podem explodir. dicromato de amônio.	
<b>Oxidantes</b>	Oxidam	Composto com nível alto de oxigênio, óxidos, nitratos cloratos, percloratos, cromatos, dicromatos e permanganatos.
<b>Reagentes sensíveis a água</b>	Libera gases em meio água.	Metais alcalinos, hidretos metálicos.
<b>Gases comprimidos</b>	Gases não liquefeitos e sob pressão.	

Quadro 1- Classificação dos produtos químicos conforme a sua perigosidade<sup>1</sup>.

Os fatores de risco são representados por cores e formados por três círculos de tamanhos diferentes abaixo (Fig.4):


<b>Simbologia das Cores</b>  No mapa de risco, os riscos são representados e indicados por círculos coloridos de três tamanhos diferentes, a saber:			Risco Químico Leve		Risco Mecânico Leve
			Risco Químico Médio		Risco Mecânico Médio
			Risco Químico Elevado		Risco Mecânico Elevado
	Risco Biológico Leve		Risco Ergonômico Leve		Risco Físico Leve
	Risco Biológico Médio		Risco Ergonômico Médio		Risco Físico Médio
	Risco Biológico Elevado		Risco Ergonômico Elevado		Risco Físico Elevado

Fig. 4 – Simbologia das cores

Fonte: Modificado de Almeida (2008)<sup>2</sup>.

1 Referência: <https://www.abntcatalogo.com.br/abiquim/>

2 Referência: [https://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/imagem/img-simbolo/103simbologia\\_das\\_cores.gif](https://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/imagem/img-simbolo/103simbologia_das_cores.gif)



# **NÓDULOS DE TIROIDE**

# NÓDULOS DE TIREÓIDE

Os nódulos de tireoide acometem cerca de 60% dos adultos independentemente da quantidade de nódulos, sendo que 5% a 10% desses nós pequenos apresentam risco de malignidade tanto em homens ou mulheres, população modo geral (AMERICAN THYROID ASSOCIATION (ATA) GUIDELINES TASKFORCE ON THYROID NODULES AND DIFFERENTIATED THYROID CANCER et al., 2009; GRANI et al., 2020). O câncer de tireoide representa cerca de 66,8% dos casos de câncer endócrinos e 96% de mortalidade (SIEGEL, NAISHADHAM, JEMAL, 2013).

O exame clínico e ultrassonográfico é essencial para o diagnóstico e tratamento, alinhado com o histórico do paciente, sendo este tenha apresentado um aumento do tamanho da tireoide, rouquidão, disfagia, dispnéia, perda de peso, fadiga e irradiação na região da cabeça. O seguimento clínico deve ser considerado para avaliação mais profunda do paciente. Além disso, a deve ser observado se há linfonodos cervicais, pois na maioria dos casos de câncer de tireoide anaplásicos apresentam uma massa cervical, podendo ser acompanhado por febre e perda peso (GLIKSON et al., 1990).

A publicação do atlas do Sistema Bethesda de tireóide (Sistema Bethesda de Relatos Citopatológicos da Tireoide (TBSRTC, *The Bethesda system for Reporting Thyroid Cytopathology*), representou um marco no diagnóstico das PAAFs de tireóide. Ele contém definições citológicas e critérios morfológicos e de diagnósticos, levando à uma uniformidade na definição das alterações tireoidianas na utilização da aspiração por agulha fina, aprimorando o entendimento entre os citopatologistas e especialistas (BALOCH e LIVOLSI, 2008; BALOCH et al., 2008; CIBAS e ALI, 2009; KUNUKA et al., 2012; ALI e CIBAS, 2016; LIU et al., 2016).

O TBSRTC inclui seis categorias de diagnóstico baseado em evidências de relatos de casos clínicos de doença tireoidiana e cada categoria possui um risco de malignidade e gerenciamento clínico (BONGIOVANNI et al., 2012; PUSZTASZERI et al., 2016). São categorias bem definidas e morfológicamente distintas: não diagnóstico ou insatisfatório, benigno, atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado, neoplasia folicular ou suspeito de neoplasia folicular, suspeito de malignidade e maligno (CRIPPA et al., 2010; ALI, 2010; VICKIE et al., 2010).

## **Não diagnóstico ou Insastifatório (Categoria Bethesda I)**

Categoria composta por amostras de PAAF insatisfatória ou não-diagnóstico (ND) (CIBAS e ALI, 2009). Estes espécimes têm como característica um número insatisfatório de células foliculares e as preparações de esfregaços inadequadas devido à obscurecimento por sangue, esfregaço espesso, secagem ao ar, artefatos, entre outros contribuintes que interferem no diagnóstico (VICKIE et al., 2010). Para uma amostra de PAAF ser considerada

satisfatória segundo o sistema TBSRTC é necessário que a espécime apresente pelo menos 6 grupos de células foliculares e cada grupo seja composto de pelo menos 10 células (CIBAS e ALI, 2009; ALI, 2010; SANTOSH et al., 2013).

### **Benigno (Categoria Bethesda II)**

Inclui aspirados com proporções adequadas de células com variáveis colóides e células foliculares com arquitetura macrofolicular (ALI, 2010). As amostras consideradas benignas possuem características citomorfológicas de bócio coloidal e bócio adenomatoide, tireoidite de Hashimoto, tireoidite de *Quervain's*, ou tireoidite granulomatosa na doença de Graves (VICKIE et al., 2010). (CIBAS e ALI, 2009; ALI, 2010; SANTOSH et al., 2013).

### **Atipia de Significado Indeterminado ou Lesão Folicular de Significado Indeterminado (Categoria Bethesda III)**

Os aspirados de FNA na atipia de significado indeterminado (AUS) ou lesão folicular de significado indeterminado (FLUS) é composta de casos heterogênicos que possuem características difíceis de serem categorizadas como benigno, maligno ou suspeita (CIBAS e ALI, 2009; VICKIE et al., 2010). Segundo o Sistema Bethesda (TBSRT) o risco de malignidade foi estimado de 20 a 25% e são caracterizados em oito cenários específicos:

- 1) Predominância de microfóliculos em um ambiente celular espesso com coloide escasso;
- 2) Evidência de células de Hürthle, atipias de células foliculares com esfregaço inapropriado devido a contaminação por artefatos (secagem ao ar ou coagulação);
- 3) Aspirado celular com células virtuais de Hürthle sugestiva de tireoidite linfocítica crônica ou bócio multinodular;
- 4) Características focais de carcinoma papilar de aspecto predominante nucleares;
- 5) Aspirado benigno sugestivo de tireoidite linfocítica crônica;
- 6) Células de revestimento cístico podendo apresentar atipia, sulcos, núcleos alongados e/ou inclusões intracelulares no aspirado benigno;
- 7) Células foliculares focais atípicas (aumento nuclear, nucléolos predominantes, etc.) em casos de pacientes com histórico de iodo radioativo, reparo devido a evolução de lesão cística;
- 8) Amostras de FNA que apresentam infiltrado linfóide atípico não visualizado na fenotipagem por citometria de fluxo.

Nestes casos sugerem a repetição da aspiração por agulha fina da tireoide (ALI, 2010).

## **Suspeito de neoplasia folicular ou Neoplasia Folicular (Categoria Bethesda IV)**

Os aspirados de PAAF possuem características citomorfológicas moderadas com abundantes células, coloide escasso ou ausente, predominância de células microfoliculares ou trabéculas com arquitetura de células foliculares (SANTOSH et al., 2013). Embora seja visto como uma lesão significativamente suspeita, não se consegue diferenciar um carcinoma folicular de um adenoma folicular e normalmente os pacientes são encaminhados a uma tireoidectomia total ou lobectomia (ALI, 2010).

## **Suspeito de Malignidade (Categoria Bethesda V)**

Nesta categoria as amostras provenientes de PAAF são evidenciadas alterações sugestivas de carcinoma papilar, carcinoma medular ou linfoma (SANTOSH et al., 2013).

Há prevalência de características de malignidade, porém os dados quantitativos e/ou qualitativos dos espécimes são insuficientes para o diagnóstico de neoplasia maligna. Os casos de carcinomas papilares representam cerca de 60-70% suspeito de malignidade. Amostras sugestivas de neoplasia folicular devem ser classificadas na Categoria Bethesda IV (ALI, 2010).

## **Malignidade (Categoria Bethesda VI)**

Casos conclusivos de alterações citomorfológicas para malignidade com estimativa de 97 a 99% para diagnóstico de câncer. É recomendado uma intervenção cirúrgica para remoção dos nódulos malignos, exceto em tumores metastáticos, linfomas não Hodgkin e carcinomas indiferenciados (CIBAS e ALI, 2009; ALI, 2010).

O sistema Bethesda de Relatos Citopatológicos da Tireoide (TBSRTC), proporcionou uma uniformidade nos parâmetros citopatológicos, e não incluiu apenas as designações de diagnóstico para benigno e maligno encontrados nas lesões tireoidianas em espécimes de FAAF, como também para lesões “indeterminados para malignidade” (ALI e CIBAS, 2016). Para isso realizaram a subclassificação nas categorias e propuseram um risco implícito de malignidade com base em dados de literatura e diagnóstico clínico (PUSZTASZERI et al., 2016):

- I) Atipia de indeterminada significância (AUS) / lesão folicular de indeterminado significado (FLUS);
- II) Neoplasia folicular (FN) / Suspeita por neoplasia folicular (SFN)
- III) Suspeita para malignidade (SM).

A terminologia dos relatórios de qualidade e a reprodutibilidade do TBSRTC no âmbito global impactou significativamente o manejo dos nódulos tireoidianos com repercussão de ensaios moleculares para diagnósticos e aceitação pela Associação Americana de Tireoide (ATA) de diretrizes para pacientes adultos com nódulos tireoidianos e câncer diferenciado

de tireoide, 2015 (PUSZTASZERI et al., 2016; HAUGEN et al., 2017). A Variante Folicular do Carcinoma Papilífero de Tireoide não Invasivo e Encapsulado (VFCPT) apresenta uma prevalência de 20% dos cânceres de tireoide. Esta classe, VFCPT encapsulada e sem invasão vascular, é considerada atualmente como uma lesão benigna da (NIKIFOROV et al., 2016).

Nikiforov e colaboradores (2016) realizaram uma revisão de nomenclatura dos CPTVF e renomearam estes tumores como neoplasia folicular de tireoide não invasiva com aspectos nucleares de características papilífera (NIFPT, *Noninvasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-like Nuclear Features*). O NIFPT apresenta encapsulamento ou demarcação clara do tumor do tecido tireoidiano adjacente sem nenhuma invasão, padrão de crescimento folicular, expressão pelo menos moderada de aspectos nucleares do carcinoma papilífero e com baixo potencial de malignidade (FU et al., 2017; XU et al. 2017; WONG et al., 2017).

Segundo Cibas e Ali (2017) a recente reclassificação da neoplasia de tireoide como neoplasia folicular de tireoide não invasiva com aspectos nucleares de características papilífera (CPTVF), há implicações devido ao risco de malignidade de acordo com os critérios de diagnóstico. Nesta publicação de Cibas e Ali (2017) determinaram que a associação de risco de cada categoria está relacionada a recomendação do gerenciamento clínico atualizado e baseados em evidências, e que cada categoria possui risco implícito de malignidade entre 0% a 3% para benigno e 100% para maligno (Quadro 2).

---

## **I. NÃO DIAGNÓSTICO OU NÃO SATISFATÓRIO**

Extrato praticamente acelular

Outros (obscurecer sangue, artefatos de coagulação, etc.)

## **II. BENIGNO**

Consistente com um nódulo folicular benigno (inclui nódulo adenomatóide, nódulo coloidal, etc.) Consistente com tireoidite linfocítica (Hashimoto) em o contexto clínico apropriado Consistente com tireoidite granulomatosa (subaguda)

Outros

## **III. ATIPIA DE SIGNIFICADO NÃO INDETERMINADO OU LESÃO FOLICULAR DE SIGNIFICADO INDETERMINADO IV. NEOPLASIA FOLICULAR OU SUSPEITO PARA UMA NEOPLASIA FOLICULAR**

Específico do tipo de células de Hürthle (oncocítico)

## **V. SUSPEITO PARA MALINABILIDADE**

Suspeita para carcinoma papilar

Suspeita para carcinoma medular

Suspeita para carcinoma metastático Suspeito para linfoma

Outros

## **VI. MALIGNIDADE**

Carcinoma papilar de tireoide

Carcinoma pouco diferenciado Carcinoma medular da tiróide

Carcinoma indiferenciado (anaplásico) Carcinoma de células escamosas

Carcinoma com características misturadas (especificar) Carcinoma metastático

Linfoma não-Hodgkin

Outros

---

Quadro 2 – Categorias de diagnóstico segundo o Sistema Bethesda 2017 para Relatórios Citopatológicos de Tireoide. Modificado de CIBAS E ALI, 2017.

## **1 | PUNÇÃO ASPIRATIVA POR AGULHA FINA (PAAF)**

É um procedimento de diagnóstico para determina a natureza do nódulo tireoidiano, apresenta 90% de sensibilidade. A tireoide é uma glândula endócrina responsável pela produção hormônios que exercem papel funcional para o organismo humano. É localizada na parte anterior ao pescoço, região da garganta conhecida como “Pomo de Adão” ou “gogó”, seu formato é de “borboleta”, chega a pesar entre 25 a 25 gramas no adulto, cujo

tamanho varia entre 4 a 7cm de maior eixo <2cm de diâmetro, podendo variar de indivíduo.

Apesar de ser considerada um exame invasivo é fundamental para avaliação inicial nos casos de nódulo tireoidiano (Quadro 3). Resultados com amostras insuficientes representa cerca de 17% a 20%, pois depende da habilidade do profissional (Theoharis ET al., 2009). Além da punção aspirativa por agulha fina é integrada com exames bioquímicos para dosagens de T1, T2, T3, T4 e TSH, e ultrassonografia de tireoide pois este permite avaliação pelo médico da glândula. Dependendo do caso há necessidade de exames adicionais como a tomografia computadorizada ou cintilografia.

Nódulos de Tireoide iguais ou superior a 1,0 cm de aspecto ou composição sólidos, misto, único ou múltiplos ou não sólidos com microcalcificações.

Nódulos superiores a 0,5 cm com sugestiva de malignidade ao ultrassom.

Nódulos mistos (sólidos-císticos)  $\geq$  1,5 cm com sugestiva para malignidade com exame ultrassonográfico de tireoide de 2,0 cm ou mais, superior independentemente das características no ultrassom.

Nódulos com aumento de 50% em seu volume durante a fase de acompanhamento.

Quadro 3 – Indicação a punção aspirativa por agulha fina (PAAF).

Fonte: MONDAL et al., 2015.

A PAAF é um procedimento guiada por ultrassonografia independente se os nódulos são palpáveis, pois a visualização do nódulo pelo médico, realizando movimentos de vai e vem ajuda a inserir a agulha no ponto certo (Fig.5).

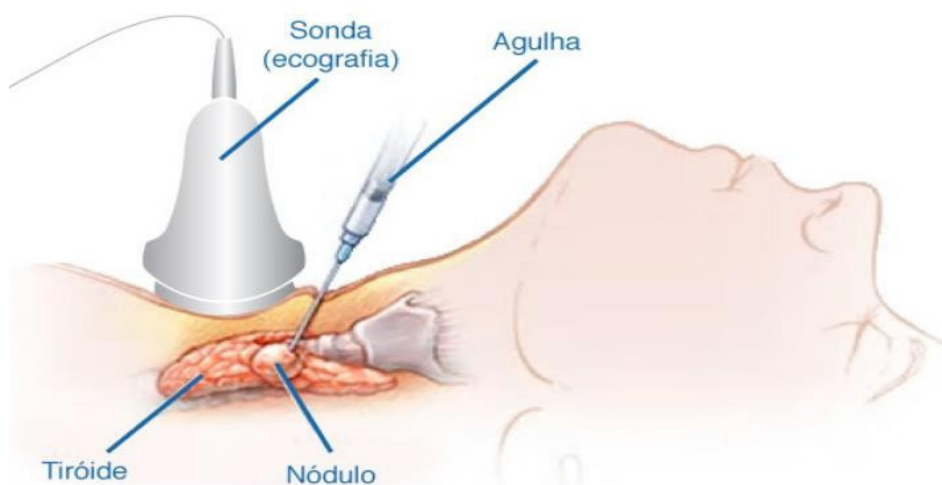


Fig. 5 – Punção aspirativa por agulha fina do nódulo tireoidiano guiada por ecografia.

Fonte: Modificado de <https://www.saudebemestar.pt/pt/exame/imagiologia/biopsia-da-tiroide/>.

Assim, os fragmentos são aspirados do tecido tireoidiano biopsiado, é feito um esfregaço em uma ou mais lâmina de citologia, onde são coradas por Giemsa ou Papanicolau e seguidas para análise do patologista. A análise citopatológica irá poder dizer se há malignidade ou não na citopunção. Com o resultado da análise poderá dar seguimento clínico ao paciente.

A citopunção pode parecer assustadora, mas não apresenta riscos eminentes, pode causar desconforto logo após a coleta, isso implica que o paciente relate ao médico o uso de medicamentos como anticoagulantes ou antiagregantes. O exame dura aproximadamente de 20 a 30 minutos e não compromete a rotina do paciente, pois pode retornar logo após ter feito a citopunção.

<b>Classe</b>	<b>Risco de malignidade (&amp;)</b>	<b>Conduta Clínica</b>
<b>Insatisfatório I</b>	1 a 4	Repetir a punção
<b>Benigno II</b>	0 a 3	Acompanhar
<b>Atipia ou lesão folicular de significado indeterminado III</b>	5 a 15	Repetir punção (intervalo de 3 a 6 meses)
<b>Neoplasia folicular ou suspeito para neoplasia folicular IV</b>	15 a 30	Realizar lobectomia
<b>Suspeito de malignidade V</b>	60 a 75	Realizar tireoidectomia total ou lobectomia
<b>Maligno VI</b>	97 a 99	Realizar tireoidectomia

Quadro 5 – Risco de malignidade e conduta clínica.

Fonte: modificado de Cibas e Ali (2017) e RUSS et al.,(2017).

O tumor benigno apresenta características tais como: não há invasão tecidual; não há metástases e pode ser removido casos seja necessário. Já o tumor maligno pode afetar os demais órgãos e haver metástases, na maioria dos casos deve ser removido para evitar recidiva tumoral (BONGIOVANNI et al., 2011; BONGIOVANNI et al., 2012).



# **GENÉTICA DO CÂNCER DE TIROIDE**

## GENÉTICA DO CÂNCER DE TIREOIDE

O parênquima da glândula tireoide é composto histologicamente por dois tipos principais de células. As células epiteliais foliculares revestem os colóides, concentram iodo e produzem os hormônios da tireoide. Estas células dão origem a ambos os cânceres de tireoide bem diferenciados (o papilífero e o folicular) e ao carcinoma anaplásico de tireoide. O segundo tipo celular consiste na célula C ou parafolicular, que é produtora do hormônio calcitonina e dá origem ao carcinoma medular de tireoide (MTC) (CARLING E UDELSMAN, 2014).

O câncer diferenciado de tireoide (DTC) é câncer de tireoide mais comum, representando mais de 95% dos casos, e inclui o carcinoma papilífero de tireoide (CPT), o carcinoma folicular de tireoide (CFT) e carcinoma de células de Hurthle. O carcinoma de tireoide pouco diferenciado é um câncer de tireoide, derivado das células foliculares, mais agressivo que o DTC (CABANILLAS ET AL., 2016). O CPT é o subtipo mais comum e que carrega o melhor prognóstico geral. Metástases mais comumente envolvem linfonodos cervicais e, menos comumente, os pulmões. O CFT, o carcinoma de células de Hurthle e o carcinoma de tireoide pouco diferenciado são cânceres de alto risco e que tendem a se disseminar por via hematogênica para sítios distantes, particularmente para o pulmão e ossos. O sistema de estadiamento para o DTC depende da idade, sendo o prognóstico pior para pacientes mais velhos ( $\geq 45$  anos de acordo com o sistema atual) (CABANILLAS ET AL., 2016).

O carcinoma anaplásico (indeferenciado) de tireoide é uma forma rara de câncer de tireoide (<1%) que geralmente se apresenta como uma massa cervical de rápido crescimento. Os locais mais comumente afetados por metástases a distância são os pulmões, seguidos pelos ossos e cérebro. O carcinoma anaplásico de tireoide geralmente surge a partir e/ou pode coexistir com o DTC. Os médicos devem suspeitar de transformação anaplásica em pacientes com história de DTC de longa data e que apresentam uma massa cervical. O prognóstico dessa neoplasia é ruim (CABANILLAS ET AL., 2016).

O carcinoma medular de tireoide é raro, sendo responsável por 1–2% de todos os cânceres de tireoide. Em contraste com o DTC, o carcinoma medular de tireoide origina-se nas células neuroendócrinas parafoliculares da tireóide. Se apresenta, mais comumente, como um nódulo tireoidiano em pacientes na quarta a sexta década de vida. 70% dos pacientes com carcinoma medular de tireoide palpável apresentam disseminação para linfonodos cervicais, no momento da cirurgia (CABANILLAS ET AL., 2016).

O diagnóstico de câncer de tireoide, especificamente o carcinoma papilífero de tireoide, teve um aumento de 240% na incidência nas últimas três décadas. Embora a maioria dos cânceres de tireoide recém-diagnosticados sejam CPTs pequenos, tem ocorrido uma maior incidência em todos os tamanhos e estágios do CPT, em ambos gêneros e em todos os grupos étnicos. O CPT é a malignidade endócrina mais comum, representando

96,0% do total de novos cânceres do sistema endócrinos e 66,8% das mortes por câncer endócrino (CARLING E UDELSMAN, 2014).

A grande maioria dos cânceres de tireóide se apresenta como um nódulo tireoidiano detectado pelo paciente rotineiramente, e/ou pelo médico através do exame físico ou de exames de imagem do pescoço, como a ultrassonografia (US). Uma minoria dos nódulos tireoidianos é maligna. Existe uma probabilidade de cerca de 5-10% de malignidade dos nódulos de tireóide detectados na população geral, mas homens e pacientes nos extremos da idade possuem um maior risco (CARLING E UDELSMAN, 2014).

A American Thyroid Association (ATA) lançou uma diretriz em 2015, recomendando que os nódulos tireoideanos sejam biopsiados, pela punção aspirativa com agulha fina (PAAF), apenas quando forem maiores que 1 cm. Com exceção para pacientes com alta suspeita clínica ou com presença de linfonodomegalia (BENJAMIN ET AL., 2017).

O carcinoma papilífero de tireoide (CPT) e o carcinoma folicular de tireoide (CFT) são as neoplasias de tireoide mais comuns e o desenvolvimento de marcadores moleculares para esses tumores é muito significativo em termos de diagnóstico, prognóstico, tratamento e acompanhamento. Quatro mutações gênicas diferentes, com efeitos significativos no prognóstico e diagnóstico dessas neoplasias, já foram identificadas. São elas as mutações pontuais BRAF (quinase Raf do tipo B) e RAS, e os rearranjos RET/PTC e PAX8/PPARc (OMUR E BARAN, 2014).

Essas mutações são, na maioria dos casos, mutuamente excludentes, sugerindo efeitos finais análogos ou semelhantes. Estudos prévios revelaram que esses genes mutados codificam efetores da via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (AGRAWAL ET AL., 2014).

O gene BRAF codifica a proteína B-Raf, membro da família de proteínas RAF, que é uma serina-treonina quinase. Quando a proteína Ras, codificada pelo gene RAS, liga-se e ativa a B-Raf, ela é translocada para a membrana celular, associando-se diretamente à via de sinalização da MAPK. Essa via é responsável pela ativação da transcrição de genes envolvidos na diferenciação, proliferação e sobrevivência celular. As alterações mais comuns no CPT incluem mutações pontuais do BRAF, que são observadas em 35-70% dos casos. Essa mutação causa ativação constitutiva da quinase B-Raf e, portanto, indução da via de sinalização da MAPK, responsável pela tumorigênese da tireoide (OMUR E BARAN, 2014).

A análise mutacional do BRAF e, em menor grau, a análise do rearranjo RET/PTC e de mutações no gene RAS em amostras de PAAF, tem sido avaliada na tentativa de desenvolver subclassificações citológicas mais discriminatórias, melhorando a acurácia das indicações cirúrgicas para remoção de nódulos de tireoide. Em instituições selecionadas, o uso de tais genes como biomarcadores moleculares para o câncer de tireoide, em amostras

de PAAFs, faz parte da rotina para melhorar a precisão do diagnóstico pré-operatório. Recentemente, os dados iniciais baseados no uso de um painel de expressão gênica para caracterizar ainda mais nódulos tireoidianos considerados “indeterminados” (como os classificados na categoria III e IV do Sistema Bethesda) foram apresentados (CARLING E UDELSMAN, 2014).

Alteração Genética	Câncer de tireoide	Bem diferenciado	Mal diferenciado Câncer tireoide	Câncer tireoide Anaplásico
	CPT	CFT		
Rearranjo RET\CPT	13% - 25%	0%	0 – 13%	0%
Mutação BRAF	29 – 69%	0%	0 – 13%	0 – 12%
Rearranjo NTRK1	5 – 13 %	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido
Mutação RAS	0 – 21%	40% - 53%	18% - 27%	20% - 60%
Rearranjo PPARG	0%	25% - 63%	0%	0%
Mutação CTNNB1	0%	0%	0 -25%	66%
Mutação TP53	0 – 5%	0 – 9%	17% - 38%	67% - 88%

Tabela 2. Resumo das alterações genéticas conhecidas mais comuns identificadas no câncer de tireoide derivado das células foliculares.

Fonte: Modificado de Carling e Udelsman (2014).

# **EXTRAÇÃO DE DNA**

# EXTRAÇÃO DE DNA

## PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE PUNÇÃO ASPIRATIVA POR AGULHA FINA (PAAF), CONSERVADAS EM TRIZOL

Para os ensaios experimentais são necessários alguns passos:

1. Ajustar a centrífuga refrigerada para temperatura de 4°C.
2. Transferir toda a solução conservante para um tubo de 1,5mL, com cuidado para não transferir o pellet de células.
3. Adicionar 0,2mL de clorofórmio para cada 1mL de Trizol que foi transferido para o tubo. Vortexar vigorosamente até obter uma solução rósea de aspecto leitoso.
4. Centrifugar a 13.000 xg a 4°C por 15 minutos.
5. Observar as 3 fases da solução: a primeira fase é aquosa, contém o RNA, a interfase é branca e leitosa contém o DNA e fase inferior rósea contém proteínas. Descartar a fase aquosa superior.
6. Adicionar 0,3mL de etanol absoluto para cada 1mL de Trizol utilizado inicialmente e homogeneizar por inversão.
7. Incubar a temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugar por 1900 xg por 5 minutos a 4°C.
8. Remover o sobrenadante. Lavar o pellet resultante com uma solução 0.1M de citrato de sódio em etanol 10% na proporção 1 mL de solução para cada 1mL de Trizol utilizado inicialmente.
9. Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos, com agitação por vórtex a cada 10 minutos.
10. Centrifugar a 200 xg por 5 minutos a 4°C.
11. Repetir passos 8 a 10 vezes. Para pellets grandes, uma segunda lavagem pode ser necessária.
12. Suspender o pellet em etanol 75% na proporção 2mL de etanol para cada 1mL de Trizol utilizado inicialmente. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente, com agitação por vórtex a cada minuto.  
Centrifugar a 2000 xg por 5 minutos 4°C.
13. Descartar com cuidado o sobrenadante e secar os tubos invertidos em fluxo laminar sobre filtro por 2 a 10 minutos, dependendo da quantidade material extraído. Ressuspender o pellet numa solução de NaOH 8mM, na proporção de 450µL de solução para cada 10<sup>7</sup> células ou 60mg de tecido, com pH=9. Caso precise ajustar o pH por ser utilizado TE (Tris- EDTA).
14. Caso tenha debris celular, centrifugue o tubo a 13000 xg por 10 minutos, o sobrenadante contém o DNA e deve ser transferido para outro eppendorf e estocar a -70°C, até o ensaio.

Lembrando as lâminas de punção aspirativa de tireoide por agulha fina (PAAF) corada em giemsa, contém lamínulas que deverão ser retiradas com cuidado, para não danificar e contaminar a amostra.

**PCR**



## PCR

A técnica de reação de cadeia pela ação da polimerase PCR (do inglês, *polimerase chain reaction*), baseado pela amplificação enzimática de um específico fragmento de DNA, onde utiliza-se uma sequência de oligonucleotídeos, chamados de primers ou sequências iniciadoras, que formam híbridos com as fitas complementares de uma sequência (molde conhecida como sequência alvo). Os repetitivos ciclos permeio a variável temperatura, permitem a desnaturação do DNA molde, a hibridização seguida de ampliações pela ação da DNA polimerase conforme os primers, resultando em múltiplas sequências da região de interesse dada pelos primers.

Na técnica da PCR faz uso dos equipamentos o termociclador e do vórtex e consiste numa reação onde os reagentes são misturados em um tubo de eppendorf:

- a) Amostra de DNA – sequência que deseja amplificar.
- b) Primers – são iniciadores e limitam-se a região a ser amplificada.
- c) Bases Nitrogenadas (dNTPs) – são adicionadas as novas cadeias de DNA.
- d) Tampão – propicia pH adequado para atividade da polimerase.
- e) Taq Polimerase – função de atividade enzimática.

Para o mix de uma amostra com volume final de 25µL:

<b>H<sub>2</sub>O ultrapura</b>	<b>9,0 µL</b>
<b>Taq Polimerase (MgCl e dNTPs)</b>	<b>12,0 µL</b>
<b>Primer Forward</b>	<b>1,0 µL</b>
<b>Primer Reverse</b>	<b>1,0 µL</b>
<b>Amostra DNA</b>	<b>2.0 µL</b>

\*Sempre lidar usar uma cuba de gelo para preparar a reação da PCR. Após adicionar o mix da PCR, próximo passo é colocar o tubo no termociclador.

Na PCR em Tempo Real é utilizado uma sonda interna a ser amplificado e é hibridizado ao DNA molde. A sonda possui marcador fluorescente e pela ação da polimerase, é desintegrada, onde a enzima polimerase assume o lugar da sonda, na extensão dos primers, algo que pode ser visualizado por equipamento específico.

Já na RT-PCR ocorre a amplificação dos ácidos nucléicos a partir da molécula de RNA convertidas em DNA complementar (cDNAs). A molécula de RNA é convertida em cDNA através da reação da transcriptase reversa (RT), proporcionando dados qualitativos e quantitativos.

Utilizaremos o termociclador *Veriti Thermal Cycler 96 well* – *Applied Biosystems* para obtermos um fragmento amplificado nas condições específicas, as temperaturas PCR: 35 ciclos de 94°C por 30s, durante 30s e 72°C durante 45s desnaturação inicial a 94°C por 2 min e extensão final a 72 durante 7 min.

**PREPARAÇÃO E  
VISUALIZAÇÃO  
DO GEL DE  
AGAROSE**

# PREPARAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DO GEL DE AGAROSE

## ELETROFORESE

É descrita pelo deslocamento de biomoléculas que estejam numa matriz sólida de agarose ou poliacrilamida conduzidas pela eletricidade, onde a velocidade de deslocamento é determinada pela carga elétrica da biomolécula (positiva, negativa ou neutra), estrutura e tamanho da amostra. A corrida eletroforética se dá pela migração das partículas carregadas em direção oposta e a sua velocidade é permeada pelo tamanho de pares bases que a amostra possui.

O ensaio da eletroforese é constituído pelo gel de agarose imerso em um tampão, os eletrodos ligados nas extremidades da cuba, onde a amostra de DNA (possui carga negativa), resultante da reação de PCR é adicionada nos pocinhos do gel. A amostra pode estar com brometo de etídio ou pode ser corada após a corrida no gel.

Como preparar o gel de agarose:

- a) Preparo do Tampão: Coloca-se 100ml de tampão TAE ou TBE 10x em uma proveta de 1000ml e adiciona água MiliQ, até completar 1000ml, resultando em um tampão de 1x.
- b) Pesa 1,5g de agarose na balança analítica e coloca-se no frasco de erlenmyer e adiciona 100ml do tampão TAE ou TBE 1x, leva para para o microondas por aproximadamente 1 minuto, até dissolver a agarose;
- c) Coloca-se o tampão TAE ou TBE na cuba de eletroforese;
- d) Após o gel esfriar um pouco, coloca-se na cuba de eletroforese juntamente com o pente até endurecer o gel de agarose. O pente evita que o gel no estado líquido escorra para área não designada para o gel;
- e) Retire o pente com cuidado;
- f) Em uma placa de ensaio de ELISA ou de placa de PCR, aplique 2 $\mu$ l de DNA genômico resultante da PCR, juntamente com 1 $\mu$ l de azul de bromofenol, 3 $\mu$ l de água MiliQ e faça um Up and Down com a pipeta para misturar e aspirar a quantidade desejada para a aplicar no pocinho do gel de agarose;
- g) Ligue a fonte de eletroforese;
- h) Após o termino da corrida eletroforética, retire o gel e core com brometo de edítio, caso não tenha já mistura, em seguida, coloque o gel no aparelho transluminador a UV para visualização das bandas no gel de agarose (Fig. 5).

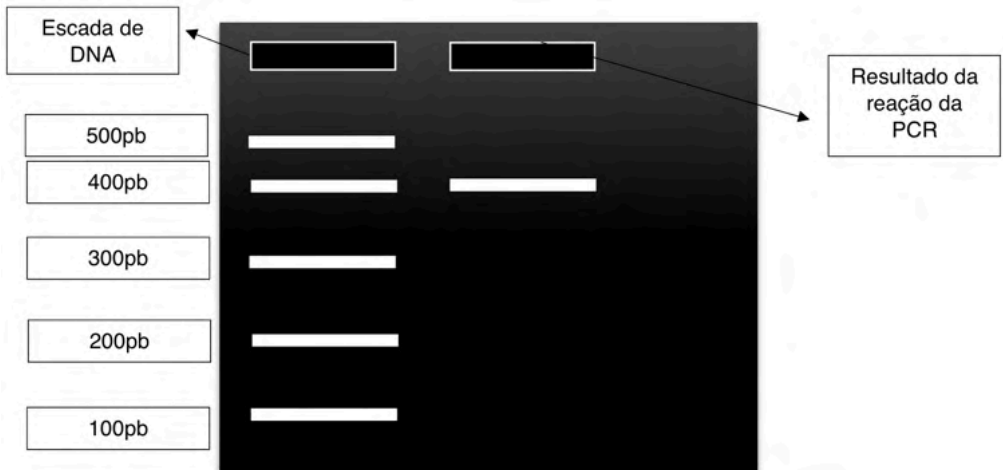


Fig. 5 - Visualização das bandas no gel de agarose.

# **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O laboratório de biologia molecular de tireoide requer boas prática e conhecimento básico sobre com o que irá se trabalhar. Aqui neste manual pudemos descrever sobre os princípios básicos como os cuidados no laboratório, princípios de pipetagem, a diluição de primers, o manejo dos reagentes e equipamentos. Já no capítulo cinco falamos sobre os nódulos de tireoide, a classificação do Sistema Bethesda de Citopatologia de Tireoide, bem como sobre fundamentos empíricos da punção aspirativa por agulha fina (PAAF), a importância do exame quando a sugestiva para malignidade. Por fim, demos uma pincelada sobre os fundamentos básicos dos ensaios de extração de DNA, PCR e preparação e visualização do gel de agarose. Assim, poder contribuir para o discernimento e empregar um método molecular que venha auxiliar no diagnóstico e na classificação.

## REFERÊNCIAS

ALI, S.Z. Thyroid cytopathology: Bethesda and beyond. **Acta. Cytol**, v. 55, n. 1, p. 4- 12, 2010.

ALI, S.Z; CIBAS, E.S. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology II. **Acta. Cytol**, v. 60, n. 5, p. 397-398, 2016.

ALMEIDA, M. DE F.C. Boas Práticas de Laboratório. 1ªed. São Caetano do Sul, SP: Difusão Editora; 2008.

AMERICAN THYROID ASSOCIATION (ATA) GUIDELINES TASKFORCE ON THYROID NODULES AND DIFFERENTIATED THYROID CANCER. COOPER, D.S.; DOHERTY, G.M.; HAUGEN, B.R.; HAUGER, B.R.; KLOOSRT.; LEE, S.L.; MANDEL, S.J.; MAZZAFERRI, E.L.; MCIVER, B.; PACINI, F.; SCHLUMBERGER, M.; SHERMAN S.L.; STEWARD, D.L.; TUTTLE, R.M. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. **Thyroid**. v. 19, n. 11, p. 1167-214, 2009.

BALOCH, Z.W; LIVOLSI, V.A; ASA, S.L; ROSAI, J; MERINO, M.J; RANDOLPH, G; VIELH, P; DEMAY, R.M; SIDAWY, M.K; FRABLE, W.J. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. **Diagn Cytopathol**, v. 36, n. 6, p. 425-437, 2008.

BALOCH, Z.W; LIVOLSI, V.A. Fine-needle aspiration of the thyroid: today and tomorrow. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 22, n. 6, p. 929-939, 2008.

BONGIOVANNI, M; KRANE, J.F; CIBAS, E.S; FAQUIN, W.C. The atypical thyroid fine-needle aspiration: past, present, and future. **Cancer. Cytopathol**, v. 120, n. 2, p. 73-86, 2011.

BONGIOVANNI, M; SPITALE, A; FAQUIN, W.C; MAZZUCHELLI, L; BALOCH, Z.W. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a meta-analysis. **Acta. Cytol**, v. 56, n. 4, p. 333-339, 2012.

CABANILLAS, M. E.; MCFADDEN, D. G.; DURANTE, C. Thyroid cancer. **The Lancet**, v. 388, n. 10061, p. 2783-2795, 2016.

CARLING, T.; UDELSMAN, R. Thyroid Cancer. **Annu. Rev. Med.** v. 65, p. 125-37, 2014.

CIBAS, E.S; ALI, S.Z. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. **Thyroid**, v. 19, n. 11, p. 1159-1165, 2009.

CIBAS, E.S; ALI, S.Z. The 2017 Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology. **Thyroid**, v. 27, n.11, p. 1341-1346, 2017.

CRIPPA, S; MAZZUCHELLI, L; CIBAS, E.S; ALI, S.Z. The Bethesda System for reporting thyroid fine-needle aspiration specimens. **Am. J. Clin. Pathol**, v. 134, n. 2, p. 343-344; author reply 345, 2010.

GLIKSON, M.; FEIGIN, R.D.; LIBSON, E.; RUBINOW, A. Anaplastic thyroid carcinoma in aretrosternal goiter presenting as fever of unknown origin. **Am J Med.** v. 88, n. 1, p. 81-2, 1990.



GRANI, GIORGIO et al. "Avaliação e Manejo Contemporâneo de Nódulos de Tireóide". O **Jornal de endocrinologia clínica e metabolismo**. v. 105,9, p. 2869- 2883, 2020.

HAUGEN, B.R; ALEXANDER, E.K; BIBLE, K.C; DOHERTY, G.M; MANDEL, S.J; NIKIFOROV, Y.E; PACINI, F; RANDOLPH, G.W; SAWKA, A.M; SCHLUMBERGER, M; SCHUFF, K.G; SHERMAN, S.I; SOSA, J.A; STEWARD, D.L; TUTTLE, R.M; WARTOFSKY, L. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. **Thyroid**. v. 26, n. 1, p. 1-133, 2017.

JO, V.Y; STELOW, E.B; DUSTIN, S.M; HANLEY, K.Z. Malignancy risk for fine-needle aspiration of thyroid lesions according to the Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. **Am. J. Clin. Pathol**, v. 134, n. 3, p. 450-456, 2010.

LIU, X; MEDICI, M; KWONG, N; ANGELL, T.E; MARQUSEE, E; KIM, M.I; LARSEN, P.R; CHO, N.L; NEHS, M.A; RUAN, D.T; GAWANDE, A; MOORE, F. J.R; BARLETTA, J; KRANE, J.F; CIBAS, E.S; YANG, T; ALEXANDER, E.K; Bethesda Categorization of Thyroid Nodule Cytology and Prediction of Thyroid. **Thyroid**, v. 26, n. 2, p. 256-2561, 2015.

MONDAL, S.K; SINHA, S; BASAK, B; ROY, D.N; SINHA, S.K. The Bethesda system for reporting thyroid fine needle aspirates: A cytologic study with histologic follow-up. **J. Cytol**, v. 30, n. 2, p. 94-99, 2013.

NIKIFOROV, Y.E. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. **Mod. Pathol**, v. 21 Suppl 2: S37-43, 2008.

NIKIFOROVA, M.N; KIMURA, E.T; GANDHI, M; BIDDINGER, P.W; KNAUF, J.A; BASOLO, F; ZHU, Z; GIANNINI, R; SALVATORE, G; FUSCO, A; SANTORO, M; RUSS, G; BONNEMA, S.J; ERDOGAN, M.F; DURANTE, C; NGU, R; LEENHARDT, L. European Thyroid Association Guidelines For Ultrasound Malignancy Risk Stratification of Thyroid Nodules in Adults: The EU-TIRADS. **Eur. Thyroid. J**, v. 6, p. 225-237, 2017.

OMUR, O.; BARAN, Y. An update on molecular biology of thyroid cancers. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*. **Crit. Rev. Oncol. Hematol**. v. 90, n. 3, p. 233-52.

PUSZTASZERI, M; ROSSI, E.D; AUGER, M; BALOCH, Z; BISHOP, J; BONGIOVANNI, M; CHANDRA, A; COCHAND-PRIOU, B; FADDA, G; HIROKAWA, M; HONG, S; KAKUDO, K; KRANE, J.F; NAYAR, R; PARANGI, S; SCHMITT, F; FAQUIN, W.C. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: Proposed Modifications and Updates for the Second Edition from an International Panel. **Acta. Cytol**, v. 60, n. 5, p. 399-405, 2016.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Estatísticas do câncer, 2013. **CA Cancer J Clin**. v. 63, n. 1, p. 11-30, 2013.




THEOHARIS, C.G.; SCHOFIELD, K.M.; HAMMERS, L.; UDELSMAN, R.; CHHIENG, D.C. The Bethesda thyroid fine-needle aspiration classification system: year 1 at an academic institution. **Thyroid**. v. 19, n. 11, p. 1215-23, 2009.

SAÚDE BEM ESTAR.<disponível: <https://www.saudebemestar.pt/pt/exame/imagiologia/biopsia-da-tiroide/>.<acesso: 28\01\2022.

## **SOBRE OS AUTORES**

**AMANDA CARVALHO GARCIA** - Graduiu-se em Biomedicina pela Centro Universitário Autônomo do Brasil – UniBrasil. Mestre em Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná - Brasil Doutoranda - Medicina Interna no Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná – PPGMICS-UFPR. Realiza pesquisa do doutoramento em Tireoide sob supervisão e orientação do Dr. Hans Graf no Serviço de Endocrinologia e Metabolismo Hospital Universitário da Universidade do Paraná – Brasil (SEMPR-UFPR). e-mail: amanda.ufpr@gmail.com




**HANS GRAF** - Hans Graf graduou-se em Medicina pela Universidade Federal do Paraná em 1976. Possui especialização em Clínica Médica e Endocrinologia pela PUCRJ, concluídas em 1980. Fez residência médica pelo IEDE/PUCRJ entre 1980 e 1984. Possui Mestrado em Ciências Médicas Endocrinologia pela PUCRJ, concluído em 1986. Fez doutorado em Medicina Interna pela Universidade Federal do Paraná, concluído em 2000. Atualmente é chefe da disciplina de Endocrinologia da UFPR, chefe da unidade de Tireóide do Serviço de Endocrinologia (SEMPR) do Hospital de Clínicas da UFPR e professor associado III de Endocrinologia da UFPR. Orientou diversas dissertações de Mestrado e Doutorado.

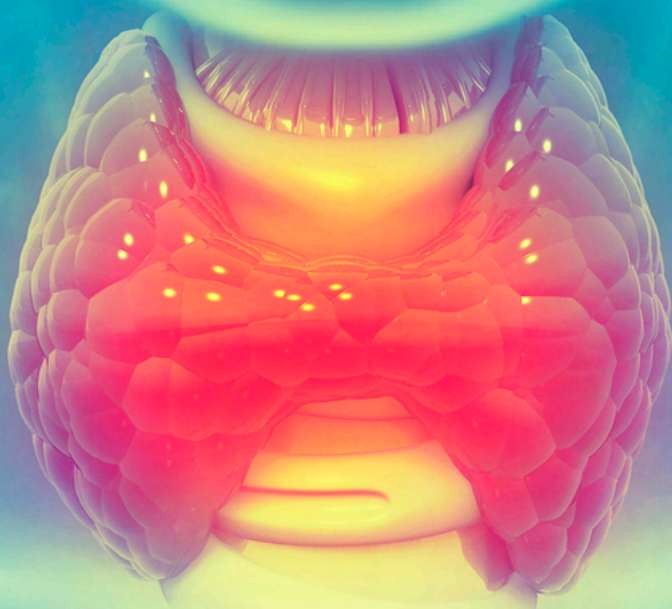
 [www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
 [contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)  
 @atenaeditora  
 [www.facebook.com/atenaeditora.com.br](http://www.facebook.com/atenaeditora.com.br)



Boas Práticas Laboratoriais em  
Biologia Molecular em  
**Tireoide**

  
Ano 2022

 [www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
 [contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)  
 @atenaeditora  
 [www.facebook.com/atenaeditora.com.br](http://www.facebook.com/atenaeditora.com.br)



Boas Práticas Laboratoriais em  
Biologia Molecular em  
**Tireoide**

  
Ano 2022