



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LIARA FREITAS CAVALCANTI

**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO
E HIPÓXIA NO CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREOIDE**

Londrina
2025

LIARA FREITAS CAVALCANTI

**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO
E HIPÓXIA NO CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREOIDE**

Tese de doutorado vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Cecchini.

Londrina
2025

LIARA FREITAS CAVALCANTI

MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E HIPÓXIA NO CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREOIDE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Dr. Rubens Cecchini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr.
Fábio Goulart de Andrade
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. André Armani
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Rodrigo Cabral Luiz
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Emerson José Venancio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

SUPLENTES

Dra. Alessandra Cecchini Armani
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Flávia Alessandra Guarnier
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 24 de abril de 2025

AGRADECIMENTOS

Iniciei esse ciclo junto ao pior momento da minha vida. O fim parecia muito distante e até mesmo impossível, mas ele chegou. Gostaria de agradecer à minha rede de apoio que me deu forças para continuar e não me deixou desistir mesmo quando essa era minha única vontade. À minha mãe, ao meu namorado e à minha terapeuta. Sem o incentivo de vocês, eu provavelmente teria desistido. Dedico esse trabalho ao meu pai, que não teve nem menos a oportunidade de me ver finalizando o mestrado. Mesmo assim, boa parte da força que encontrei para continuar foi pensando no orgulho que ele sentiria.

Aos meus orientadores, agradeço por toda paciência, incentivo e ensinamentos, desde o mestrado até o momento final da conclusão deste trabalho. Tudo o que aprendi com vocês vou levar para a vida, independente do caminho que eu seguir.

Durante os seis anos de pós-graduação, também conheci pessoas incríveis e amigas que levarei para sempre. Por isso, dedico a eles este trabalho: Rachel, Fabrício e Maria Isabel, com quem formei um quarteto durante as disciplinas e com quem mantive um vínculo muito especial até o final dessa jornada; Isabela, que foi meu braço direito nos experimentos por muitos anos e se tornou uma grande amiga; Josy, com quem pude contar em diversos momentos tanto para desabafos quanto nos experimentos; Michelle, que, mais do que uma parceira de laboratório, virou também uma de minhas melhores amigas.

Agradeço também os meus colegas de laboratório, que além de me ajudarem em diversas etapas desse trabalho, compartilharam comigo aprendizados, momentos engraçados e de descontração. Vocês com certeza tornaram esse processo mais leve e divertido.

Um agradecimento especial a minha amiga Amanda Dionisio por ter disponibilizado seu tempo para me ajudar a obter e analisar às imagens da imunofluorescência.

Ao técnico Jesus, carinhosamente chamado por todos de Zui, que sempre tratou todo mundo com muito carinho e atenção, tornando nossos dias na pesquisa muito mais alegres e infinitamente mais fáceis graças à sua ajuda e dedicação.

Aos pacientes que aceitaram participar deste estudo. A contribuição de você é inestimável e espero que os resultados aqui apresentados possam, de alguma forma, contribuir para a medicina.

Ao Dr. André Armani, Dr. Gustavo Brassaroto, e a todos os profissionais do HU, Hospital do Coração e Hospital Araucária, por terem contribuído com este trabalho ao permitir gentilmente que participássemos das cirurgias.

E por fim, à Capes e ao CNPq pelo fomento durante os quatros anos de doutorado.

*“Ninguém é tão grande que não possa aprender,
nem tão pequeno que não possa ensinar”.*

Esopo.

CAVALCANTI, Liara Freitas. **Marcadores de estresse oxidativo, inflamação e hipóxia no carcinoma papilífero de tireoide**. 2025. 89 p. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

RESUMO

O carcinoma papilífero de tireoide (CPT) é a neoplasia endócrina mais comum, representando de 80% a 90% dos casos de câncer de tireoide. Apesar do bom prognóstico, alguns casos apresentam risco de recorrência e metástases. Evidências sugerem que a patogênese do CPT está associada a fatores como estresse oxidativo, inflamação crônica e hipóxia, que atuam em sinergia para promover danos celulares, instabilidade genômica e adaptação tumoral ao microambiente. A inflamação, frequentemente exacerbada no contexto de estresse, pode levar a secreção de citocinas e quimiocinas que favorecem a proliferação celular, angiogênese e evasão do sistema imune. Nesse contexto, a hipóxia atua como um fator adicional, levando a adaptação metabólica, angiogênese e resistência celular no microambiente tumoral. Portanto, o presente estudo buscou investigar a presença desses fatores no CPT comparando com neoplasias benignas. Como objetivo secundário, buscou-se relatar um caso atípico da doença para contribuir com a literatura acerca do assunto. Para o primeiro objetivo, duas coortes de pacientes foram analisadas, divididas em dois grupos: benigno e CPT. Na primeira, avaliou-se o estresse oxidativo sistêmico em amostras de plasma (carbonilação de proteínas, peróxido de hidrogênio [H₂O₂], e tiol total), bem como os níveis de citocinas e quimiocinas. Na segunda coorte, o estresse oxidativo (catalase, glutatona reduzida [GSH] e hidroperóxidos de membrana) foi analisado em amostras de tecido tireoidiano normal, benigno e CPT. Além disso, a presença de marcadores de estresse foi analisada nesses tecidos por imunofluorescência (fator induzível por hipóxia 1-alfa [HIF-1 α], fator nuclear eritróide 2-related factor 2 [Nrf2] e glutatona peroxidase 3 [GPx3]). Os resultados mostraram que os marcadores de estresse oxidativo na primeira coorte estavam mais elevados no grupo CPT. Contudo, na segunda coorte, não houve diferença significativa entre os grupos. Em relação aos marcadores inflamatórios plasmáticos da primeira coorte, apenas a quimiocina regulada pelo timo e pela ativação (TARC) apresentou níveis plasmáticos mais elevados no grupo benigno, enquanto outras citocinas e quimiocinas não mostraram diferenças significativas entre os grupos. A intensidade de marcação de HIF-1 α , Nrf2, e GPx3 foi significativamente mais intensa no grupo PTC da segunda coorte, evidenciando o ambiente de estresse oxidativo nesses tumores. Em conclusão, os achados desse trabalho destacam a importância do estresse oxidativo como potencial marcador para diferenciar tumores benignos do CPT, enquanto o resultado da imunofluorescência ressalta a participação do estresse oxidativo na patogênese dessa doença. Além dos resultados evidenciados nas coortes de pacientes, o presente estudo também contribui com o relato de um caso atípico de carcinoma papilífero de tireoide de variante folicular infiltrativa. O paciente apresentou sinais e sintomas iniciais inespecíficos, evoluindo rapidamente para insuficiência respiratória e parada cardiorrespiratória. A confirmação diagnóstica revelou um tumor invasivo com extensão para estruturas adjacentes. A evolução clínica favorável sugere que, mesmo em casos avançados, intervenções terapêuticas adequadas podem controlar a progressão da doença. Os resultados do primeiro artigo contribuem para uma compreensão mais profunda da interação entre estresse oxidativo,

inflamação e progressão tumoral no CPT, fornecendo bases para futuras abordagens terapêuticas e prognósticas. E, por fim, o relato amplia o conhecimento sobre as apresentações clínicas atípicas do CPT, contribuindo para o reconhecimento precoce e manejo clínico mais eficiente.

Palavras-chave: GPx3; HIF-1 α ; H₂O₂; imunofluorescência; inflamação; Nrf2.

CAVALCANTI, Liara Freitas. **Markers of oxidative stress, inflammation and hypoxia in thyroid papillary carcinoma.** 2025. 89 p. Thesis (Doctorate in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

ABSTRACT

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common endocrine neoplasm, accounting for 80% to 90% of thyroid cancer cases. Despite the good prognosis, some cases have a risk of recurrence and metastasis. Evidence suggests that the pathogenesis of PTC is associated with factors such as oxidative stress, chronic inflammation and hypoxia, which act in synergy to promote cellular damage, genomic instability and tumor adaptation to the microenvironment. Inflammation, often exacerbated in the context of stress, can lead to secretion of cytokines and chemokines that favor cell proliferation, angiogenesis and evasion of the immune system. In this context, hypoxia acts as an additional factor, leading to metabolic adaptation, angiogenesis and cellular resistance in the tumor microenvironment. Therefore, the present study aimed to investigate the presence of these factors in PTC compared with benign tumors. As a secondary objective, we aimed to report an atypical case of PTC to contribute to the literature on the subject. For the first objective, two cohorts of patients were analyzed, divided into two groups: benign and PTC. In the first, systemic oxidative stress was evaluated in plasma samples (protein carbonylation, hydrogen peroxide [H₂O₂], and total thiol), as well as cytokine and chemokine levels (catalase, reduced glutathione [GSH] and hydroperoxides) was analyzed in samples of normal, benign and PTC tissues. In addition, the presence of oxidative stress markers was analyzed in these tissues by immunofluorescence (hypoxia-induced factor 1-alpha [HIF-1 α], nuclear erythroid 2-related factor 2 [Nrf2] and glutathione peroxidase 3 [GPx3]). The results showed that oxidative stress markers in the first cohort were higher in the PTC group. However, in the second cohort, there was no significant difference between the groups. Regarding plasma inflammatory markers of the first cohort, only thymus-activated chemokine (TARC) showed higher plasma levels in the benign group, while other cytokines and chemokines did not show significant differences between groups. The fluorescence intensity of HIF-1 α , Nrf2, and GPx3 was higher in the PTC group of the second cohort, evidencing the oxidative stress environment in these tumors. In conclusion, the findings of this study highlight the importance of oxidative stress as a potential marker of malignancy in thyroid cancer, while the immunofluorescence results highlight the participation of oxidative stress in the pathogenesis of this disease. In addition to the results evidenced in the patient cohorts, this study also contributes to the report of an atypical case of infiltrative follicular variant of PTC. The patient presented initial nonspecific signs and symptoms, rapidly progressing to respiratory failure and cardiac arrest. Diagnostic confirmation revealed an invasive tumor with extension to adjacent structures. The favorable clinical evolution suggests that, even in advanced cases, adequate therapeutic interventions can control the progression of the disease. The results of the first article contribute to a deeper understanding of the interaction between oxidative stress, inflammation and tumor progression in PTC, providing the basis for future therapeutic approaches and prognoses. Finally, the report broadens knowledge about atypical clinical presentations of PTC, contributing to early recognition and more efficient clinical management.

Key-words: GPx3; HIF-1 α ; H₂O₂; immunofluorescence; inflammation; Nrf2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Anatomia e histologia da tireoide	17
Figura 2	– Síntese dos hormônios da tireoide	19
Figura 3	– Alterações histológicas encontradas no carcinoma papilífero	25
Figura 4	– Equilíbrio redox na tireoide	29
Figura 5	– Via do Nrf2 em condições basais e durante o estresse oxidativo	31
Figura 6	– Via do HIF-1 α em condições de hipóxia e estresse oxidativo	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARE	Elemento responsivo a antioxidantes/Antioxidant response elements
CPT	carcinoma papilífero de tireoide
Cu/ZnSOD-	SOD cobre/zinco
DIT	diiodotirosina
DUOX2	dual oxidase 2
eNOS	enzima óxido nítrico sintase endotelial
ERO	espécies reativas de oxigênio
FIH	proteína reguladora de HIF
Gpx	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HIF	fator induzido por hipóxia
HNE	4-hidroxinonenal
iNOS	enzima óxido nítrico sintase induzível
MCT	proteína transportadora de monocarboxilato
MDA	malondialdeído
MIT	monoiodotirosina
MnSOD	SOD manganês
NIS	proteína transportadora de iodo
nNOS	enzima óxido nítrico sintase neural
NO	óxido nítrico
Nrf2	fator nuclear relacionado ao eritróide 2
PHD	enzima do domínio da prolil hidroxilase
Prx	peroxirredoxina
SH	grupamento tiol
SOD	superóxido dismutase
T3	triiodotironina
T4	tiroxina
TARC	timo e quimiocina regulada por ativação
TPO	tireoperoxidase

TRH	hormônio liberador de tirotropina
TrxR	tioredoxina redutase
TSH	hormônio tireoestimulante
TSHR	receptor do hormônio tireoestimulante
VHL	proteína von-Hippel-Lindau

SUMÁRIO

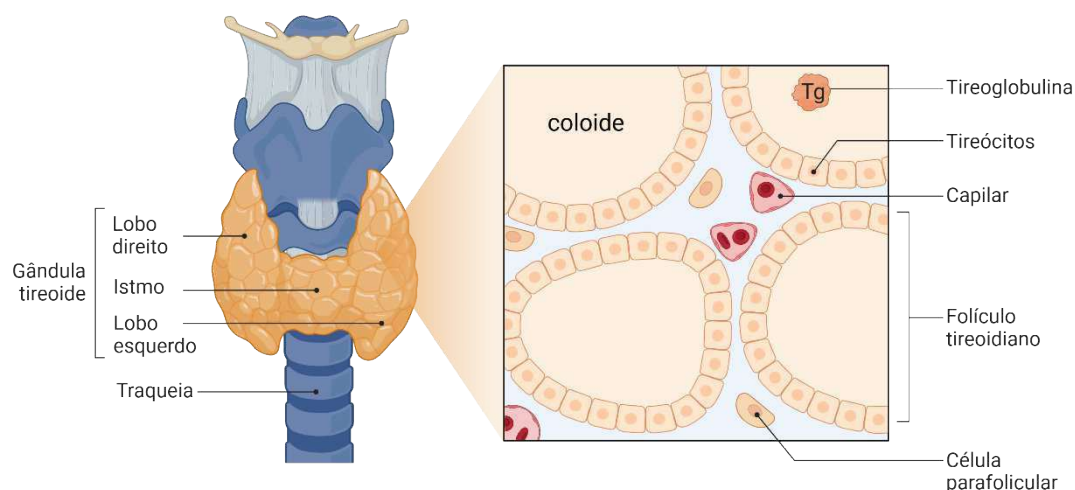
1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Tireoide	17
1.2	Câncer de tireoide	20
1.3	Carcinoma papilífero de tireoide	23
1.4	Estresse oxidativo e câncer de tireoide	26
1.5	Estresse oxidativo, hipóxia e câncer de tireoide	32
1.6	Inflamação e câncer de tireoide	35
2	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivo geral	39
2.2	Objetivos específicos	39
3	RESULTADOS	40
4	CONCLUSÃO	42
5	ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	42
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXOS	51
	ANEXO A	52
	ANEXO B	83

1. INTRODUÇÃO

2 1.1 Tireoide

3 A tireoide é uma glândula endócrina, de origem endodérmica, localizada
 4 na região cervical, anterior à laringe e à traqueia (Junqueira & Carneiro, 2013).
 5 Apresenta formato de borboleta, e é dividida em dois lobos que se conectam por
 6 um istmo (Kirsten, 2000). Essa glândula contém unidades funcionais, os
 7 folículos, que são formados por um epitélio simples de células cúbicas ou
 8 colunares chamadas de tireócitos (Junqueira & Carneiro, 2013; Kumar, Abbas,
 9 Aster, 2013). Os tireócitos se organizam ao redor de um lúmen viscoso, também
 10 chamado de coloide, constituído basicamente por tireoglobulina e proteínas
 11 (Stathatos, 2012) (Figura 1). A membrana apical dessas células se conecta por
 12 junções de oclusão, impedindo o extravasamento do conteúdo do lúmen para o
 13 espaço extrafolicular (Szanto, Pusztaszeri, Mavromati, 2019). O formato dos
 14 tireócitos e o diâmetro do lúmen estão relacionados com a atividade da glândula
 15 (Junqueira & Carneiro, 2013).

16 **Figura 1** – Ilustração da anatomia e histologia da tireoide.



17

18 Representação esquemática da histologia da tireoide. A glândula consiste em múltiplas unidades
 19 funcionais chamadas folículos, que são revestidos por uma única camada de células foliculares
 20 (tireócitos) cuboidais ou colunares e preenchidas com coloide. Os folículos são rodeados por
 21 células parafoliculares e uma rica rede de capilares fenestrados que facilitam a secreção
 22 hormonal. Fonte: o autor.

23

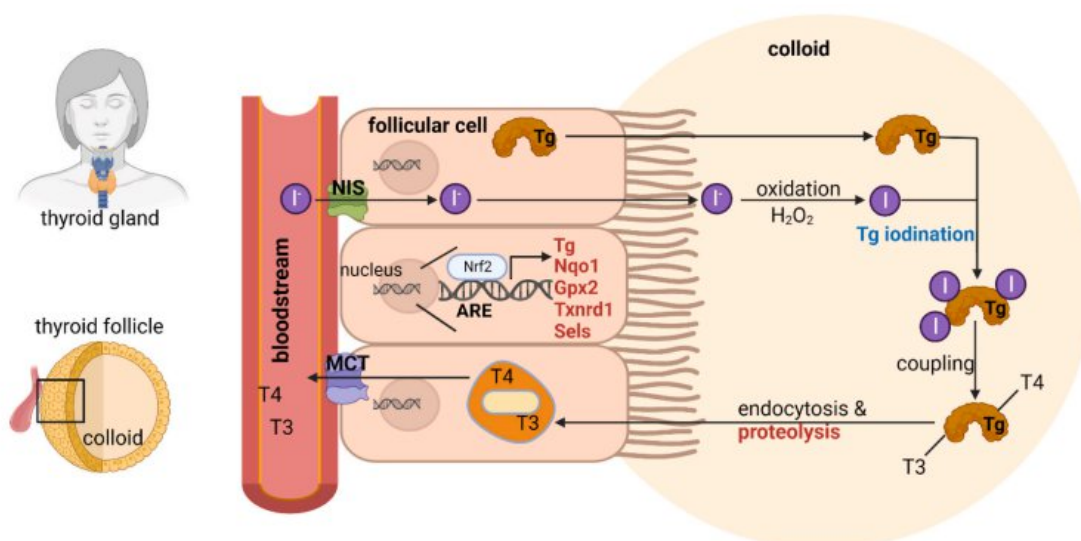
1 Externamente, a tireoide é revestida por uma cápsula de tecido conjuntivo
2 frouxo que é responsável por septar o parênquima em folículos (Junqueira &
3 Carneiro, 2013). Os folículos são delimitados exteriormente pela membrana
4 plasmática basolateral dos tireócitos, que se encontra em contato com uma rede
5 de capilares fenestrados (Carvalho, Dupuy, 2017). Entre eles estão presentes
6 também as células parafoliculares, produtoras do hormônio calcitonina, que é
7 responsável por inibir a reabsorção óssea e reduzir os níveis plasmáticos de
8 cálcio (Junqueira & Carneiro, 2013).

9 A síntese dos hormônios tireoidianos tiroxina (T4) e triiodotironina (T3)
10 ocorre entre a membrana apical dos tireócitos e o coloide (Carvalho, Dupuy,
11 2017). Esse processo é regulado principalmente pela ativação de fatores de
12 transcrição, pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, e pela disponibilidade de
13 iodeto na circulação (Kumar *et al.*, 2013). A tireoperoxidase (TPO), uma
14 hemoproteína glicosilada transmembrana, específica da tireoide, desempenha
15 um papel central nesse mecanismo (Szanto, Pusztaszeri, Mavromati, 2019).
16 Dentre suas cinco isoformas, apenas a TPO1, TPO3 e TPO4 são ativas,
17 enquanto a TPO2 e TPO5 são rapidamente degradadas após serem produzidas
18 (Carvalho, Dupuy, 2017). Sua expressão é estimulada pelo hormônio
19 tireoestimulante (TSH) (Carvalho, Dupuy, 2017).

20 A síntese hormonal está ilustrada na Figura 2 e se inicia com a produção
21 do hormônio liberador de tireotropina (TRH) no hipotálamo, que juntamente com
22 o feedback exercido pelos hormônios T3 e T4 e pelos níveis de iodeto, estimulam
23 a adenohipófise a secretar o hormônio TSH (Stathatos, 2012). O TSH se liga ao
24 seu receptor, o TSHR, na membrana basolateral dos tireócitos (Carvalho, Dupuy,
25 2017). Posteriormente, tem-se a ativação da proteína transportadora de iodo
26 (NIS) que faz a internalização do iodeto circulante (Sorrenti *et al.*, 2021; Thanas
27 *et al.*, 2020). Em seguida, ele atinge o coloide onde é oxidado em iodo pela TPO,
28 processo dependente de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Szanto, Pusztaszeri,
29 Mavromati, 2019). Posteriormente, o iodo é incorporado aos resíduos de tirosina
30 da tireoglobulina; a TPO também auxilia nesse processo (Carvalho, Dupuy,
31 2017). A tireoglobulina é uma proteína secretada na forma de dímero pelos
32 tireócitos, sendo reciclada após a síntese hormonal para a síntese de mais
33 hormônios (Schmutzler *et al.*, 2007).

1 O H_2O_2 na tireoide é proveniente principalmente do metabolismo da dual
 2 oxidase 2 (DUOX2), uma enzima da família das NADPH oxidases (Kosciuszko
 3 *et al.*, 2023). Posteriormente, tem-se a produção de T3 e T4 a partir da junção
 4 dos resíduos iodados de tirosina, formando os compostos monoiodotirosina
 5 (MIT) e diiodotirosina (DIT) (Sorrenti *et al.*, 2021). A TPO é responsável por unir
 6 duas DIT, formando o T4 e acoplar uma MIT a uma DIT, formando o T3
 7 (Carvalho, Dupuy, 2017); o T4 é o mais abundante dos hormônios tireoidianos,
 8 correspondendo a 90% da quantidade total (Kirsten, 2000).

9 **Figura 2** – Síntese dos hormônios da tireoide.



10

11 O esquema ilustra as etapas da biossíntese dos hormônios tireoidianos tiroxina (T4) e
 12 triiodotironina (T3). O processo inicia-se com a captação do iodeto (I^-) pela proteína
 13 transportadora de iodo (NIS) na membrana basolateral dos tireócitos. O iodeto é transportado
 14 para o colóide, onde é oxidado a iodo molecular pela tireoperoxidase (TPO), em uma reação
 15 dependente de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O iodo ativado se liga a resíduos de tirosina da
 16 tireoglobulina (Tg), formando monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT). A conjugação de
 17 duas moléculas de DIT resulta na formação de T4, enquanto a junção de uma molécula de MIT
 18 com uma de DIT gera T3. Os hormônios tireoidianos são então armazenados no colóide até
 19 serem endocitados pelos tireócitos, processados nos lisossomos e liberados na circulação
 20 sanguínea por meio da proteína transportadora de monocarboxilato (MCT). Fonte:
 21 Chartoumpakis *et al.*, 2022.

22

23 Os passos que antecedem a secreção dos hormônios são a endocitose
 24 da tireoglobulina e degradação lisossomal da molécula, liberando T3 e T4

1 (Thanas *et al.*, 2020). Graças a extensa rede de capilares fenestrados que
2 revestem a tireoide e a proteína transportadora de monocarboxilato (MCT), os
3 hormônios alcançam a circulação (Foster *et al.*, 2021). Na circulação, eles se
4 ligam a proteínas transportadoras e alcançam os tecidos periféricos (Sabatino *et*
5 *al.*, 2023). Visto que o T4 não é a forma mais ativa, nos tecidos periféricos ele é
6 convertido em T3, que possui 10x mais afinidade com os receptores nucleares
7 das células alvo (Holzer, Roux, Laudet, 2017). Esse processo é mediado por
8 proteínas transmembranas, as iodotironinas deiodinases e é dependente de
9 selênio (Sorrenti *et al.*, 2021). A deiodinase tipo II é responsável pela conversão
10 de T4 em T3 nas células-alvo por meio da remoção de um átomo de iodo (Holzer,
11 Roux, Laudet, 2017). A deiodinase tipo III, ao contrário da 2, tem a função de
12 converter o T4 em reverse T3 (rT3), que é uma forma inativa do hormônio (Foster
13 *et al.*, 2021). Ao se ligar aos receptores de hormônio da tireoide, o T3 regula a
14 taxa metabólica basal e processos bioquímicos como a lipólise e a
15 gliconeogênese (Mullur, Liu, Brent, 2014).

16 Alterações na produção dos hormônios da tireoide são mais comuns em
17 mulheres do que em homens e podem ser causadas por deficiências nutricionais
18 ou ser de origem autoimune (Wang *et al.*, 2023). Evidências sugerem que a
19 clivagem oxidativa de H₂O₂, que ocorre durante a síntese hormonal, pode resultar
20 em autoimunidade (Ameziane-El-Hassani, Schlumberger, Dupuy, 2016). As
21 doenças de origem autoimune são caracterizadas pela produção de
22 autoanticorpos contra antígenos da tireoide que podem estimular ou suprimir a
23 secreção hormonal (Lee *et al.*, 2015). Quando estimulada, caracteriza-se o
24 hipertireoidismo, sendo o tipo mais comum a Doença de Graves (Stathatos,
25 2012). Por outro lado, quando suprimida, tem-se o hipotireoidismo, sendo o
26 principal tipo a Tireoidite de Hashimoto (Kumar *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2022).
27 Essas condições, se não tratadas, trazem consequências graves para a saúde,
28 incluindo alguns tipos de neoplasias.

29

30 **1.2 Câncer de tireoide**

31 O câncer de tireoide é um tipo de tumor de cabeça e pescoço, sendo a
32 quinta neoplasia mais comum em mulheres (INCA, 2023), possivelmente devido
33 ao estímulo proliferativo causado pelo estrógeno, teoria essa reforçada pela

1 presença de receptores de estrógenos nos tireocitos (Crnčić *et al.*, 2020).
2 Mundialmente, o câncer de tireoide ocupa a sétima posição dentre os tipos mais
3 incidentes, com aproximadamente 821 mil casos registrados em 2022 (GCO,
4 2022). No Brasil, para o triênio de 2023 a 2025, foram estimados cerca de 49.800
5 novos casos (INCA, 2023).

6 Já foi evidenciado que a taxa de mutações espontâneas na tireoide é
7 maior do que em outros órgãos, justificando em partes o grande número de
8 casos observados (Renaud *et al.*, 2019). A incidência tem crescido 20% a cada
9 ano (Hong *et al.*, 2022), principalmente de micro carcinomas, devido ao
10 aprimoramento das técnicas diagnósticas (Nabhan *et al.*, 2021). No geral, esse
11 tipo de câncer apresenta uma baixa taxa de mortalidade, tendo sido registradas
12 47.507 mortes em todo o mundo no ano de 2022 (GCO, 2022). Apesar do
13 prognóstico ser bom e a resposta ao tratamento ser promissora, 30% dos casos
14 são mais graves e necessitam tratamentos adicionais (Febrero *et al.*, 2024).

15 Apesar da carcinogênese ser um processo complexo e multifatorial,
16 alguns fatores contribuem para desenvolvimento do câncer de tireoide (Danilovic
17 *et al.*, 2017). Dentre eles, destaca-se a exposição a poluentes, obesidade,
18 histórico de doença tireoidiana, casos de câncer na família, exposição a doses
19 moderadas a altas de radiação e estresse oxidativo (Ameziane-EI-Hassani,
20 Schlumberger, Dupuy, 2016; Han, Kim, 2018). Apesar de o câncer de tireoide
21 ser um dos cânceres com maior predisposição hereditária, 90% dos casos
22 ocorrem por mutações esporádicas (Crnčić *et al.*, 2020). Outro fator importante
23 é a baixa ingestão de iodo, o que ocasiona uma diminuição da síntese de
24 hormônios e um conseqüente aumento na secreção de TSH, que pode atuar
25 como um potente fator de crescimento das células foliculares (Crnčić *et al.*,
26 2020). Por outro lado, um excesso de iodo acarreta uma maior produção de H₂O₂
27 para estimular a síntese hormonal, gerando estresse oxidativo (Mancini *et al.*,
28 2016). Além disso, alguns poluentes como o nitrato podem atrapalhar a captação
29 de iodo pelas células da tireoide, e outros como o bezeno e formaldeído causam
30 inflamação e danos diretos ao DNA (Crnčić *et al.*, 2020).

31 O estresse oxidativo pode levar a danos no DNA, e conseqüentemente,
32 a mutações em protooncogenes e genes supressores tumorais, contribuindo

1 para o processo de carcinogênese (Kosciuszko *et al.*, 2023). Já foi descrito
2 anteriormente que a maioria das mutações encontradas no câncer de tireoide
3 são de base única, mostrando a estreita relação do estresse oxidativo com o
4 desenvolvimento desse tipo de câncer (Renaud *et al.*, 2019). A literatura traz que
5 um potente marcador de lesão ao DNA, a 8-hidroxi-2'desoxiguanosina, encontra-
6 se mais expresso no câncer de tireoide, mostrando mais uma vez como o
7 estresse oxidativo possivelmente influencia no processo de carcinogênese
8 (Mseddi *et al.*, 2016). Além disso, evidenciou-se que as espécies reativas de
9 oxigênio (ERO) são capazes de estimular a proliferação de células tronco
10 neoplásicas de tireoide presentes no microambiente tumoral (Gong *et al.*, 2024).
11 Por fim, doenças prévias da tireoide, principalmente as do tipo autoimune, são
12 caracterizadas por um ambiente oxidativo e inflamatório, o que podem favorecer
13 o processo de carcinogênese (Ameziane-El-Hassani, Schlumberger, Dupuy,
14 2016).

15 Em relação à radiação, a tireoide é um dos órgãos mais radio sensíveis,
16 principalmente na infância (Mirkatouli, Hirota, Yoshinaga, 2023). A exposição à
17 radiação, além de causar rearranjos cromossômicos, mutações e instabilidade
18 genômica (Crnčić *et al.*, 2020), está relacionada com a produção de espécies
19 reativas, gerando estresse oxidativo (Ameziane-El-Hassani, Schlumberger,
20 Dupuy, 2016). Até mesmo a radiação do raio-x e da tomografia computadorizada
21 na região da cabeça, pescoço e tórax, aumenta a chance de desenvolvimento
22 do câncer de tireoide (Han, Kim, 2018, Crnčić *et al.*, 2020).

23 As neoplasias da tireoide são classificadas pela Organização Mundial da
24 Saúde de acordo com a célula de origem, comportamento biológico e as
25 características patológicas e moleculares (Jung, Bychkov, Kakudo, 2022). Nesse
26 contexto, elas são divididas em três grupos: lesões benignas, neoplasias de
27 baixo risco, e neoplasias malignas (WHO, 2022). As neoplasias benignas são
28 classificadas como 1) doença folicular nodular da tireoide, 2) adenoma folicular,
29 3) adenoma folicular com estrutura papilífera, e 4) adenoma oncocítico. As
30 neoplasias de baixo risco se dividem em 1) neoplasia folicular não invasiva da
31 tireoide com características nucleares semelhantes ao tipo papilífera, 2) tumor
32 da tireoide de potencial de malignidade incerto, 3) tumor bem diferenciado de
33 potencial de malignidade incerto, 4) tumor trabecular hialinizante. Por outro lado,

1 as neoplasias malignas são classificadas em: 1) carcinoma papilífero, 2)
2 carcinoma folicular, 3) variante folicular do carcinoma papilífero
3 não invasivo e encapsulado, 4) carcinoma oncocítico, 5) carcinoma pouco
4 diferenciado, 6) carcinoma anaplásico, e 7) carcinoma de derivação folicular de
5 alto grau, sendo que cada um desses tipos possui diferentes subtipos (Juhlin,
6 Mete, Baloch, 2022). Dentre as neoplasias malignas, o tipo mais incidente é o
7 carcinoma papilífero (CPT), correspondendo de 80% a 90% dos casos, estando
8 relacionado com um bom prognóstico (Cai *et al.*, 2024).

9

10 **1.3 Carcinoma papilífero de tireoide**

11 O CPT é considerado uma neoplasia bem diferenciada (Kim, 2014). Esse
12 tipo de câncer pode acometer indivíduos de todas as idades, no entanto, sua
13 incidência é maior após os 40 anos (Abdullah *et al.*, 2019). Assim como as
14 demais neoplasias de tireoide, o CPT é mais comum em mulheres do que
15 homens, com uma razão de 2:1 (Abdullah *et al.*, 2019). Além disso, o CPT
16 apresenta um bom prognóstico e altas taxas de sobrevida (Buczyńska *et al.*,
17 2023). No entanto, o prognóstico é ruim quando em homens, em pacientes com
18 idade avançada ou quando a massa tumoral é muito grande (Abdullah *et al.*,
19 2019). Outro marcador de agressividade é a presença de invasão local e
20 metástases (Buczyńska *et al.*, 2023). A metástase em linfonodos cervicais
21 centrais e laterais são um achado comum nessa neoplasia, enquanto as
22 metástases distantes são mais raras (Rovcanin *et al.*, 2022). A ocorrência de
23 metástase está relacionada com altas chances de recidiva e baixa taxa de
24 sobrevivência (Cai *et al.*, 2024). De acordo com a literatura, as metástases nesse
25 câncer possivelmente ocorrem devido à produção de quimiocinas pelas células
26 tumorais (Yapa *et al.*, 2017).

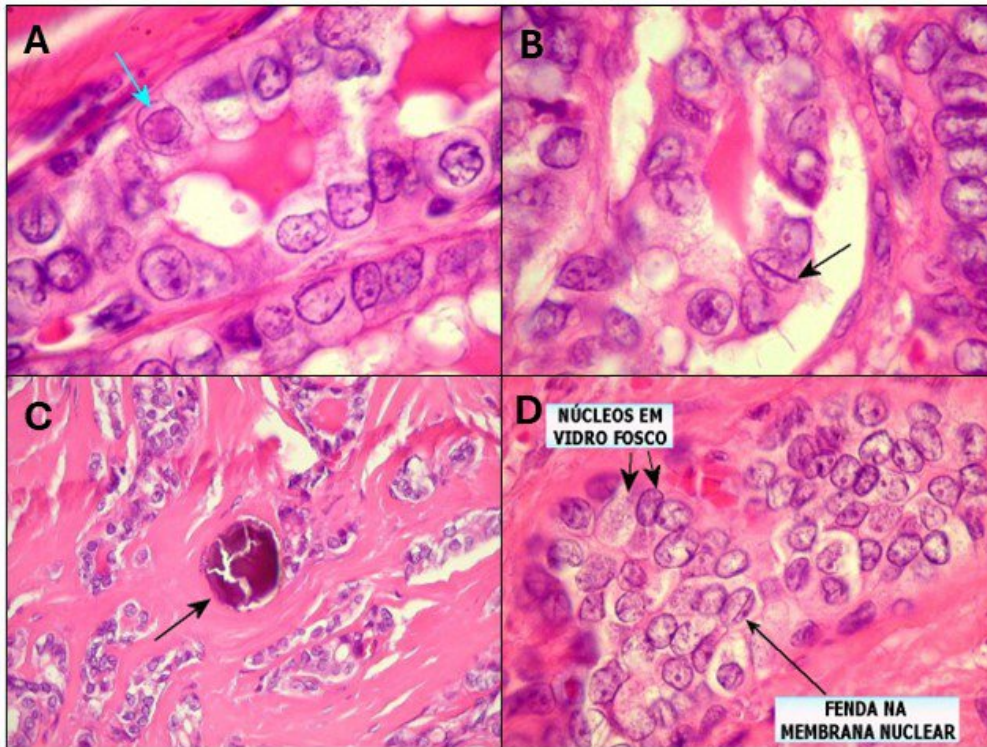
27 O CPT é dividido em diferentes subtipos de acordo com as características
28 morfológicas das células, sendo os mais comuns os subtipos folicular, sólido,
29 esclerosante difuso, de Warthin-like, e oncocítico (Juhlin, Mete, Baloch, 2022;
30 Asa, 2019). Os subtipos mais agressivos são os de célula alta, de célula colunar,
31 e de hobnail (Jung, Bychkov, Kakudo, 2022), sendo mais comuns em indivíduos
32 mais velhos. O subtipo folicular é ainda dividido em duas variantes: a

1 encapsulada e a infiltrativa, sendo que a primeira tem melhor prognóstico e
2 menos risco de metástase (Sohn, Lee, Lee, 2020).

3 O desenvolvimento do CPT após a exposição à radiação já foi descrito
4 (Crnčić *et al.*, 2020). Além desse fator, a presença de doenças prévias da
5 tireoide ou casos de CPT na família também são considerados fatores de risco
6 (Abdullah *et al.*, 2019). O estresse oxidativo também vem sendo evidenciado por
7 participar da patogênese e da progressão do CPT, visto que as espécies reativas
8 participam da produção hormonal na tireoide (Muzza *et al.*, 2022). Nesse
9 contexto, níveis elevados da enzima DUOX2, a principal fonte de H₂O₂ na
10 tireoide, já foram detectados nesse tipo de câncer (Szanto, Pusztaszeri,
11 Mavromati 2019) Ademais, a inflamação parece estar associada com a
12 patogênese do câncer de tireoide, promovendo proliferação, angiogênese e
13 metástase (Yapa *et al.*, 2017).

14 O diagnóstico é comumente realizado através da biópsia por aspiração
15 por agulha fina, e é feito uma citologia (esse diagnóstico é pre-operatório) sendo
16 um método com 90% de acurácia e pouco invasivo (Abdullah *et al.*, 2019). A
17 associação com o ultrassom é altamente recomendada para selecionar
18 corretamente o nódulo que será puncionado (Kim, 2014). Além disso, o
19 ultrassom é capaz de auxiliar na análise da malignidade ao observar se o tumor
20 está invadindo tecidos vizinhos, se possui margens irregulares e vascularização
21 intensa (Asa, 2019). Posteriormente, é feito então um esfregaço com as células
22 aspiradas, seguida de uma análise microscópica das células, classificando-as
23 em benignas, suspeitas ou malignas (Abdullah *et al.*, 2019). Após a remoção
24 cirúrgica do tumor, os principais achados histológicos característicos de
25 malignidade são as pseudoinclusões nucleares (Figura 3A) causadas por
26 invaginações citoplasmáticas; fendas nucleares (Figura 3B) devido a dobras na
27 membrana nuclear; corpos psamomatosos (Figura 3C) originados do depósito
28 de cálcio – geralmente são numerosos – e núcleo em vidro fosco (Figura 3D)
29 (Abdullah *et al.*, 2019; Asa, 2019).

30 **Figura 3** – Alterações histológicas encontradas no carcinoma papilífero.



1

2 Imagens representativas das principais alterações histológicas observadas no carcinoma
 3 papilífero de tireoide (CPT). (A) Pseudoinclusões nucleares, resultantes de invaginações
 4 citoplasmáticas no núcleo. (B) Fendas nucleares, que ocorrem devido a dobras na membrana
 5 nuclear. (C) Corpos psamomatosos, que são estruturas calcificadas. (D) Núcleo em vidro fosco,
 6 caracterizado pela dispersão da cromatina, conferindo um padrão claro e homogêneo ao núcleo.
 7 Fonte: modificado de Anatpat.unicamp.br

8

9 A primeira escolha de tratamento consiste na tireoidectomia, sendo a
 10 mais comum a tireoidectomia total devido ao risco da doença no lobo
 11 contralateral (Nabhan *et al.*, 2021). Além disso, pode-se associar também a
 12 linfadenectomia quando há metástase em linfonodos (Kosciuszko *et al.*, 2023).
 13 A radio iodo terapia é recomendada para remover as células restantes após a
 14 cirurgia e impedir a recidiva; a dose utilizada varia muito de acordo com o
 15 estadiamento do tumor (Abdullah *et al.*, 2019). Após a cirurgia de tireoidectomia
 16 total, é necessário realizar a terapia hormonal com levotiroxina por toda a vida
 17 (Kosciuszko *et al.*, 2023). Além disso, os níveis de tireoglobulina e do anticorpo
 18 anti-tireoglobulina devem ser monitorados periodicamente (Kim, 2014).

19

1 **1.4 Estresse oxidativo e câncer de tireoide**

2 O estresse oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre moléculas pró-
3 oxidantes e antioxidantes, podendo ser causado por uma produção excessiva
4 de pró-oxidantes ou uma ação ineficiente dos antioxidantes (Kochman *et al.*,
5 2021). O CPT é o tipo de neoplasia de tireoide que mais se associa com o
6 estresse oxidativo (Buczyńska *et al.*, 2023).

7 As moléculas pró-oxidantes podem ser divididas em dois grupos: os
8 radicais livres e as espécies reativas (Ameziane-El-Hassani, Schlumberger,
9 Dupuy, 2016). Os radicais livres são assim chamados por apresentarem um
10 elétron desemparelhado na sua camada de valência, tornando-o altamente
11 reativo (Ferreira & Matsubara, 1997). Ao buscar o emparelhamento para doar o
12 elétron excedente (se reduzir) ou receber um novo elétron (se oxidar), os radicais
13 livres acabam danificando e reagindo com membranas celulares, proteínas, e o
14 DNA (Ifeanyi, 2018; Mccord, 2000). Alguns representantes dessa classe são os
15 radicais peróxil, hidroperoxil, superóxido, alcóxil e o hidroxil, sendo o último o
16 mais reativo e com maior potencial danoso (Barry Halliwell & John Gutteridge,
17 1999, Kochman *et al.*, 2021). As espécies reativas podem ser de oxigênio (ERO),
18 nitrogênio, enxofre, e cloro, podendo reagir com outras moléculas, como o ferro,
19 gerando radicais livres (Ferreira & Matsubara, 1997). As ERO consistem em
20 moléculas derivadas do oxigênio e que são mais reativas do que ele, estando
21 nesse grupo o H₂O₂, ânion superóxido, ácido hipocloroso (Barry Halliwell & John
22 Gutteridge, 1999). Alguns representantes das espécies reativas de nitrogênio
23 são o óxido nítrico e o peroxinitrito (Mancini *et al.*, 2016).

24 As principais fontes de moléculas pró-oxidantes no organismo são a
25 cadeia transportadora de elétrons, a fagocitose, e a atividade de enzimas como
26 a NADPH oxidase, xantina oxidase e as enzimas do citocromo P450 (Ameziane-
27 El-Hassani *et al.*, 2019; Moloney, Cotter, 2018). As NADPH oxidases são
28 transportadoras de elétrons transmembrana que utilizam o NADH comoceptor
29 de elétrons. (Muzza *et al.*, 2016). Existem diferentes isoformas que estão
30 presentes em diversos tecidos e células como linfócitos (Ifeanyi, 2018). Na
31 tireoide, encontram-se as NADPH oxidases 1 e 2, que geram H₂O₂ durante a
32 organificação do iodeto e a NADPH oxidase 4 (a isoforma mais abundante), que
33 produz outras espécies reativas (Muzza *et al.*, 2022; Ameziane-El-Hassani *et al.*,

1 2019). Já foi evidenciado também que essa produção é aumentada no CPT em
2 relação a tireoide normal (Muzza *et al.*, 2022).

3 O H₂O₂ é gerado principalmente pelo metabolismo de enzimas da família
4 das NADPH oxidases, pela enzima superóxido dismutase (SOD), e pelo
5 complexo III da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria (Sies 2016).
6 Essa ERO pode se difundir facilmente pelas membranas celulares da tireoide,
7 processo regulado pela TPO, iniciando processos como a proliferação celular e
8 recrutamento de células imunes (Ameziane-El-Hassani, Schlumberger, Dupuy,
9 2016; Sies 2016). Quando há uma desregulação nesse processo, mutações
10 espontâneas na glândula, dano ao DNA, e a proliferação celular podem ocorrer
11 (Ameziane-El-Hassani *et al.*, 2019; Gong *et al.*, 2024). O H₂O₂ é capaz de
12 modular diversos fatores de transcrição como o fator nuclear relacionado ao
13 eritróide 2 (Nrf2), relacionado com a ativação de defesas antioxidantes, o fator
14 nuclear kappa B (NF-κB), envolvido na inflamação, e o fator induzido por hipóxia
15 (HIF), responsável por adaptação tumoral a hipóxia (Sies 2016). Além disso,
16 essa ERO pode ser convertida a radical hidroxil na presença de ferro através da
17 reação de Fenton, um dos radicais com maior potencial danoso (Ifeanyi, 2018).
18 O radical hidroxil é capaz de promover a oxidação do DNA, instabilidade genética
19 e rearranjo de cromossomos (Ameziane-El-Hassani *et al.*, 2019).

20 Os pró-oxidantes são capazes de reagir com ácidos graxos
21 poliinsaturados presentes nas membranas celulares, formando radicais lipídicos
22 e aldeídos como o 4-hidroxinonenal (HNE) e malondialdeído (MDA) (Barrera *et al.*,
23 2018; Pizzimenti *et al.*, 2021). A formação desses compostos é chamada de
24 peroxidação lipídica e pode prejudicar a função celular normal e aumentar a
25 fluidez da membrana (Avery, 2011; Deavall *et al.*, 2012). Além disso, as proteínas
26 são sensíveis à oxidação, fosforilação, metilação, acetilação, ubiquitinação e
27 glicosilação (Akagawa, 2021). Essas modificações são capazes de alterar
28 diretamente vias de sinalização, a atividade de enzimas, e a estrutura e função
29 de proteínas, especialmente as de membranas (Deavall *et al.*, 2012). A oxidação
30 pode ser mediada por ERO e espécies reativas de nitrogênio, podendo ocorrer
31 a modificação de aminoácidos e a formação de produtos oxidativos como os
32 hidroperóxidos (Deavall *et al.*, 2012; Moloney, Cotter, 2018). Outra característica
33 de modificações oxidativas é a introdução de grupamentos carbonil nas cadeias

1 laterais de proteínas, uma modificação pós-translacional irreversível,
2 denominada de carbonilação de proteínas; esse processo leva a mudanças
3 conformacionais e a consequente perda de função (Akagawa, 2021). As ERO
4 podem também oxidar proteínas quinases envolvidas com vias de fatores de
5 crescimento, estimulando a angiogênese tumoral (Burgoyne *et al.*, 2015;
6 Krylatov *et al.*, 2018). Ademais, evidências na literatura sugerem que os produtos
7 da peroxidação lipídica também parecem estar associados com o processo de
8 iniciação e promoção tumoral (Stanley *et al.*, 2015).

9 As moléculas pró-oxidantes participam também de processos
10 imunológicos como a destruição de partículas fagocitadas, de vias de sinalização
11 como a via do fator de necrose tumoral α (TNF- α), via do NF- κ B, além de
12 regularem a proliferação e a sobrevivência celular (Kochman *et al.*, 2021; Reuter
13 *et al.*, 2010; Sosa *et al.*, 2013). Outro fato importante é que a inflamação está
14 intimamente ligada com o aumento da produção de espécies reativas, levando
15 a um ciclo vicioso onde um estado promove a manutenção do outro (Mancini *et al.*
16 *et al.*, 2016). Basicamente, as espécies reativas, principalmente o H₂O₂, ativam o
17 fator de transcrição NF- κ B, que por consequência, aumenta a produção de
18 citocinas que aumentam a produção de espécies reativas (Mancini *et al.*, 2016).
19 Além disso, a carbonilação de resíduos de cisteína de defesas antioxidantes
20 está envolvida com a ativação de genes pró-inflamatórios (Yapseu *et al.*, 2022).

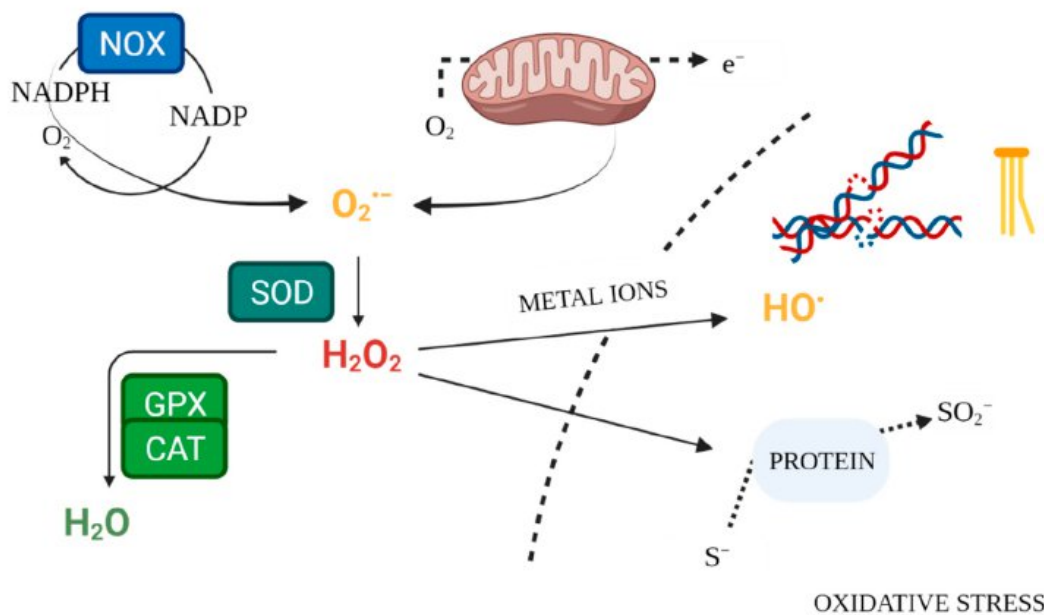
21 Para manter o equilíbrio redox, prevenir o estresse oxidativo e evitar
22 danos oxidativos as biomoléculas, é fundamental a participação do sistema
23 antioxidante celular (Krylatov *et al.*, 2018; Forman & Zhang, 2021) (Figura 4).
24 Esse sistema é capaz de atrasar, prevenir ou reparar o dano oxidativo causado
25 pelos oxidantes (Ameziane-El-Hassani, Schlumberger, Dupuy, 2016, Barry
26 Halliwell & John Gutteridge, 1999). Na tireoide, os antioxidantes são essenciais
27 para neutralizar os oxidantes produzidos durante a síntese hormonal; no entanto,
28 em concentrações elevadas, podem atuar também como oxidantes (Sabatino *et al.*
29 *et al.*, 2023). Isso acontece devido a reação com o ferro na reação de Fenton,
30 levando a formação de espécies reativas (Kazmierczak-Baranska *et al.*, 2020).
31 O sistema antioxidante é dividido em enzimático e não enzimático (Zhang *et al.*,
32 2019; Brigelius-Flohé & Flohé, 2020). Dentre as defesas enzimáticas estão a
33 SOD, catalase, tioredoxina redutase (TrxR), peroxirredoxina (Prx), glutathione

1 peroxidase (GPx), e a glutathiona redutase (GR) na tireoide (Birben *et al.*, 2012).
 2 Alguns elementos que participam da síntese hormonal, como o iodeto, selênio
 3 e zinco, também atuam desempenham papéis antioxidantes (Lui *et al.*, 2024).

4 Deixar mais linkado a relação entre estresse, inflamação, hipoxia e câncer
 5 de tireoide

6

7 **Figura 4** – Equilíbrio redox na tireoide.



9 Esquema representando o equilíbrio redox na tireoide, destacando o papel das espécies reativas
 10 de oxigênio (ERO) e dos mecanismos antioxidantes na manutenção da homeostase celular.
 11 Durante a síntese dos hormônios tireoidianos, há uma produção fisiológica de peróxido de
 12 hidrogênio (H_2O_2) pela enzima NOX (ou DUOX 2), processo essencial para a organificação do
 13 iodeto e a formação da tireoglobulina iodada. Para evitar danos oxidativos, a célula conta com
 14 um sistema antioxidante eficiente, composto por enzimas como a superóxido dismutase (SOD),
 15 catalase, glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e tioredoxina redutase (TrxR),
 16 além de antioxidantes não enzimáticos, como a glutathiona reduzida (GSH). O equilíbrio entre a
 17 geração de ERO e a atividade antioxidante é fundamental para evitar o estresse oxidativo, que
 18 pode contribuir para a disfunção tireoidiana e processos tumorais. Fonte: Kochman *et al.*, 2021.

19

20 A SOD é uma metaloenzima que apresenta três isoformas de acordo com
 21 a sua localização e o metal a qual está associada. A SOD1, também chamada
 22 de cobre/zinco (Cu/ZnSOD) está presente principalmente no citosol, a SOD2

1 (MnSOD), a manganês, está localizada na mitocôndria, e a SOD 3 (Cu/ZnSOD),
2 presente no meio extracelular (Moloney, Cotter, 2018). Seu principal papel como
3 antioxidante é converter o ânion superóxido proveniente do metabolismo da
4 mitocôndria em H_2O_2 e oxigênio (Kochman *et al.*, 2021; Mishra *et al.*, 2018). A
5 catalase, nos peroxissomos, GR nas mitocôndrias, e as Prx e TrxR no citosol,
6 são responsáveis por fazer principalmente a redução do H_2O_2 , mantendo o
7 equilíbrio redox na tireoide (Ameziane-El-Hassani *et al.*, 2019; Muzza *et al.*,
8 2022).

9 A GPx é uma família de oito enzimas, responsáveis por reduzir o H_2O_2
10 utilizando a glutathiona reduzida (GSH) como substrato, gerando GSSG e H_2O
11 (Zhang *et al.*, 2023). Além disso, essas enzimas também atuam na detoxificação
12 de lipoperóxidos (Mancini *et al.*, 2016). Na tireoide, as principais isoformas são
13 a GPx1, GPx3 e GPx4 (Zhang *et al.*, 2023). A GPx3 é predominantemente
14 presente nos rins, seguido pela tireoide, onde encontra-se majoritariamente no
15 interior dos tireócitos, ou ligada a tireoglobulina presente no coloide (Schmutzler
16 *et al.*, 2007).

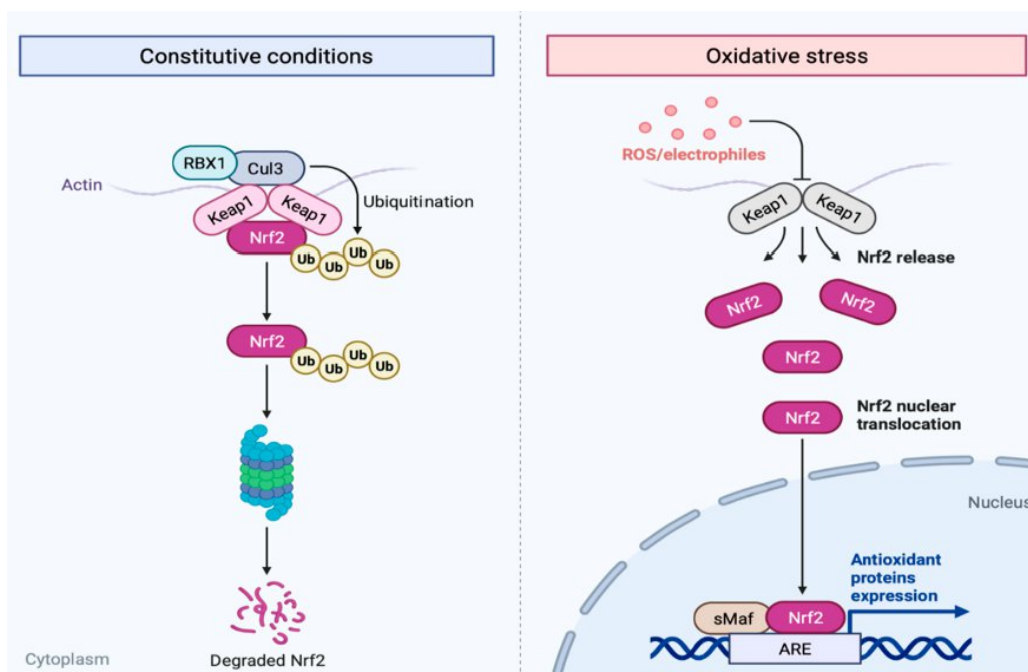
17 A glutathiona é um tripeptídeo de baixo peso molecular composto pelos
18 aminoácidos cisteína, glicina e glutamato (Eskandari *et al.*, 2024). Está presente
19 intracelularmente na forma oxidada (GSSG) e reduzida (GSH), sendo essa
20 última a principal defesa antioxidante não enzimática (Oestreicher, Morgan,
21 2018). Graças ao seu grupamento thiol (SH), ela possui a capacidade de doar
22 um elétron, neutralizando os oxidantes (Eskandari *et al.*, 2024). Outros exemplos
23 de antioxidantes não enzimáticos incluem a vitamina C, a vitamina E e o selênio
24 na tireoide (Ifeanyi, 2018).

25 Os níveis de antioxidantes intracelulares são regulados através de vias
26 de sinalização, como a via do fator nuclear eritróide 2-related factor 2 (Nrf2)
27 (Danilovic *et al.*, 2017) (Figura 5). O Nrf2 é uma proteína codificada pelo gene
28 NFE2L2 que aumenta a expressão e a atividade de enzimas como a SOD,
29 catalase e GPx, aumenta a produção de GSH, regula negativamente a
30 transcrição de citocinas pró-inflamatórias (Renaud *et al.*, 2019; Vysakh *et al.*,
31 2016; Moloney, Cotter, 2018), e positivamente a transcrição de genes de defesas
32 antioxidantes (Gong *et al.*, 2024). Consequentemente, tem-se um reparo dos

1 danos oxidativos em componentes celulares causados pelas ERO (Bae, Hallis,
 2 Kwak, 2024). Em condições basais, o Nrf2 encontra-se ligado a proteína Keap1,
 3 responsável por estabilizar essa molécula e a sinalizar para ubiquitinação
 4 (Sabatino *et al.*, 2023). Quem realiza a ubiquitinação é o complexo ubiquitina
 5 ligase Cullin 3, sendo esse processo seguido pela degradação de Nrf2 via
 6 proteassoma (Márton *et al.*, 2018). No estresse oxidativo, essa degradação
 7 deixa de acontecer devido a oxidação dos grupamentos cisteínas de Keap1
 8 (Renaud *et al.*, 2019). Assim, o Nrf2 é direcionado para o núcleo onde se liga a
 9 região promotora responsiva a antioxidantes (ARE), que está associadas com a
 10 transcrição de genes de defesas antioxidantes (Hahn, Oliveira, Bock, 2017, Bae,
 11 Hallis, Kwak, 2024). Na tireoide, o Nrf2 é fundamental para o funcionamento
 12 normal da glândula, impactando positivamente a disponibilidade de
 13 tireoglobulina (Renaud *et al.*, 2019). Além disso, essa via é ativada durante a
 14 produção hormonal para proteção contra as próprias espécies reativas que são
 15 geradas (Sabatino *et al.*, 2023).

16

17 **Figura 5** – Via do Nrf2 em condições basais e durante o estresse oxidativo.



18

19 A imagem ilustra a regulação do fator nuclear relacionado ao eritróide 2 (Nrf2) sob condições
 20 normais e em situações de estresse oxidativo. Em condições basais, o Nrf2 encontra-se no
 21 citoplasma acoplado à proteína Keap1, que o direciona para a ubiquitinação. Esse processo é

1 mediado pela proteína Cullin 3 e é seguido da degradação via proteassoma. No estresse
2 oxidativo, os grupamentos cisteína de Keap1 são oxidados, resultando na liberação de Nrf2 e na
3 sua translocação para o núcleo. No núcleo, Nrf2 se liga a uma região do DNA chamada de
4 elemento responsivo a antioxidantes (ARE), promovendo a transcrição de genes envolvidos na
5 defesa antioxidante. Fonte: Hammad *et al.*, 2023.

6

7 Quando há aumento na produção de moléculas pró-oxidantes ou uma
8 redução nos antioxidantes, ocorre um desbalanço redox, caracterizando o
9 estresse oxidativo (Ameziane-El-Hassani, Schlumberger, Dupuy, 2016). Por
10 consequência, membranas celulares, proteínas, e DNA celular e mitocondrial
11 podem sofrer danos oxidativos (Moloney, Cotter, 2018). Justamente esses danos
12 estão presente em diversas doenças, incluindo o câncer de tireoide, contribuindo
13 para a progressão, transição epitélio-mesênquima, e invasão (Ameziane-El-
14 Hassani *et al.*, 2019). No CPT, a geração de estresse oxidativo está relacionada
15 com angiogênese e invasão, e, portanto, com a gravidade da doença (Buczyńska
16 *et al.*, 2023). Além disso, está intimamente ligado com a produção de citocinas
17 pró-inflamatórias, processos envolvidos na carcinogênese e em doenças
18 autoimunes da tireoide (Crnčić *et al.*, 2020).

19

20 **1.5 Estresse oxidativo, hipóxia e câncer de tireoide**

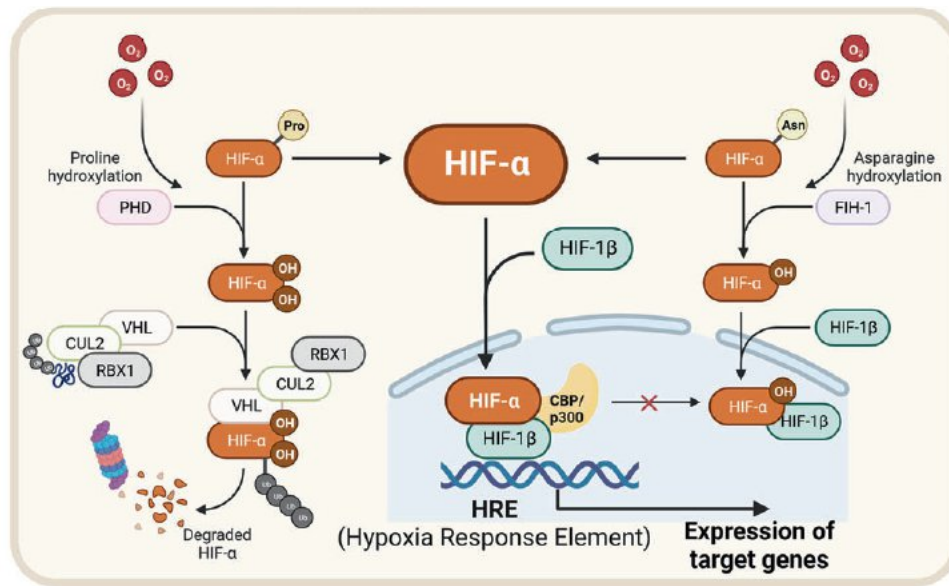
21 No câncer em geral, o estresse oxidativo facilita a sobrevivência das
22 células tumorais em ambientes de hipóxia (Liu *et al.*, 2016); a hipóxia consiste
23 em uma demanda insuficiente de oxigênio para os tecidos (McGarry *et al.*, 2018).
24 A maior parte dos tumores sólidos possui regiões de hipóxia por falta de
25 vascularização e suprimento sanguíneo (Febrero *et al.*, 2024). É nesse contexto
26 que entra um fator de transcrição muito importante, o fator induzível por hipóxia
27 (HIF) (Zhang *et al.*, 2022). O HIF consiste em uma família de heterodímeros,
28 formados por uma das três subunidades sensíveis ao oxigênio, HIF-1 α , HIF-2 α
29 ou HIF-3 α , e por uma subunidade estável e constitutivamente expressa, o HIF-
30 1 β (Tirpe *et al.*, 2019). O HIF-1 α é a subunidade mais estudada e expressa em
31 mais tecidos, sendo rapidamente ativado na hipóxia aguda, enquanto o HIF-2 α
32 é menos expresso e se estabiliza somente em condições crônicas de hipóxia; o

1 HIF-3 α ainda é pouco estudado e as informações sobre ele são escassas (Bae,
2 Hallis, Kwak, 2024).

3 Em condições normais de oxigênio, a subunidade HIF-1 α é marcada para
4 degradação através da hidroxilação dos resíduos de prolina do HIF pela enzima
5 do domínio da prolil hidroxilase (PHD) e pela proteína reguladora de HIF (FIH)
6 (Tirpe *et al.*, 2019) (Figura 6). Posteriormente, essa subunidade é reconhecida
7 pela proteína von-Hippel-Lindau (VHL) que faz parte de um complexo com a
8 ubiquitina, marcando o HIF-1 α para degradação via proteassoma (Bae, Hallis,
9 Kwak, 2024). Quando ocorre a hipóxia, a atividade da PHD e FIH são diminuídas
10 devido à baixa concentração de oxigênio, resultando no acúmulo de HIF1- α no
11 citoplasma e seu direcionamento para o núcleo (Taylor *et al.*, 2022). No núcleo,
12 a subunidade α se dimeriza com o HIF-1 β (Bae, Hallis, Kwak, 2024). Esse
13 complexo se liga então a uma sequência do DNA conhecida como elementos
14 responsivos à hipóxia, estimulando fatores de transcrição relacionados a
15 transição epitélio-mesênquima e a angiogênese, levando a invasão e a
16 adaptação celular a hipóxia (Abdullah *et al.*, 2019). De forma semelhante, no
17 estresse oxidativo, as espécies reativas, principalmente o H₂O₂ podem inibir a
18 PHD através da oxidação do ferro presente em seu sítio catalítico (Bae, Hallis,
19 Kwak, 2024). Como resultado, o HIF não é encaminhado para degradação e o
20 mesmo processo explicado anteriormente, ocorre (Taylor *et al.*, 2022). Além
21 disso, sabe-se que a hipóxia gera mais ERO, perpetuando o estresse oxidativo
22 e esse ciclo a favor do tumor (Bae, Hallis, Kwak, 2024).

23

24 **Figura 6** – Via de finalização HIF-1 α em condições de hipóxia e estresse
25 oxidativo.



1

2 Representação da ativação do fator induzível por hipóxia 1-alfa (HIF-1 α) em resposta à hipóxia
 3 e ao estresse oxidativo. Em condições normais de oxigênio, a subunidade HIF-1 α é hidroxilada
 4 pelas enzimas do domínio da prolil hidroxilase (PHD) e pela proteína reguladora de HIF (FIH),
 5 sendo posteriormente reconhecida pela proteína von Hippel-Lindau (VHL) e degradada via
 6 proteassoma. No entanto, em condições de hipóxia, a atividade das PHD e FIH são reduzidas,
 7 permitindo o acúmulo de HIF-1 α no citoplasma e sua translocação para o núcleo. No núcleo,
 8 HIF-1 α se dimeriza com HIF-1 β e se liga a elementos responsivos à hipóxia no DNA, promovendo
 9 a expressão de genes relacionados à angiogênese, metabolismo glicolítico e invasão tumoral.
 10 Da mesma forma, espécies reativas de oxigênio podem inibir a atividade das PHD por meio da
 11 oxidação de seus resíduos de cisteína, resultando na estabilização de HIF-1 α e perpetuação do
 12 estresse oxidativo. Fonte: Bae, Hallis, Kwak, 2024.

13

14 No câncer de tireoide, o aumento da expressão de HIF-1 α está
 15 relacionado com uma maior vascularização, pior prognóstico e agressividade do
 16 tumor (Abdullah et al., 2019, Zhang *et al.*, 2022). De acordo com Song et al.,
 17 2023, o ambiente de hipóxia no câncer de tireoide aumenta a glicólise e a
 18 expressão de transportadores de glicose, favorecendo o crescimento e
 19 progressão do tumor. A via da glicólise gera lactato, acidificando o
 20 microambiente tumoral e possibilitando que as células neoplásicas utilizem esse
 21 lactato para se proliferar (Febrero *et al.*, 2024). Além disso, a ativação de HIF
 22 parece estar envolvida com a evasão da resposta imune antitumoral nesse tipo
 23 de câncer (Zhang, Zhao, Zhao, 2023). Por fim, esse ambiente de hipóxia
 24 promove a diferenciação de fibroblastos em fibroblastos associados ao câncer,

1 que produzem uma matriz extracelular mais alinhada, facilitando a invasão e
2 metástase (Febrero *et al.*, 2024).

3

4 **1.6 Inflamação e câncer de tireoide**

5 A inflamação, principalmente crônica, é um processo que está
6 intimamente ligado ao estresse oxidativo devido a produção de diversas ERO
7 nas respostas imunes (Stanley *et al.*, 2015). Na inflamação crônica, tem-se um
8 desequilíbrio redox em favor dos oxidantes (Kucuk, Oltulu, 2021), ocasionando
9 instabilidade genômica, danos ao DNA, e ativação de vias de sinalização que
10 estimulam a produção de citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-6, e IL-10 que
11 perpetuam esse ciclo (McGarry *et al.*, 2018). Nesse contexto, evidências na
12 literatura sugerem que a inflamação além de estar associada com a
13 carcinogênese, também participa do crescimento tumoral, metástase,
14 angiogênese e transição epitélio-mesênquima de diversos tipos de cânceres
15 (Provatopoulou, *et al.*, 2014; Kucuk, Oltulu, 2021). Mais especificamente,
16 acredita-se que o desbalanço entre citocinas pró- e anti-inflamatórias esteja
17 relacionado com o câncer de tireoide (Xi *et al.*, 2020). Um fato que corrobora
18 com essa teoria é a observação de infiltrados de células imunes nesse tipo de
19 câncer (Banerjee *et al.*, 2023; Zheng, Sun, Wei, 2024). A inflamação crônica em
20 especial está envolvida com carcinomas diferenciados de tireoide,
21 especialmente a secreção de citocinas como IL-27 (Zhang *et al.*, 2021). As
22 células neoplásicas não só se desenvolvem nesse ambiente inflamatório como
23 também criam mecanismos para se beneficiar dele (Febrero *et al.*, 2024).

24 O recrutamento de células imunes efetoras para o tumor acontece graças
25 a secreção de citocinas e quimiocinas pelas próprias células tumorais e por
26 células do sistema imune (Carvalho *et al.*, 2017). As interleucinas são proteínas
27 da família das citocinas, produzidas por células imunes e responsáveis por
28 regular fatores de transcrição e a resposta inflamatória (Xi *et al.*, 2020). O tipo e
29 a intensidade da resposta irão variar de acordo com as citocinas secretadas
30 (Carvalho *et al.*, 2017). Uma resposta pró-inflamatória é ativada por citocinas
31 como a IL-12 e o TNF- α ; já a IL-4 ativa moléculas anti-apoptóticas nas células
32 tumorais (Carvalho *et al.*, 2017). As citocinas pró-inflamatórias promovem a

1 proliferação e remodelamento do tumor, além de possibilitarem a invasão graças
2 à angiogênese que é estimulada (Xi *et al.*, 2020).

3 As células da tireoide são uma fonte de citocinas como IL-1, IL-6, IL-12,
4 e IL-13, principalmente em doenças autoimunes (Kammoun-Krichen *et al.*,
5 2012). A IL-6 e a IL-23 estão relacionadas com a agressividade, metástase e
6 pior prognóstico de diversos tipos de câncer, incluindo o papilífero, por
7 suprimirem a resposta imune antitumoral e estimularem a ativação de proteínas
8 anti-apoptóticas (Provatopoulou, *et al.*, 2014; Mei *et al.*, 2015; Carvalho *et al.*,
9 2017). Nesse sentido, quando células imunes são recrutadas para o
10 microambiente, as células tumorais induzem a secreção de moléculas que
11 suprimem a resposta antitumoral (Xi *et al.*, 2020). O TNF- α por exemplo é uma
12 citocina que pode ter um efeito ambíguo dependendo de suas concentrações:
13 quando presente em menor quantidade, promove angiogênese e metástase, e
14 em altas quantidades, exerce efeitos antitumorais (Banerjee *et al.*, 2023). Além
15 disso, em baixas concentrações, pode agir ainda em sinergismo com o INF- γ e
16 estimular a liberação de mais citocinas (Febrero *et al.*, 2024). A IL-1 α e a IL-1 β ,
17 interleucinas da família da IL-1, desempenham papéis diferentes no câncer (Xi
18 *et al.*, 2020). A IL-1 α participa da produção e liberação hormonal e pode
19 favorecer a proliferação das células no CPT (Kammoun-Krichen *et al.*, 2012).
20 Por outro lado, a IL-1 β pode suprimir a proliferação e a invasão nesse tipo de
21 câncer (Xi *et al.*, 2020). Dessa mesma família, a IL-1Ra, ou antagonista do
22 receptor de IL-1, inibe os efeitos pró-inflamatórios da IL-1 ao se ligar em seu
23 receptor e impedir suas ações (Xi *et al.*, 2020). A IL-10 é uma interleucina anti-
24 inflamatória que favorece a evasão da resposta imune antitumoral, estando
25 possivelmente relacionada com a agressividade do câncer de tireoide (Xi *et al.*,
26 2020). Considerando essas informações, investigar os níveis de citocinas em
27 pacientes com CPT pode ajudar a prever o prognóstico dessa doença.

28 Ainda no contexto de inflamação e câncer, as quimiocinas também
29 desempenham um papel importante na carcinogênese e progressão da doença
30 (Kucuk, Oltulu, 2021). Essas proteínas solúveis são classificadas como citocinas
31 quimioatraentes e desempenham suas funções ao se ligar em receptores de
32 superfície de células (Yapa *et al.*, 2017). Existem quatro grupos de quimiocinas
33 de acordo com a posição do resíduo de cisteína nos receptores de ligante: CXC,

1 CC, C, CXC3 (Yapa et al., 2017). A ligação quimiocina-receptor não é específica,
2 ou seja, uma mesma quimiocina pode se ligar a diferentes receptores e vice-
3 versa (Yapa et al., 2017). No microambiente tumoral, as células tumorais podem
4 manipular o padrão de secreção de quimiocinas para que elas contribuam com
5 a angiogênese, crescimento do tumor e facilitem a ocorrência de metástase
6 (Karin, Razon, 2017; Antonelli *et al.*, 2009). A quimiocina TARC (timo e
7 quimiocina regulada por ativação), também conhecida como CCL17, é uma
8 molécula produzida por monócitos, macrófagos, células dendríticas e eosinófilos,
9 desempenhando um papel essencial no recrutamento de linfócitos T auxiliares
10 do tipo Th2 e Th17 por meio da sua interação com o receptor CCR4 (Lupancu
11 et al., 2023; Okamoto et al., 2003). No contexto do câncer, TARC está associada
12 à progressão tumoral e já foi descrita como um potencial marcador prognóstico
13 em algumas neoplasias (Lim, Kim, Chung et al., 2015). No entanto, sua relação
14 com o CPT ainda é pouco explorada.

15 No CPT, diversas células imunes estão presentes no microambiente
16 tumoral produzindo citocinas que podem favorecer a progressão do tumor
17 (Ferrari *et al.*, 2019). Os macrófagos associados ao tumor são recrutados pelas
18 quimiocinas CCL2, CCL5, CCL7, CCL8, CCL12, CXCL8 e CXCL16 (Yapa *et al.*,
19 2017). Mais comumente assumem o fenótipo M2, visto que o fenótipo M1
20 participa da imunidade antitumoral (Cai *et al.*, 2024). Os macrófagos M2 estão
21 presentes em tumores maiores, e, assim como os neutrófilos, associam-se com
22 progressão e pior prognóstico da doença (Yapa *et al.*, 2017; Ferrari *et al.*, 2019).
23 As células dendríticas ativam linfócitos T regulatórios através da secreção de IL-
24 10 e TGF-beta, estando relacionados também com pior prognóstico (Ferrari *et*
25 *al.*, 2019). A célula natural killer secreta INF-gama, TNF-alfa e CXCL10, ativando
26 macrófagos, aumentando a inflamação e atraindo outras células imunes para o
27 tumor (Yapa *et al.*, 2017). Já os linfócitos T secretam IL-2 e IL-5, favorecendo a
28 proliferação de mais células T, e o TNF-alfa e INF-gama induzem a apoptose
29 das células tumorais e aumentam a resposta imune contra o tumor. Por fim, os
30 mastócitos são atraídos pela CXCL1, CXCL10, e CXCL8 e secretam IL-6, uma
31 citocina que pode contribuir para o crescimento tumoral (Yapa *et al.*, 2017).
32 Essas células parecem estar envolvidas também com o processo de transição
33 epitélio-mesênquima através da liberação de CXCL8/IL-8 (Ferrari *et al.*, 2019).

1 **2. HIPÓTESE**

2 Há uma diferença entre os grupos benigno e CPT em relação aos níveis
3 de marcadores de estresse oxidativo tecidual e plasmático, em marcadores de
4 hipóxia tecidual, bem como nos níveis de citocinas plasmáticas.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

1 **3. OBJETIVOS**

2 **3.1 Objetivo geral**

3 Investigar a participação de mediadores químicos da inflamação
4 sistemicamente e o estresse oxidativo tecidual e sistêmico em pacientes com
5 CPT comparando com neoplasias benignas.

6

7 **3.2 Objetivos específicos**

8 1. Avaliar por imunofluorescência e imunohistoquímica marcadores
9 associados a hipóxia tumoral, proliferação celular e estresse oxidativo.

10 2. Quantificar parâmetros oxidativos e antioxidantes do microambiente
11 tumoral;

12 3. Avaliar o perfil inflamatório e estresse oxidativo sistêmico associado ao
13 CPT.

14 4. Identificar casos de CPT passíveis de relato na literatura com o intuito de
15 relatar um caso real e atípico.

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

1 **4. RESULTADOS**

2 O estudo analisou duas coortes distintas de pacientes além de relatar um
3 caso na literatura de uma apresentação atípica de CPT. Na primeira coorte,
4 comparou-se marcadores sistêmicos de estresse oxidativo e inflamação no CPT
5 e em tumores benignos, revelando perfis distintos. Na segunda, o microambiente
6 tumoral foi o foco de estudo, quantificando os níveis de marcadores de estresse
7 oxidativo e hipóxia em tecidos normais, no CPT e em tumores benignos.

8 No plasma dos pacientes da primeira coorte, o grupo CPT apresentou
9 níveis significativamente elevados de carbonilação de proteínas, H₂O₂ e tióis,
10 sugerindo maior estresse oxidativo sistêmico. É importante pontuar que níveis
11 plasmáticos mais altos de TARC foram observados nos tumores benignos, o que
12 pode refletir uma resposta imune regulatória, prevenindo inflamações crônicas
13 e a transformação maligna. Outras citocinas e quimiocinas avaliadas
14 apresentaram níveis similares entre os grupos.

15 Entretanto, no microambiente tumoral, não foram observadas diferenças
16 significativas nos níveis GSH, catalase ou hidroperóxidos entre os grupos. As
17 análises imunohistoquímicas da segunda coorte indicaram uma maior presença
18 de Nrf2 e HIF-1 α no CPT em relação ao grupo benigno, estando associados a
19 respostas ao estresse oxidativo e à hipóxia, respectivamente. A marcação de
20 PCNA por imunohistoquímica, relacionada à proliferação celular, foi baixa em
21 ambos os grupos, sugerindo baixa atividade proliferativa nas amostras
22 analisadas. A análise por imunofluorescência confirmou maior intensidade de
23 fluorescência de Nrf2, GPx3, e HIF-1 α no grupo CPT, destacando presença do
24 estresse oxidativo e da hipóxia nesse câncer.

25 O relato de caso foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa
26 envolvendo seres humanos (CEP) da Universidade Estadual de Londrina
27 (CAAE: 86096625.0.0000.5231). Foi descrito um caso de CPT de variante
28 folicular infiltrativa em um paciente de 71 anos, com apresentação clínica atípica,
29 incluindo desconforto faríngeo e insuficiência respiratória. O diagnóstico foi
30 estabelecido após biópsia de uma massa neoplásica no pescoço, que revelou
31 invasão de estruturas adjacentes. O tratamento incluiu radioterapia, resultando
32 na estabilização do tumor e na ausência de progressão da doença após nove
33 meses de acompanhamento. Este caso destaca a agressividade dessa variante

1 em comparação as outras, reforçando a importância do diagnóstico precoce e
2 do manejo multidisciplinar, especialmente em apresentações clínicas incomuns.

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

1 **5. CONCLUSÃO**

2 Os achados deste estudo demonstram a relevância dos marcadores de
3 estresse oxidativo, inflamação e hipóxia na diferenciação entre CPT e neoplasias
4 benignas, além de evidenciarem o papel desses processos na patogênese do
5 câncer. A análise sistêmica dos pacientes destacou um ambiente de estresse
6 oxidativo exacerbado no CPT. Esses marcadores sistêmicos refletem um
7 desequilíbrio redox associado à carcinogênese, contribuindo para a instabilidade
8 genômica e adaptação tumoral. Em contraste, os níveis de TARC foram mais
9 elevados em tumores benignos, sugerindo um possível papel imunomodulador
10 que poderia limitar processos inflamatórios crônicos e a transformação maligna.

11 No microambiente tumoral, os resultados de imunohistoquímica e
12 imunofluorescência reforçaram o papel da hipóxia e do estresse oxidativo na
13 angiogênese, adaptação celular e a resistência à apoptose. No entanto, os níveis
14 similares dos marcadores de estresse oxidativo no tecido sugerem que a
15 ativação de vias relacionadas à resistência oxidativa pode não ser suficiente
16 para contrabalançar o aumento do estresse oxidativo no contexto tumoral.

17 Além das análises moleculares e bioquímicas, o estudo também contribui
18 para a literatura com o relato de um caso atípico de carcinoma papilífero de
19 variante folicular infiltrativa, marcado por uma evolução clínica rápida e desfecho
20 favorável. Este caso reforça a importância do diagnóstico precoce e da
21 intervenção adequada, mesmo em variantes mais agressivas do CPT.

22 Em síntese, os resultados deste estudo reforçam a importância do
23 estresse oxidativo e da hipóxia como potenciais biomarcadores para a
24 diferenciação entre CPT e neoplasias benignas, além de destacarem o papel da
25 inflamação no microambiente tumoral. Esses achados contribuem para o
26 entendimento dos mecanismos envolvidos na patogênese do CPT e abrem
27 perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visem
28 modular o estresse oxidativo e a inflamação como abordagens complementares
29 no manejo clínico desses pacientes.

5. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

O presente trabalho originou dois artigos científicos que serão incluídos nesta tese como Anexos. Todas as análises experimentais foram realizadas na Universidade Estadual de Londrina, nos laboratórios de Patologia Molecular e de Fisiopatologia e Radicais Livres.

O primeiro artigo é um artigo original, que se encontra no Anexo 1 e intitula-se: **“Distinct oxidative stress profiles in tissues and plasma in papillary thyroid carcinoma”**

O segundo consiste em um relato de caso, que se encontra no Anexo 2, intitulado de: **“Aggressive infiltrative follicular variant of papillary thyroid carcinoma”** e que foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina. Este artigo foi submetido para a revista Journal of Clinical Images and Medical Case Reports (ISSN 2766-7820) Impact Factor: 2.6.

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

1 REFERÊNCIAS

- 2
- 3 **ABDULLAH, M. I. et al. Papillary thyroid cancer: Genetic alterations and**
4 **molecular biomarker investigations.** International Journal of Medical
5 Sciences, v. 16, 2019.
- 6 **AKAGAWA, M. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological**
7 **implications, and analytical approaches.** Free Radical Research, v. 55, n. 4,
8 p. 1–37, 12 nov. 2020.
- 9 **AMEZIANE EL HASSANI, R. et al. Oxidative stress in thyroid carcinomas:**
10 **Biological and clinical significance.** Endocrine-Related Cancer, v. 26, n.3, p.
11 R131-R143, 2019.
- 12 **AMEZIANE-EL-HASSANI, R.; SCHLUMBERGER, M.; DUPUY, C. NADPH**
13 **oxidases: New actors in thyroid cancer?** Nature Reviews, v.12, n.8, p.485-
14 94, 2016.
- 15 **ANTONELLI, A. et al. Monokine induced by interferon gamma (IFN γ)**
16 **(CXCL9) and IFN γ inducible T-cell alpha-chemoattractant (CXCL11)**
17 **involvement in Graves' disease and ophthalmopathy: modulation by**
18 **peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists.** The journal of
19 clinical endocrinology and metabolism, v. 94, n. 5, p. 1803–1809, 2009.
- 20 **ASA, S. L. The Current Histologic Classification of Thyroid Cancer.**
21 Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, v.48, n.1, p.1-22,
22 2019.
- 23 **AVERY, S. V. Molecular targets of oxidative stress.** The Biochemical journal,
24 v. 434, n. 2, p. 201–210, 2011.
- 25 **BAE, T.; HALLIS, S. P.; KWAK, M. K. Hypoxia, oxidative stress, and the**
26 **interplay of HIFs and NRF2 signaling in cancer.** Experimental and Molecular
27 Medicine, 2024.
- 28 **BALOCH, Z.; METE, O.; ASA, S. L. Immunohistochemical Biomarkers in**
29 **Thyroid Pathology.** Endocrine Pathology, v.29, n.2, p.91-112, 2018.
- 30 **BANERJEE, S. et al. IL-17 A correlates with disease progression in**
31 **papillary thyroid carcinoma.** Diagnostic Pathology, v. 18, n. 1, 2023.
- 32 **BARRERA, G. et al. Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-**
33 **hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders.**
34 Antioxidants, v. 7, n. 8, p. 102, 2018.
- 35 **BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense.** The World
36 Allergy Organization journal, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.
- 37 **BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; FLOHÉ, L. Regulatory phenomena in the**
38 **glutathione peroxidase superfamily.** Antioxidants & Redox Signaling, v. 33,
39 n. 7, p. 498–516, 2020.

- 1 BUCZYŃSKA, A. et al. **Clinical significance of oxidative stress markers as**
2 **angi invasion and metastasis indicators in papillary thyroid cancer.**
3 *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, 2023.
- 4 CAI, Y. et al. **Association between blood inflammatory indicators and**
5 **prognosis of papillary thyroid carcinoma: a narrative review.** *Gland*
6 *Surgery*, v.13, n.6, p.1088-1096, 2024.
- 7 CARVALHO, D. F. G. et al. **High IL-17 expression is associated with an**
8 **unfavorable prognosis in thyroid cancer.** *Oncology Letters*, v. 13, n. 3, p.
9 1925–1931, 2017.
- 10 CARVALHO, D. P.; DUPUY, C. **Thyroid hormone biosynthesis and release.**
11 *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 458, p. 6–15, 2017.
- 12 CHARTOUMPEKIS, D. V. et al. **Emerging roles of Keap1/Nrf2 signaling in**
13 **the thyroid gland and perspectives for bench-to bedside translation.** *Free*
14 *Radical Biology and Medicine*, v.190, p.276-283, 2022.
- 15 CRNČIĆ, T. B. et al. **Risk factors for thyroid cancer: What do we know so**
16 **far?** *Acta Clinica*, v. 59, p. 66–72, 2020.
- 17 DANILOVIC, D. L. S. et al. **Oncogenic mutations in KEAP1 disturbing**
18 **inhibitory Nrf2-Keap1 interaction: Activation of antioxidative pathway in**
19 **papillary thyroid carcinoma.** *Head and Neck*, v. 40, n. 6, p. 1271–1278, 2018.
- 20 DEAVALL, D. G. et al. **Drug-induced oxidative stress and toxicity.** *Journal of*
21 *toxicology*, v. 2012, p. 1–13, 2012.
- 22 ESKANDARI, F. et al. **From balance to imbalance: disruption of plasma**
23 **glutathione concentration in micropapillary thyroid carcinoma.** *Thyroid*
24 *Research*, v. 17, n. 1, 2024.
- 25 FEBRERO, B. et al. **Tumor microenvironment in thyroid cancer: Immune**
26 **cells, patterns, and novel treatments.** *Head and Neck*, v.46, n.6, p.1486-
27 14991, 2024.
- 28 FERRARI, S. M. et al. **Immune and inflammatory cells in thyroid cancer**
29 **microenvironment.** *International Journal of Molecular Sciences*, v.20, n.18,
30 p.4413, 2019.
- 31 FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. **Defesa E Estresse Oxidativo.**
32 *Medicina*, v. 43, n.1, p.61–68, 1997.
- 33 FORMAN, H. J.; ZHANG, H. **Targeting oxidative stress in disease: Promise**
34 **and limitations of antioxidant therapy.** *Nature Reviews Drug Discovery*, v.
35 20, p. 689–709, 2021.
- 36 FOSTER, J. R.; TINWELL, H.; MELCHING-KOLLMUSS, S. **A review of**
37 **species differences in the control of, and response to, chemical-induced**
38 **thyroid hormone perturbations leading to thyroid cancer.** *Archives of*
39 *Toxicology*, v.95, n.3, p.807-836, 2021.

- 1 GLOBAL CANCER OBSERVATORY. **Thyroid cancer mortality**. Lyon:
2 International Agency for Research on Cancer, 2020. Disponível em:
3 <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 13 dez. 2024.
- 4 GONG, Z. et al. **Targeting Nrf2 to treat thyroid cancer**. Biomedicine and
5 Pharmacotherapy, v.173, p.116324, 2024.
- 6 HAHN, G. F.; OLIVEIRA, J. R.; BOCK, P. M. **The role of factor 2 erythroid
7 nuclear factor 2 (Nrf2) in diabetes mellitus**. Clinical & Biomedical Research,
8 v.37, n.3, p.203-213, 2017.
- 9 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and
10 Medicine**. 3^a ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- 11 HAMMAD, M. et al. **Roles of Oxidative Stress and Nrf2 Signaling in
12 Pathogenic and Non-Pathogenic Cells: A Possible General Mechanism of
13 Resistance to Therapy**. Antioxidants, v.12, v.7, p.1371, 2023.
- 14 HAN, M. A.; KIM, J. H. **Diagnostic X-ray exposure and thyroid cancer risk:
15 Systematic review and meta-analysis**. Thyroid, v. 28, n. 2, p. 220–228, 2018.
- 16 HOLZER, G.; ROUX, N.; LAUDET, V. **Evolution of ligands, receptors and
17 metabolizing enzymes of thyroid signaling**. Molecular and Cellular
18 Endocrinology, v. 459, p. 5–13, 2017.
- 19 HONG, S. et al. **Distinct molecular subtypes of papillary thyroid carcinoma
20 and gene signature with diagnostic capability**. Oncogene, v. 41, n. 47, p.
21 5121–5132, 2022.
- 22 HUANG, Y. et al. **Nitric oxide and thyroid carcinoma: A review**. Frontiers in
23 Endocrinology, v.13, p.1050656, 2023.
- 24 IFEANYI, O. E. **A Review on Free Radicals and Antioxidants**. International
25 Journal of Current Research in Medical Sciences, v.4, n.2, p.123-133, 2018.
- 26 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Cânceres de cabeça e
27 pescoço**. Rio de Janeiro: INCA, 2023. Disponível em:
28 <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cabeca-e-pescoco>. Acesso em: 13 dez.
29 2024.
- 30 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Estatísticas de câncer**. Rio de
31 Janeiro: INCA, 2024. Disponível em: [https://www.gov.br/inca/pt-
32 br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios](https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios).
33 Acesso em: 13 dez. 2024.
- 34 JUHLIN, C. C.; METE O; BALOCH, Z.W. **The 2022 WHO classification of
35 thyroid tumors: novel concepts in nomenclature and grading**. Endocrine-
36 Related Cancer, v.30, n.2, p.e220293, 2022.
- 37 JUNG, C. K.; BYCHKOV, A.; KAKUDO, K. **Update from the 2022 World
38 Health Organization Classification of Thyroid Tumors: A Standardized
39 Diagnostic Approach**. Endocrinology and Metabolism, v.37, n.5, p.703-718,
40 2022.

- 1 JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia básica, texto e atlas**. 12^a
2 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- 3 KAMMOUN-KRICHEN, M. et al. **IL- β a potential factor for discriminating**
4 **between thyroid carcinoma and atrophic thyroiditis**. European Cytokine
5 Network, v. 23, n. 3, p. 101–106, 2012.
- 6 KARIN, N.; RAZON, H. **Chemokines beyond chemo-attraction: CXCL10 and**
7 **its significant role in cancer and autoimmunity**. Cytokine, v. 109, p. 24–28,
8 2018.
- 9 KAŻMIERCZAK-BARAŃSKA, J. et al. **Two faces of vitamin C-antioxidative**
10 **and pro-oxidative agent**. Nutrients, v. 12, n. 5, 2020.
- 11 KIM, W. B. **A closer look at papillary thyroid carcinoma**. Endocrinology and
12 Metabolism, v. 30, n. 1, p. 1–6, 2015.
- 13 KIRSTEN D. **The thyroid gland: physiology and pathophysiology**. Neonatal
14 Network, v.19, n.8, p.11-26, 2020.
- 15 KOCHMAN, J. et al. **The influence of oxidative stress on thyroid diseases**.
16 Antioxidants, v. 10, n. 9, 2021.
- 17 KOŚCIUSZKO, M. et al. **Could Oxidative Stress Play a Role in the**
18 **Development and Clinical Management of Differentiated Thyroid Cancer?**
19 **Cancers**, v.15, n.12, p.3182, 2023.
- 20 KRYLATOV, A. V. et al. **Reactive oxygen species as intracellular signaling**
21 **molecules in the cardiovascular system**. Current cardiology reviews, v. 14, n.
22 4, p. 290–300, 2018.
- 23 KUCUK, S.; OLTULU, P. **The relationship between types of inflammatory**
24 **cells located at the micro-environment of papillary thyroid**
25 **microcarcinoma prognostic factors**. JBUON, v. 26, n. 5, p. 2162–2173, 2021.
- 26 KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins patologia básica**. Rio de
27 Janeiro: Saunders Elsevier, 2013. xvi, 910 p.
- 28 LEE, H. J. et al. **Immunogenetics of autoimmune thyroid diseases: A**
29 **comprehensive review**. Journal of Autoimmunity, v.64, p.82-90, 2015.
- 30 LIM, J. B.; KIM, D. K.; CHUNG, H. W. **Clinical significance of serum thymus**
31 **and activation-regulated chemokine in gastric cancer: Potential as a**
32 **serum biomarker**. Cancer Science, v. 105, n. 10, p. 1327–1333, 2014.
- 33 LIU, Y. M. et al. **Expression of HIF-1 α and HIF-2 α correlates to biological**
34 **and clinical significance in papillary thyroid carcinoma**. World Journal of
35 Surgical Oncology, v. 14, n. 1, 2016.
- 36 LUPANCU, T. J. et al. **CCL17/TARC in autoimmunity and inflammation—not**
37 **just a T-cell chemokine**. Immunology and Cell Biology, v.101, n.7, p.600-609,
38 2023.
- 39 MANCINI, A. et al. **Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation**.

- 1 Mediators of Inflammation, v.2016, p.6757154, 2016.
- 2 MÁRTON, M., et al. O. **NRF2-regulated cell cycle arrest early stage of**
3 **oxidative stress response mechanism.** Plos One, v.13, n.11, 2018.
- 4 MCCORD, J. M. **The evolution of free radicals and oxidative stress.**
5 American Journal of Medicine, v.108, n.8, p.652–659, 2000.
- 6 MCGARRY, T. et al. **Hypoxia, oxidative stress and inflammation.** Free
7 Radical Biology and Medicine, v.125, p.15-24, 2018.
- 8 MEI, Z. et al. **Interleukin-23 facilitates thyroid cancer cell migration and**
9 **invasion by inhibiting SOCS4 expression via MicroRNA-25.** PLoS ONE, v.
10 10, n. 10, 2015.
- 11 MIRKATOULI, N. B.; HIROTA, S.; YOSHINAGA, S. **Thyroid cancer risk after**
12 **radiation exposure in adults - systematic review and meta-analysis.**
13 Journal of Radiation Research, v.64, n.6, p.893-903, 2023.
- 14 MISHRA, R.; PATEL, H.; YUAN, L.; GARRETT, J. T. **Role of reactive oxygen**
15 **species and targeted therapy in melanoma.** Cancer Research Frontiers, v. 4,
16 n. 1, p. 101-130, 2018.
- 17 MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. **Ros signaling in the biology of cancer.**
18 Seminars in cell & developmental biology, v. 80, p. 50-64, 2018.
- 19 MULLUR, R. et al. **Thyroid Hormone Regulation of Metabolism.** Physiol Rev,
20 v. 94, p. 355–382, 2014.
- 21 MUZZA, M. et al. **Oxidative stress and the subcellular localization of the**
22 **telomerase reverse transcriptase (TERT) in papillary thyroid cancer.**
23 Molecular and Cellular Endocrinology, v. 431, p. 54–61, 2016.
- 24 MUZZA, M. et al. **Oxidative Stress Correlates with More Aggressive**
25 **Features in Thyroid Cancer.** Cancers, v. 14, n. 23, 1 dez. 2022.
- 26 NABHAN, F.; DEDHIA, P. H.; RINGEL, M. D. **Thyroid cancer, recent**
27 **advances in diagnosis and therapy.** International Journal of Cancer, v.149,
28 n.5, p.984-992, 2021.
- 29 OESTREICHER, J.; MORGAN, B. **Glutathione: subcellular distribution and**
30 **membrane transport 1.** Biochemistry and cell biology, v. 97, n. 3, p. 270–289,
31 2019.
- 32 OKAMOTO, H. et al. **A role for TARC/CCL17, a CC chemokine, in systemic**
33 **lupus erythematosus.** J Rheumatol, v. 30, n. 11, p. 2369-73, 2003.
- 34 PIZZIMENTI, S. et al. **Oxidative stress-related mechanisms in melanoma**
35 **and in the acquired resistance to targeted therapies.** Antioxidants (Basel,
36 Switzerland), v. 10, n. 12, p. 1942, 2021.
- 37 PROVATOPOULOU, X. et al. **Interleukins as markers of inflammation in**
38 **malignant and benign thyroid disease.** Inflammation Research, v. 63, n. 8, p.
39 667–674, 2014.

- 1 RENAUD, C. O. et al. **Keap1/Nrf2 Signaling: A New Player in Thyroid**
2 **Pathophysiology and Thyroid Cancer.** *Frontiers in Endocrinology*, v. 10,
3 2019.
- 4 REUTER, S.; GRUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B.
5 **Oxidative stress, inflammation and câncer: How are they linked?** *Free*
6 *Radical Biology & Medicine*, v. 49, n. 11, p.1603-1616, 2010.
- 7 ROVCANIN, B. et al. **Redox metabolism correlates with cellular turnover**
8 **and clinical phenotype of papillary thyroid carcinoma and colloid goiter.**
9 *Archives of Medical Science*, v. 18, n. 5, p. 1308–1317, 2022.
- 10 SABATINO, L. **Nrf2-Mediated Antioxidant Defense and Thyroid Hormone**
11 **Signaling: A Focus on Cardioprotective Effects.** *Antioxidants*, v.12, n.6,
12 p.1177, 2023.
- 13 SCHMUTZLER, C. et al. **Selenoproteins of the thyroid gland: expression,**
14 **localization and possible function of glutathione peroxidase 3.** *Biological*
15 *Chemistry*, v. 388, n. 10, 1 jan. 2007.
- 16 SIES, H. **Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in**
17 **physiological oxidative stress: Oxidative eustress.** *Redox Biology*, v. 11, p.
18 613–619, abr. 2017.
- 19 SOHN, S. Y.; LEE, J.-J.; LEE, J. H. **Molecular profile and clinicopathologic**
20 **features of follicular variant papillary thyroid carcinoma.** *Pathology*
21 *oncology research: POR*, v. 26, n. 2, p. 927–936, 2019.
- 22 SONG, H. et al. **HIF-1 α /YAP Signaling Rewrites Glucose/Iodine Metabolism**
23 **Program to Promote Papillary Thyroid Cancer Progression.** *International*
24 *Journal of Biological Sciences*, v. 19, n. 1, p. 225–241, 2023.
- 25 SORRENTI, S. et al. **Iodine: Its role in thyroid hormone biosynthesis and**
26 **beyond.** *Nutrients*, v.3, n.12, p.4469.
- 27 SOSA, V. et al. **Oxidative stress and cancer: an overview.** *Ageing Research*
28 *Reviews*, v. 12, p. 376-390, 2013.
- 29 SUTEAU, V. et al. **Sex Bias in Differentiated Thyroid Cancer.** *International*
30 *Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 23, p. 12992, 2021.
- 31 STANLEY, J. A. et al. **Lipid peroxidation and antioxidants status in human**
32 **malignant and non-malignant thyroid tumours.** *Human and Experimental*
33 *Toxicology*, v. 35, n. 6, p. 585–597, 2016.
- 34 STATHATOS, N. **Thyroid Physiology.** *Medical Clinics of North America*, v.96,
35 n.2, p.165-73, 2012.
- 36 SZANTO, I.; PUSZTASZERI, M.; MAVROMATI, M. **H₂O₂ metabolism in**
37 **normal thyroid cells and in thyroid tumorigenesis: Focus on NADPH**
38 **oxidases.** *Antioxidants*, v. 8, n. 5, 2019.
- 39 TAYLOR, C. T.; SCHOLZ, C. C. **The effect of HIF on metabolism and**
40 **immunity.** *Nature Reviews*, v.18, p.573–587, 2022.

- 1 THANAS, C. et al. **The keap1/nrf2 signaling pathway in the thyroid—2020**
2 **update**. *Antioxidants*, v.9, n.11, p.1082, 2020.
- 3 TIRPE, A. A. et al. **Hypoxia: Overview on hypoxia-mediated mechanisms**
4 **with a focus on the role of hif genes**. *International Journal of Molecular*
5 *Sciences*, v.20, n.24, p.6140, 2019.
- 6 VYSAKH A., et al. **Role of NF- κ B Signaling Pathway and Oxidative Stress in**
7 **Liver Inflammation**. *Austin Hepatol*, v. 1, n. 1, p.1 004–1, 2016.
- 8 WANG, F. et al. **Selenium and thyroid diseases**. *Frontiers in Endocrinology*,
9 v.14, p.1133000, 2023.
- 10 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em:
11 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 13 dez.
12 2024.
- 13 XI, C. et al. **Interleukins in Thyroid Cancer: From Basic Researches to**
14 **Applications in Clinical Practice**. *Frontiers in Immunology*, v.11, p.1124,
15 2020.
- 16 YAPA, S. et al. **The Role of Chemokines in Thyroid Carcinoma**. *Thyroid*, v.
17 27, n. 11, p. 1347–1359, 2017.
- 18 YAPSEU, G. Y. F.; TOLA, A. J.; MISSIHOUN, T. D. **Proteome-wide analysis**
19 **of hydrogen peroxide-induced protein carbonylation in *Arabidopsis***
20 ***thaliana***. *Frontiers in Plant Science*, v. 13, 2022.
- 21 ZHANG, L. et al. **Biochemical basis and metabolic interplay of redox**
22 **regulation**. *Redox biology*, v. 26, n. 101284, p. 101284, 2019.
- 23 ZHANG, L. et al. **HIF-1 α and Caspase-3 expression in aggressive papillary**
24 **thyroid carcinoma**. *World Journal of Surgical Oncology*, v. 20, n. 1, 2022.
- 25 ZHANG, R.; ZHAO, J.; ZHAO, L. **EPAS1/HIF-2 α Acts as an Unanticipated**
26 **Tumor-Suppressive Role in Papillary Thyroid Carcinoma**. *International*
27 *Journal of General Medicine*, v. 16, p. 2165–2174, 2023.
- 28 ZHANG, X. et al. **Relationship Between Serum Inflammatory Factor Levels**
29 **and Differentiated Thyroid Carcinoma**. *Technology in Cancer Research and*
30 *Treatment*, v. 20, 2021.
- 31 ZHENG, X.; SUN, R.; WEI, T. **Immune microenvironment in papillary**
32 **thyroid carcinoma: roles of immune cells and checkpoints in disease**
33 **progression and therapeutic implications**. *Frontiers in Immunology*, v.15,
34 p.1438235, 2024.
- 35
- 36
- 37

1

2

3

4

5

6

7

8

ANEXOS

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23 **ANEXO A – Distinct oxidative stress profiles in tissues and plasma of**
24 **patients with papillary thyroid carcinoma**

1 Liara Freitas Cavalcanti, Michelle Sanchez Carrijo, Luca Kiichi Suzuki Trancolin,
2 Marcos Elias de Almeida, William Capellari Fumegalli, Jôse de Melo, Isabella
3 Chagas Silva, Walison Augusto da Silva Brito, Natália Lopes de Medeiros, André
4 Armani, Sander Bekeschus, Alessandra Lourenço Cecchini, Rubens Cecchini.

5

6 **Abstract**

7 Thyroid cancer, notably papillary thyroid carcinoma (PTC), is the most prevalent
8 endocrine malignancy. Oxidative stress (OS), a disturbance in the balance
9 between reactive oxygen species (ROS) and antioxidants, along with chronic
10 inflammation, plays a role in PTC promotion and progression. This study
11 examined oxidative stress and inflammatory markers in PTC and benign thyroid
12 tumors showing for the first time the thymus and activation-regulated chemokine
13 (TARC) levels in plasma, and GSH, hydroperoxides, glutathione peroxidase 3
14 (GPx3), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), and hypoxia-inducible
15 factor 1-alpha (HIF- α) in tumors. Blood plasma and tissues samples were
16 collected from two cohorts of patients. The first cohort involved blood plasma
17 measurements of protein carbonylation, hydrogen peroxide (H₂O₂), thiol levels,
18 and inflammatory cytokines in benign and PTC groups. The second cohort
19 included thyroid tissues (benign, and PTC) analyzed for OS markers such as
20 glutathione (GSH), catalase, and membrane hydroperoxides, along with
21 immunofluorescence staining for HIF-1 α , Nrf2, and GPx3. In cohort one, plasma
22 levels of protein carbonylation ($p = 0.003$), H₂O₂ ($p < 0.0001$), and thiols ($p =$
23 0.015) were elevated in PTC group. Notably, plasma levels of TARC were higher
24 in benign group ($p = 0.035$), while other cytokines and chemokines showed no
25 significant changes. In cohort two, no significant differences were observed
26 between groups regarding tissue OS markers. In immunofluorescence, the
27 fluorescence intensity of HIF-1 α ($p = 0.024$), Nrf2 ($p = 0.008$) and GPx3 ($p =$
28 0.040) were significantly higher in the PTC group compared with benign. This
29 study highlights distinct OS profiles in the tissue and systemic circulation of
30 patients with PTC, with plasma oxidants emerging as potential biomarkers for
31 malignancy. Increased fluorescence of Nrf2, GPx3, and HIF-1 α in PTC tissues
32 reinforce the role of oxidative stress and hypoxia in PTC. Unexpectedly higher
33 TARC levels in benign tumors suggest a complex regulation of the immune
34 response in thyroid tumors, warranting further investigation. These findings may
35 contribute to understanding the pathophysiology of PTC and the role of OS and
36 inflammation in these tumors, in addition to potentially guiding future therapeutic
37 strategies.

38 **Keywords:** Gpx3; HIF-1 α ; hypoxia; Nrf2; oxidative stress; TARC; papillary
39 thyroid carcinoma.

40 **1. Introduction**

1 Thyroid cancer, the seventh most common cancer globally, is especially
2 prevalent in women (GCO, 2022; INCA, 2023). Papillary thyroid carcinoma
3 (PTC), the most common malignant subtype, accounts for approximately 80% –
4 90% of thyroid malignancies (Qin et al., 2021; Buczyńska et al., 2023). Despite
5 its generally favorable prognosis, some cases exhibit aggressive behavior,
6 metastasis, and therapeutic resistance (Cai et al., 2024; Abdullah et al., 2019).
7 Oxidative stress, inflammation, and hypoxia, may contribute to PTC
8 pathogenesis, working together to promote cellular damage, genomic instability,
9 and tumor adaptation (Ameziane-El-Hassani et al., 2019; Febrero et al., 2024).

10 Oxidative stress, an imbalance between reactive oxygen species (ROS)
11 and antioxidant defenses, results in biomolecular oxidation and disruption of
12 cellular homeostasis (Kochman et al., 2021). In the thyroid, ROS are directly
13 involved in hormone synthesis, and increased activity of dual oxidase 2 (DUOX2),
14 the primary source of H₂O₂, has been observed in PTC (Kosciuszko et al., 2023;
15 Ameziane-El-Hassani et al., 2019). Indeed, high levels of H₂O₂ were already
16 described in thyroid tumors (Muzza et al., 2022), in addition to protein
17 carbonylation in the serum (Terzioglu et al., 2016). Persistent oxidative stress
18 can induce lipid peroxidation, DNA damage, and mutations, contributing to
19 genomic instability, carcinogenesis, and tumor progression (Stanley et al., 2016;
20 Renaud et al., 2019). Additionally, the nuclear factor erythroid 2-related factor 2
21 (Nrf2) pathway promotes the synthesis of antioxidant defenses in response to
22 ROS, particularly GSH and glutathione peroxidase (GPx) (Danilovic et al., 2018),
23 maintaining the redox balance (Ameziane-El-Hassani et al., 2019; Sabatino et
24 al., 2023). Moreover, the presence of Nrf2 and GPx proteins in PTC tissues was
25 not investigated yet.

26 Another key factor in PTC is hypoxia (Bae, Hallis, & Kwak, 2024), a state
27 that promotes the stabilization of hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1α),
28 activating genes involved in angiogenesis, glycolytic metabolism, and immune
29 evasion (Tirpe et al., 2019; Bae, Hallis, & Kwak, 2024). In PTC, HIF-1α
30 overexpression is associated with increased tumor aggressiveness and
31 enhanced proliferation rates (Abdullah et al., 2019; Zhang et al., 2022). A higher
32 presence of this protein in cancer tissues compared with adjacent thyroid tissue
33 was already demonstrated (Zhang et al., 2022; Liu et al., 2016). Furthermore,

1 oxidative stress directly regulates HIF-1 α by inhibiting the activity of HIF
2 regulatory proteins, thereby perpetuating a tumor-adaptive cycle (Bae, Hallis, &
3 Kwak, 2024).

4 Chronic inflammation also plays a critical role in PTC progression (Bertol
5 et al., 2020). Pro-inflammatory cytokines have been linked with PTC
6 aggressiveness and poor prognosis (Carvalho et al., 2017). In this context, higher
7 levels of IL-6 in thyroid cancer (Provatopoulou et al., 2014) and higher levels of
8 TNF- α in PTC (Kobawala et al., 2016) were already reported. Additionally, certain
9 chemokines facilitate lymph node metastasis and systemic tumor dissemination
10 (Yapa et al., 2017; Zhang et al., 2023). Thymus and activation-regulated
11 chemokine (TARC) is a chemokine that can predict the prognosis of certain
12 cancers (Lim, Kim, Chung et al., 2015; Diepstra et al., 2023). However, its role in
13 PTC was not investigated until date.

14 Finally, oxidative stress and inflammation are closely associated, since
15 immune cells produce ROS, and ROS such as H₂O₂ can activate the NF- κ B
16 pathway that leads to cytokine production, perpetuating this cycle (Oliveira-
17 Marques, 2009). Given the complex interplay between oxidative stress, hypoxia,
18 and inflammation, understanding how these pathways influence the
19 pathogenesis of PTC could help identify prognostic biomarkers and develop more
20 effective therapeutic targets. Thus, this study examined oxidative stress and
21 inflammatory markers in PTC, comparing them with benign tumors to identify
22 potential biological signatures associated with this type of cancer.

23

24 **2. Methods**

25 *2.1. Patients and study design*

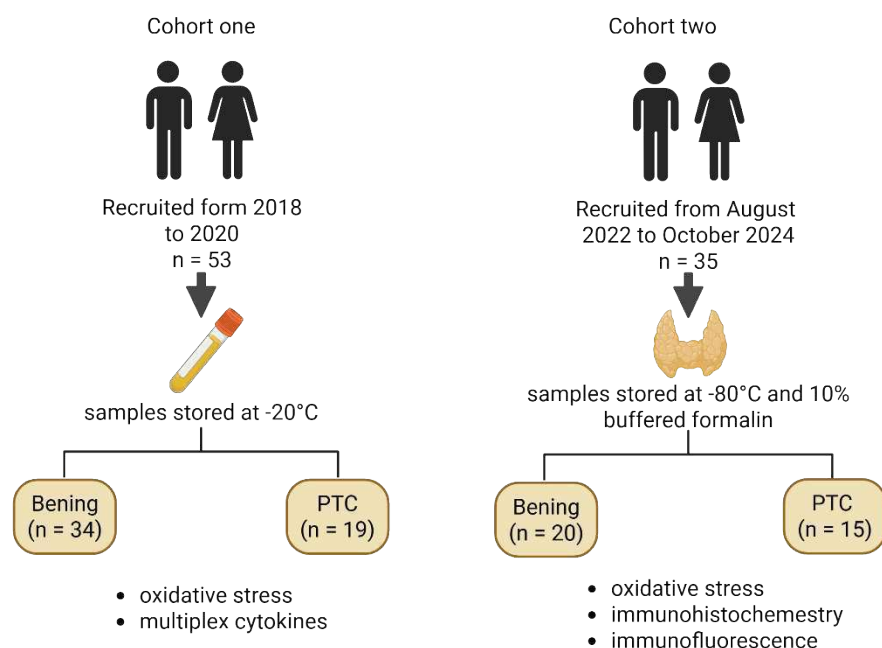
26 All following experiments were approved by the research ethics committee
27 of State University of Londrina (CAAE 71362823.1.0000.5231) and followed the
28 Declaration of Helsinki. Two cohorts of patients who did not have undergone any
29 kind of prior treatment were analyzed (Figure 1). Cohort one was formed by
30 patients (n = 53, 48 women and 5 men) who had blood plasma collected between
31 2018 and 2020. The samples were stored at -20°C for 36 months and were used

1 to quantify systemic oxidative stress and cytokine levels (CAAE
 2 no.92992418.6.0000.5231). Cohort two consisted of patients (n = 35, 33 women
 3 and 3 men) with thyroid tumors, recruited by convenience from University
 4 Hospital of State University of Londrina (HU-UEL), Hospital do Coração, and
 5 Hospital Araucaria from August 2022 to October 2024. Two samples of nodules
 6 were collected after total thyroidectomy. The first was used for oxidative stress
 7 and was stored frozen at -80° with 90% fetal bovine serum and 10% dimethyl
 8 sulfoxide. The second was used in immunofluorescence analysis, collected in
 9 buffered formalin (10%).

10 In both cohorts, the patients were divided into two groups: benign (follicular
 11 adenoma, multinodular colloid goiter, and nodular hyperplasia of the thyroid),
 12 and PTC. Patients with hepatic, cardiac or renal dysfunction and using antioxidant
 13 therapy were excluded from the study. A questionnaire was applied for both
 14 cohorts to obtain categorical data before surgery and the diagnosis was
 15 performed by a specialist pathologist. All patients signed the informed consent
 16 form before the surgery and sample collection.

17

18 **Figure 1** – Experimental design of the study.



19

1 Schematic representation of the study design, illustrating the two cohorts and the analyses
2 performed. Cohort one included blood plasma samples collected from patients with benign tumors
3 and papillary thyroid carcinoma (PTC), and the levels of oxidative stress markers (protein
4 carbonylation, hydrogen peroxide [H₂O₂], and thiol levels) and inflammatory cytokine was
5 evaluated. Cohort two consisted of tissue samples collected from benign tumors and PTC, which
6 were analyzed for oxidative stress markers (GSH, catalase, and membrane hydroperoxides) and
7 immunohistochemical and immunofluorescence staining (PCNA, HIF-1 α , Gpx3, and Nrf2).

8

9 *2.2. Oxidative stress in blood plasma*

10 The blood plasma stored at -20°C was used in the following analysis. The
11 protein carbonylation was quantified as described by Levine et al., 1990. The
12 samples were diluted in distilled water (1:15) and incubated with 2,4-
13 dinitrophenylhydrazine 10 mM for one hour in an ice bath, vortexing every 15
14 minutes. Then, were centrifuged at 3500 rpm for 10 min at room temperature
15 (RT), washed with 5 mL 20% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged
16 again for 10 min to collect the protein precipitates. Another wash was performed
17 using 10%TCA, and protein pellets washed three times with 4 ml of ethanol 50%
18 to remove free DNPH and lipid contaminants. The final precipitates were
19 dissolved in 2 ml of 0.6 M guanidine hydrochloride for 10 min at 37°C. Carbonyl
20 content was determined in a spectrophotometer (Shimadzu UV-1650 PC) in an
21 absorbance range of 355 – 390 nm, comparing the samples with samples treated
22 with 2.5 M HCl. Carbonyl content was expressed in nanograms per milliliter of
23 total protein.

24 Total thiols levels were determined in a spectrophotometer (Shimadzu
25 UV-1650 PC) at 412 nm using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) as described
26 by Hu, 1994. The concentration in samples was determined from a standard
27 curve of known concentrations of GSH (Sigma-Aldrich), and the results were
28 expressed in mM of thiol.

29 Total protein was measured in blood plasma according to Lowry et al.,
30 1951 to express the results of protein carbonylation and total thiols. Supernatant
31 or homogenate were mixed with Cupric reagent (1:1), resting for 10 minutes at
32 room temperature. Then, the Folin reagent was added (1:3) and incubated in a

1 50°C bath for 10 min. The absorbance was read in a spectrophotometer at 660
2 nm (Thermo Scientific Multiskan FC).

3 H₂O₂ levels were quantified by chemiluminescence with the luminol-
4 potassium ferricyanide method described by Cavalcanti et al., 2022. To reduce
5 the protein and interfering substances in the sample, sulfosalicylic acid 10% (2:1
6 v/v) (Vetec Química Fina Ltda.) v/v was added, followed by centrifugation at
7 3,500 rpm for 10 minutes at 4°C. The pH was adjusted to 7 with NaOH 8% and
8 a dilution of five times was performed. The reads were performed in a
9 luminometer (Lumat³ LB9508 Berthold®), always in triplicate, at 21 to 24°C. To
10 the reaction, a luminol solution of 10 µM was used. The solution of potassium
11 ferricyanide solution (4.5 mM) was automatically injected and the reaction was
12 read for 15 seconds. The concentration was calculated from a standard curve of
13 known concentrations and the results were expressed in µM of H₂O₂.

14

15 *2.3. Inflammatory profile in blood plasma*

16 The inflammatory profile was measured in plasma following the
17 instructions of the manufacturer using the multiplex cytokine detection technology
18 (LEGENDplex; BioLegend, Amsterdam, The Netherlands). Bead-based
19 sandwich immunoassay was measured using flow cytometry (CytoFLEX LX;
20 Beckman-Coulter, Germany) targeting interleukins (IL-12p70, IL-6, IL-4, IL-10,
21 IL-1β, IL-1RA, IL-12p40, IL-23), tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interferon
22 (IFN) γ, CXCL10, TARC and arginase. Data analysis was performed using
23 LEGENDplex software for target quantification, and the assay was performed as
24 described by Bekeschus et al., 2018.

25

26 *2.4. Oxidative stress in tumor microenvironment*

27 Nodule tissues were homogenized in an Ultra-Turrax homogenizer
28 containing 50 mg of tissue/mL of PBS buffer at pH 7.4. The total homogenate
29 was used to quantify hydroperoxides by chemiluminescence and for GSH and
30 catalase assays the homogenate was centrifuged for 20 min (10.000x g, 4°C) to
31 obtain the supernatant.

1 The production of membrane hydroperoxides was measured by
2 chemiluminescence induced via tert-17 butyl hydroperoxide as described by
3 Flecha, et al., 1991. The homogenate was incubated with a phosphate
4 monobasic buffer, pH 7.4, 10 mM (0.9% NaCl) at 37°C for five minutes. Then, a
5 solution of 1mM of hemin was added for five minutes. The chemiluminescent
6 reaction was initiated by the addition of tert-butyl and the reads were performed
7 in a Lumat3 LB9508 luminometer 20 (Berthold Technologies GmbH & Co.KG).
8 The results were expressed as the peak of light emission and the area under the
9 curve.

10 The GSH levels were quantified by the same chemiluminescence
11 technique described for H₂O₂. The concentration was calculated from a standard
12 curve of known concentrations and the results were expressed in μM of GSH.

13 Catalase activity was determined in the supernatant as described by Aebi,
14 1984. The samples were incubated in a system containing 1 M TRIS buffer and
15 200 mM H₂O₂ solution. Absorbance disappearance kinetic was monitored in a
16 spectrophotometer at 240 nm (Shimadzu UV-1650 PC). The results were
17 expressed in absorbance values per minute per milliliter of sample (vabs min⁻¹
18 ml⁻¹).

19 Total protein was measured in the supernatant and homogenate as
20 described previously to express the results of hydroperoxides and catalase.

21 *2.5. Immunofluorescence*

22 The analysis was performed using nodular tissue samples collected after
23 total thyroidectomy. The paraffin-embedded thyroid samples were sliced in 5 μm-
24 thick sections mounted on silane-coated slides (Sigma Aldrich St. Louis, MO,
25 USA). Then, they were deparaffinized, rehydrated, and immersed in buffer
26 containing 11,2 uM citrate, 25 uM acetate and 6% tween, pH 6.0, and submitted
27 to heat-induced epitope retrieval at 98°C for 30 min. The slides were rinsed with
28 phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min and submitted to nonspecific protein
29 blocking with BSA (Sigma-Aldrich, Brasil) for 30 min in a humid chamber. The
30 primary antibodies, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1α) (Invitrogen, USA, dilution
31 1:50), nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 (Nrf2) (Invitrogen, USA, dilution
32 1:200) and glutathione peroxidase 3 (Gpx3) (Invitrogen, USA, dilution 1:200)

1 were incubated over night at 8°C in a humid chamber. The negative control was
2 incubated with PBS. Then, after washing in PBS, slides were incubated with a
3 fluorescent- secondary antibody (Invitrogen, USA, dilution 1:500) for 1h30, at
4 room temperature. The nuclear staining 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)
5 (Invitrogen, USA) was added for 30 minutes and after washing with PBS, slides
6 were mounted with a mounting media (Invitrogen, USA). To analyze the staining,
7 the photographs were obtained in a confocal microscope (400x magnification)
8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The measurement of mean
9 fluorescence intensity in a region of interest was performed in LAS X Office
10 software (Wetzlar, Germany).

11

12 *2.7. Statistical analysis*

13 The data were submitted to normality (Kolmogorov-Smirnov or Shapiro-
14 Will tests) and homogeneity (Levene test) tests. Parametric data were expressed
15 as mean \pm standard error of the mean and analyzed by one-way analysis of
16 variance (ANOVA) followed by Tukey post-test for multiple comparisons or by t-
17 test for comparison of two groups. For nonparametric analysis, the data were
18 expressed as median and were analyzed using the Kruskal-Wallis test followed
19 by Dunn post-test or by Mann-Whitney test. Results were considered statistically
20 significant with a p-value < 0.05 . Categorical data were analyzed using Chi-
21 square test ($n \geq$ five) or Fisher's exact-test ($n <$ five). The software Statistical
22 Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) and GraphPad
23 9 Prism (California, USA) were used.

24

25 **3. Results**

26 *3.1. Blood plasma analysis*

27 *3.1.1. Categorical data*

28 Data from patients of both groups of cohort one is illustrated in Table 1.
29 The mean age ranged from 42 to 50 years old and patients from benign group
30 were older ($p = 0.022$). No statistical difference was observed for the other
31 variables.

32 **Table 1** – Characteristics of patients with benign tumors and PTC.

Characteristics		Benign	PTC	<i>p</i> value
Sex				
	Male	1 (3.1%)	4 (19.0%)	0.074
	Female	31 (96.6%)	17 (81.0%)	
Age		53.75 (±15.78)	42.29 (±12.92)	0.008
BMI		3.26 (±0.18)	3.28 (±0.16)	0.727
Smoking				
	Yes	6 (20.0%)	3 (15.0%)	0.724
	No	24 (80.0%)	17 (85.0%)	
Diabetes				
	Yes	9 (29.0%)	3 (14.3%)	0.318
	No	22 (71.0%)	18 (85.7%)	
Hypertension				
	Yes	14 (43.8%)	5 (23.8%)	0.139
	No	18 (56.3%)	16 (76.2%)	
Family history of thyroid disease				
	Yes	16 (50.0%)	10 (47.6%)	1.000
	No	16 (50.0%)	11 (52.4%)	
Family history of cancer				
	Yes	19 (59.4%)	11 (52.4%)	0.615
	No	13 (40.6%)	10 (47.6%)	
Thyroid medication				
	Yes	10 (31.3%)	4 (19.0%)	0.362
	No	22 (68.8%)	17 (81.0%)	

1

2 Categorical data were evaluated by Chi-square or Fisher's exact-test for proportion comparison,
3 and continuous data were evaluated by t-Student test. Continuous data are expressed as mean
4 (±standard deviation) and categorical data as number (percentage). Natural logarithmic
5 transformation was used in BMI. *p* value <0.05 are highlighted. PTC: papillary thyroid carcinoma;
6 BMI: body mass index.

7 *Pode ser que teve um viés na idade dos pacientes pq a primeira coorte eram*
8 *mais pacientes dos hospitais privados. Pacientes do particular fazem mais*
9 *exames e acabam descobrindo antes.*

10

11 3.1.2. Oxidative stress

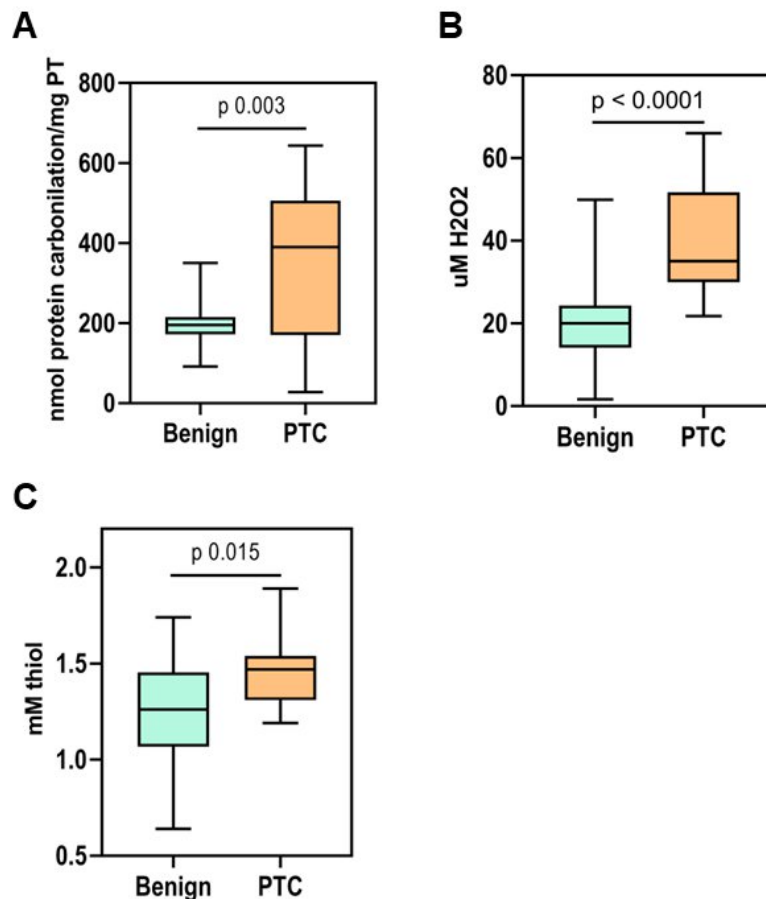
12 Figure 1 shows the antioxidant (thiol levels) and oxidant (H₂O₂ and protein
13 carbonylation) parameters in plasma of patients from both groups. Protein
14 carbonylation (*p* = 0.003), H₂O₂ (*p* < 0.0001) and thiol (0.015) levels were higher
15 in PTC compared with benign group.

16 The levels of protein carbonylation, a marker of oxidative damage to
17 proteins, were significantly higher in PTC patients compared to those with benign
18 tumors (*p* = 0.003) (Figure 1A). Hydrogen peroxide (H₂O₂) levels, a key ROS

1 involved in redox signaling and oxidative damage, were markedly elevated in the
 2 PTC group ($p < 0.0001$) (Figure 5B). Lastly, total thiol content, an antioxidant
 3 marker, was also significantly higher in PTC patients ($p = 0.015$) (Figure 5C).

4

5 **Figure 1** – Oxidative stress in blood plasma of patients with benign neoplasm
 6 and PTC.



7

8 Quantification of systemic oxidative stress markers in plasma samples from patients in the benign
 9 and PTC groups. (A) Protein carbonylation, measured as an indicator of oxidative damage to
 10 proteins. (B) Hydrogen peroxide (H₂O₂) levels, reflecting systemic oxidative stress. (C) Total thiol
 11 content, representing antioxidant capacity. Data are expressed as median with interquartile range
 12 and were analyzed using the Mann-Whitney test. A natural logarithmic transformation was applied
 13 to thiol levels. p value < 0.05 was considered statistically significant. PCT: papillary thyroid
 14 carcinoma; PT: total protein; H₂O₂: hydrogen peroxide.

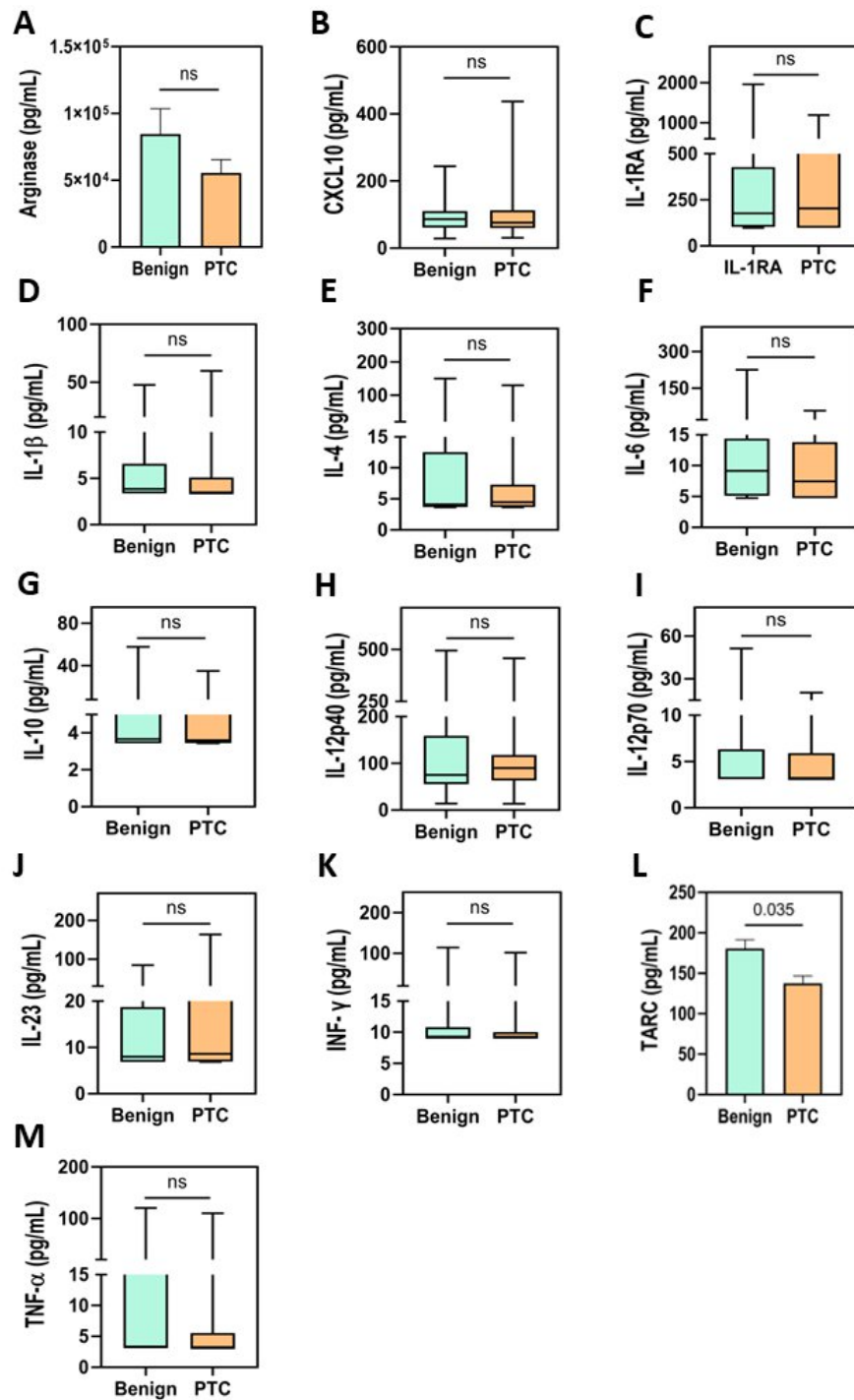
15

16 **3.1.3. Cytokine levels**

1 Cytokine levels in the blood plasma of patients with benign thyroid tumors
2 and PTC were evaluated to explore potential inflammatory markers associated
3 with malignancy (Figure 2). Among the analyzed cytokines and chemokines,
4 TARC (thymus and activation-regulated chemokine) was the only one that
5 showed a statistically significant difference between the groups. Plasma levels of
6 TARC were significantly higher in patients with benign thyroid neoplasms
7 compared to those with PTC ($p = 0.035$).

8

9 **Figure 2** – Quantification of cytokines in blood plasma of patients with benign
10 tumors and PTC.



1

2 Plasma levels of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokynes were assessed in patients
 3 with benign thyroid tumors and PTC. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD) or
 4 as median with interquartile range and were analyzed using the Student's t-test or the Mann-
 5 Whitney test, depending on data distribution. Natural logarithmic transformations were applied
 6 for arginase (A) and TARC (L) data. p value <0.05 was considered statistically significant. PCT:
 7 papillary thyroid carcinoma; ns: non-significant.

8

1 3.2. Tumor analysis

2 3.2.1. Characteristics of patients

3 Table 2 illustrates the characteristics of patients from cohort two. The
 4 mean age ranged from 48 to 53 years old, without difference between groups.
 5 No statistical difference was observed for all variables.

6

7 **Table 2** – Characteristics of patients with benign tumors and PTC.

Characteristics	Bening	PTC	<i>p</i> value
Sex			
Male	2 (10.5%)	2 (11.8%)	1.000
Female	17 (89.5%)	15 (88.2%)	
Age	50.00 (40 – 56)	53.00 (45 – 58)	0.854
BMI	3.84 (±0.20)	3.43 (±0.12)	0.134
Smoking			
Yes	3 (15.8%)	2 (11.8%)	1.000
No	16 (84.2%)	15 (88.2%)	
Diabetes			
Yes	4 (21.1%)	1 (6.3%)	0.347
No	15 (78.9%)	15 (93.8%)	
Hypertension			
Yes	9 (47.4%)	7 (43.8%)	0.830
No	10 (52.6%)	9 (56.3%)	
Family history of thyroid disease			
Yes	11 (57.9%)	8 (50.0%)	0.854
No	8 (42.1%)	8 (50.0%)	
Family history of cancer			
Yes	10 (52.6%)	13 (81.3%)	0.152
No	9 (47.4%)	3 (18.8%)	
Thyroid Medication			
Yes	3 (15.8%)	6 (37.5%)	0.245
No	16 (84.2%)	10 (62.5%)	

8

9 Categorical data were evaluated by Chi-square or Fisher's exact-test for proportion comparison
 10 and are expressed as number (percentage). Parametric continuous data were evaluated by
 11 Student's t-test and are expressed as mean (±standard deviation) and non-parametric by Mann-
 12 Whitney test, expressed as median (interquartile range). *p* value <0.05 are highlighted. Natural
 13 logarithmic transformation was used in BMI data PTC: papillary thyroid carcinoma; BMI: body
 14 mass index.

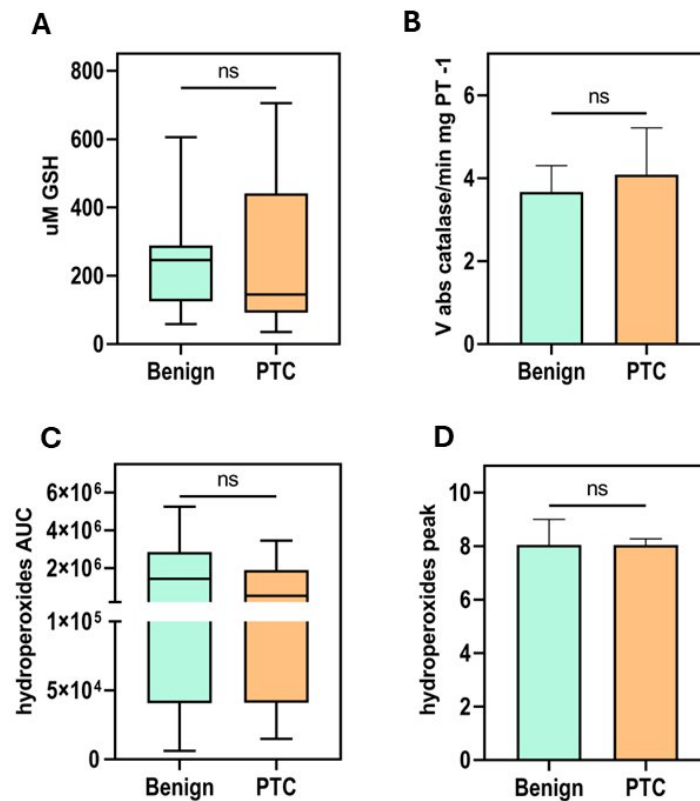
15

1 3.2.2. Oxidative stress

2 The oxidative stress parameters evaluated in tissue are presented in
 3 Figure 3. The analysis of reduced glutathione (GSH) levels (Figure 3A) revealed
 4 no statistically significant differences between the groups. Similarly, catalase
 5 activity (Figure 3B), a key enzyme in hydrogen peroxide detoxification, showed
 6 no significant variation between thyroid, benign, and PTC groups. Regarding
 7 membrane hydroperoxides (Figure 3C), a marker of lipid peroxidation and
 8 oxidative damage, no significant differences were observed between the groups.

9

10 **Figure 3** – Oxidative stress parameters in tumor microenvironment of patients
 11 with benign tumors and PTC compared with normal thyroid.



12

13 Quantification of antioxidants (GSH and catalase) and oxidant (membrane hydroperoxides)
 14 parameters in tissue samples. (A) Reduced glutathione (GSH) levels, expressed as luminescence
 15 intensity (RLU). (B) Catalase activity, assessed by absorbance variation per minute. (C) Area
 16 under the curve representing the total membrane hydroperoxide levels, measured by
 17 chemiluminescence. (D) Emission peak representing the maximum emission, measured by
 18 chemiluminescence. No statistically significant differences were observed between the groups.
 19 Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) and analyzed by Student's t-test test or

1 as median with interquartile range analyzed by the Mann-Whitney test. Natural logarithmic
 2 transformations were applied to catalase (B), and hydroperoxides emission peak (D) data.
 3 Statistical significance was considered at $p < 0.05$. PTC: papillary thyroid carcinoma; GSH:
 4 reduced glutathione; ns: non-significant; AUC: area under the curve; RLU: relative light unit.

5

6 3.2.3. Immunofluorescence

7 A representation of immunofluorescence analysis is illustrated in Figure 5.
 8 The mean fluorescence intensity of GPx3, Nrf2, and HIF-1 α are summarized in
 9 Table 4.

10

11 **Table 4** – Mean fluorescence intensity of GPx3, Nrf2, and HIF-1 α in benign and
 12 PTC tissues.

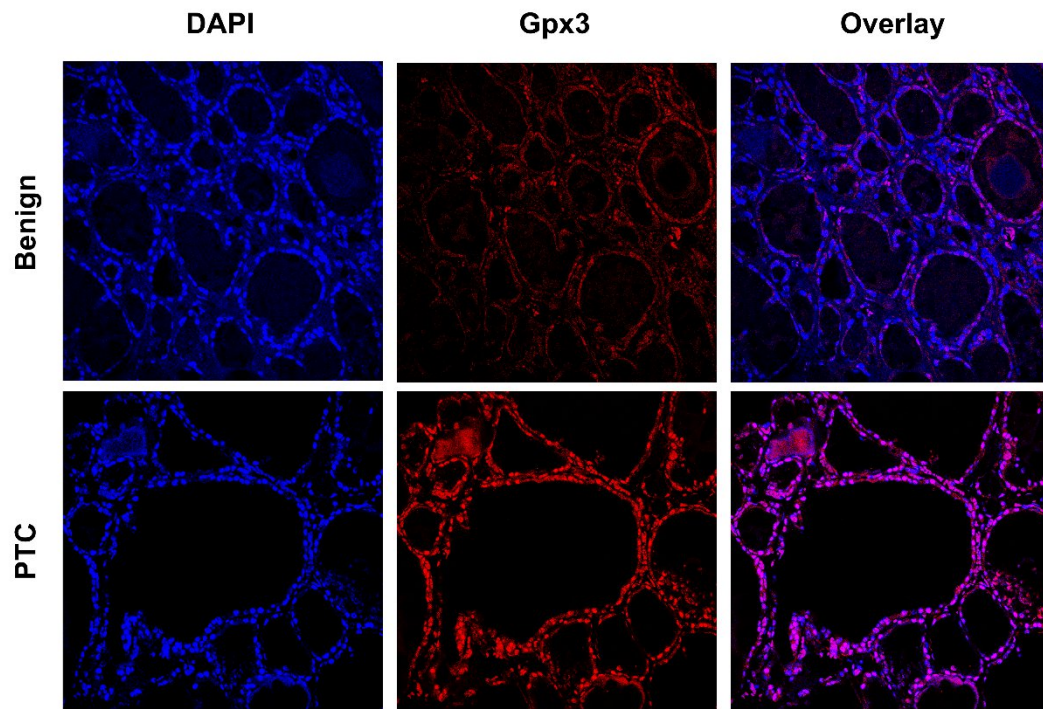
Marker	Group	Fluorescence intensity - mean (\pm SD)	p-value
GPx3	Benign	58.13 (\pm 11.02)	0.042
	PTC	84.07 (\pm 25.57)	
Nrf2	Benign	4.84 (\pm 8.12)	0.008
	PTC	18.52 (\pm 14.91)	
HIF-1 α	Benign	31.63 (\pm 18.12)	0.024
	PTC	53.99 (\pm 22.35)	

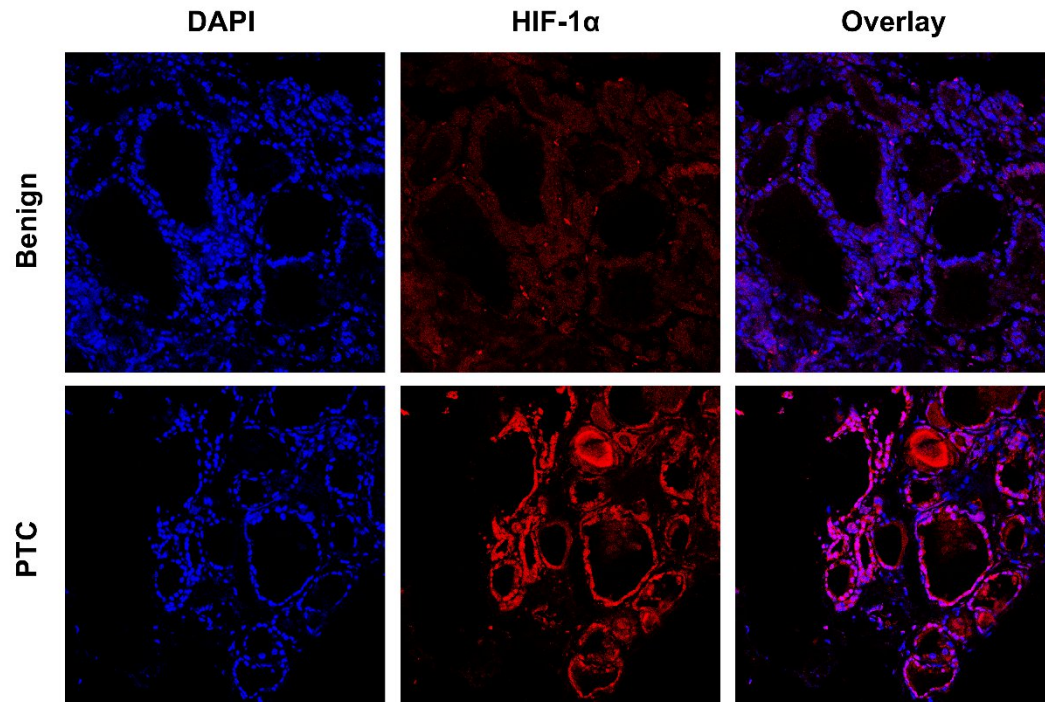
13

14 Immunofluorescence analysis was performed to evaluate the presence of GPx3, Nrf2, and HIF-
 15 1 α markers in benign tumors and PTC. The table shows the mean fluorescence intensity \pm
 16 standard deviation (SD) for each marker, with corresponding p-values indicating statistical
 17 significance between the two groups. GPx3: glutathione peroxidase 3; Nrf2: nuclear factor
 18 erythroid 2-related factor 2; HIF-1 α : hypoxia-inducible factor 1-alpha; PTC: papillary thyroid
 19 carcinoma.

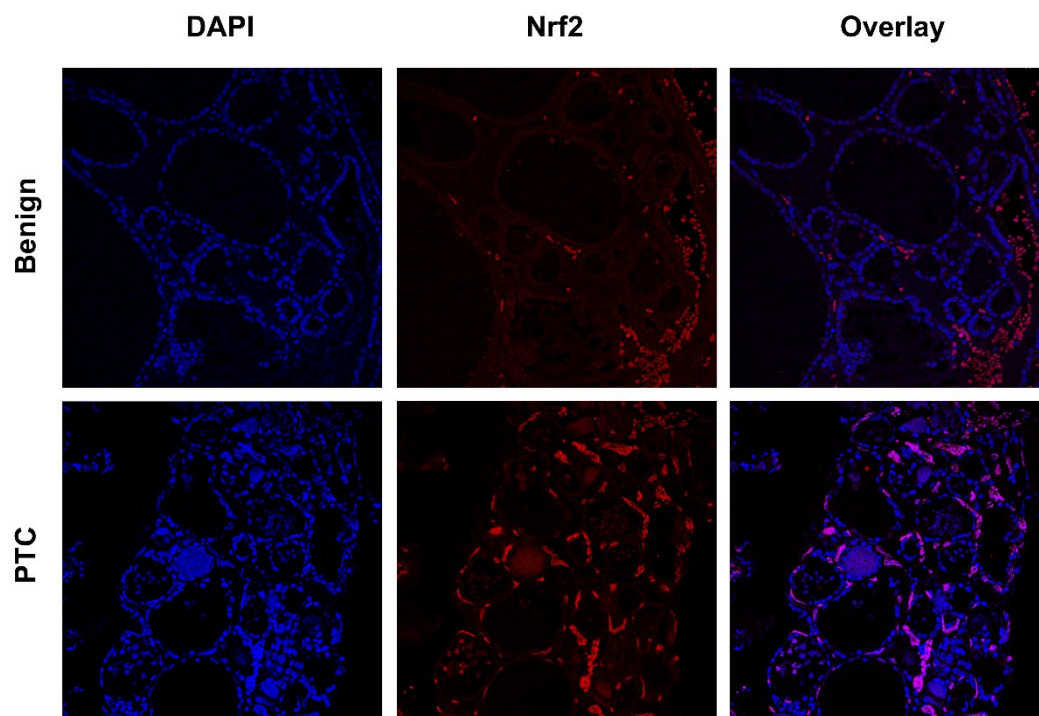
20

21 **Figure 4** – Representation of immunofluorescence analysis of patients with
 22 benign tumors and PTC.





1



2

3 Representative immunofluorescence images showing the staining for glutathione peroxidase 3
 4 (Gpx3), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), and hypoxia-inducible factor 1-alpha
 5 (HIF-1 α) in thyroid tissue sections from benign and PTC groups. The fluorescence intensity was
 6 quantified using image analysis software. Magnification: 400 \times . The channels were separated for
 7 fluorescence channels in 8 bits to change color for easy viewing. The quantitative analysis was
 8 performed with the original image. PTC: papillary thyroid carcinoma.

1 Discussion

2 This article provides a comprehensive analysis of oxidative stress and
3 inflammatory markers in thyroid tissue and blood plasma, offering valuable
4 insights into the distinct oxidative stress profiles (systemic and localized) in PTC
5 and benign tumors. The dual cohort adds depth to the study and may contribute
6 to the development of diagnostic tools and therapeutic strategies.

7 Since clinicopathological characteristics may be an indicator of
8 aggressiveness in thyroid cancer (Xi et al., 2020), categorical data were
9 analyzed. Except for age in cohort one, no other parameters differed significantly
10 between the groups across both cohorts. The patients from the benign group
11 were older than those from PTC group. This can be explained by considering
12 that patients in the PTC group had earlier examinations and had an earlier
13 diagnosis. According to Kobaly et al. (2021), the prevalence of thyroid tumors
14 increases significantly with age, and most are benign. Also, Ospina &
15 Papaleontiou, 2021 highlights that thyroid benign tumors are highly prevalent
16 among older individuals, especially those ≥ 60 years old. Interestingly, although
17 the overall risk of thyroid cancer is lower in older individuals, when it is present,
18 the prognosis is worse (Ospina & Papaleontiou, 2021). In addition, the mean age
19 ranged from 42 to 53 in both cohorts, a result in accordance with Hao et al., 2023.

20 Considering that ROS participates in hormone synthesis, thyroids are
21 more exposed to oxidative stress than other organs (Dogan et al., 2021). In
22 combination with low antioxidant defenses, ROS may amplify chronic
23 inflammation (Kosciuszko et al., 2023; Eskandari et al., 2024; Buczyńska et al.,
24 2023). Simultaneously, chronic inflammation plays a crucial role in modulating
25 the tumor microenvironment by attracting immune cells and producing cytokines
26 that regulate tissue remodeling and immune evasion (Ameziane-El-Hassani, et
27 al., 2019). Thus, oxidative stress and inflammation markers may provide valuable
28 insights into the intricate relationship between these processes in PTC.

29 In cohort one, all oxidative stress parameters were higher in PTC, results
30 in accordance with the literature. Geric et al., 2016, found higher levels of protein
31 carbonylation in plasma of patients with thyroid disease compared to control.
32 Terzioglu et al., 2016 found similar results in the serum of PTC patients compared

1 with control group. Although there are no published results of H₂O₂ levels in
2 plasma of patients with PTC, Muzza et al., 2022 described higher levels of H₂O₂
3 in tumors compared with normal thyroid and Tabur et al. (2015) reported higher
4 serum hydroperoxide levels in PTC compared with control. Faam et al., 2021
5 also found higher serum levels of total antioxidants in malignant group compared
6 with benign. Carbonylated proteins are classic markers of irreversible oxidative
7 damage to proteins, generated mainly by post-translational modifications that
8 lead to loss of function (Akagawa, 2021). H₂O₂, despite being a stable molecule,
9 can cause protein carbonylation by introducing carbonyl groups into amino acid
10 side chains via oxidation (Akagawa, 2021), justifying the higher levels of both
11 markers in this study. No data was found in the literature regarding thiol levels in
12 plasma of patients with PTC. However, according to a database of our research
13 group, the levels of thiols in the blood of health individuals are higher than that of
14 patients with thyroid cancer (data not shown). Furthermore, the high levels of
15 total thiols in the PTC group probably reflect an adaptive response to oxidative
16 stress. Still, the protein carbonylation suggests that this antioxidant response
17 was insufficient to prevent systemic oxidative damage and the existence of a
18 redox imbalance in favor of oxidants.

19 H₂O₂ induces reversible pos-translational modifications in proteins and its
20 high levels are intimately associated with inflammation (Lu et al., 2020). NF-κB,
21 a transcription factor involved in several biological processes, including
22 inflammation (Barnabei et al., 2021), seems to be modulated by H₂O₂ (Sies
23 2016). Although H₂O₂ levels were higher in PTC group and that inflammatory
24 cytokines play a role in tumor progression (Zhang et al., 2020; Kobawala et al.,
25 2016, Lv et al., 2021; Carvalho et al., 2017), their levels in plasma did not differ
26 between groups. This discovery implies that, while inflammation may influence
27 tumor progression, it does not necessarily serve to distinguish between benign
28 and malignant thyroid tumors. Furthermore, the absence of significant differences
29 may also be associated with the fact that H₂O₂ is not so effective in modulating
30 NF-κB pathway (Oliveira-Marques, 2009). Also, as there was no difference in the
31 level of cytokines, H₂O₂ is possibly reacting with transitions metals, generating
32 more harmful reactive species, and not, instead, activating NF-κB. Moreover,
33 although we did not find significant differences in cytokine levels between groups,

1 these levels were higher than those of healthy individuals, according to the
2 literature (Koelman et al., 2019; Kim et al., 2011; Li et al., 2021). These found
3 may be explained since cytokine levels in healthy individuals reflect a
4 homeostasis state, without the constant activation of immune cells and
5 inflammatory state, different from the patients with neoplasms (Koelman et al.,
6 2019).

7 Chemokines are a family of cytokines that play an important role in tumor
8 cell survival and development, progression, angiogenesis, growth, and
9 metastasis (Karin et al., 2018; Rasheed et al., 2018). Despite this, the only
10 chemokine showing significant differences between groups, being higher in
11 benign group, was thymus and activation-regulated chemokine (TARC). TARC,
12 or CCL17, is a chemokine produced by monocytes, macrophages, dendritic cells,
13 eosinophils, and platelets, in response to cytokines, especially IL-4 (Lupancu et
14 al., 2023; Okamoto et al., 2003). It binds to the receptor CCR4, inducing
15 chemotaxis of T lymphocytes, primarily T helper-type 2 (Th2) and Th17 (Lim,
16 Kim, Chung et al., 2015; Rasheed et al., 2018), but also T regulatory cells (Treg)
17 (Biragyn et al., 2013). Since Treg regulates the immune response against the
18 tumor (Ohue & Nishikawa, 2019), in benign tumors, TARC could be associated
19 with a regulatory response, preventing chronic inflammation and malignant
20 transformation. To date, this was the first study to report alteration on plasmatic
21 levels of TARC in benign tumors. However, Gu et al., 2024 described a higher
22 expression of TARC RNAm in thyroid cancer, a result based on bioinformatic
23 analysis. These findings underscore the need for further investigation into the
24 role of TARC in thyroid tumors.

25 In cohort two, the oxidative stress markers in tissues did not show
26 significant differences between groups. Regarding hydroperoxide levels in PTC
27 tissues, no published data was found. For catalase, Rovcanim et al., 2020 and
28 Stanley et al., 2016 also found similar levels in normal thyroid and malignant
29 thyroid tumors. On the other hand, Wang et al., 2016 described lower catalase
30 levels in thyroid tumors compared with control. In tumor microenvironment, other
31 studies presented higher GSH levels in PTC compared with normal tissues
32 (Stanley et al., 2016) and higher staining in immunohistochemistry in the same
33 comparison (Wang et al., 2016).

1 The ability of thyroid to maintain redox homeostasis through compensatory
2 mechanisms, such as antioxidant upregulation, may explain the absence of
3 difference between the groups (Sabatino et al., 2023). Additionally, similar
4 antioxidants levels could be attributed to several factors. First, it is possible that
5 other pathways or compensatory mechanisms are being activated. Also, it has
6 already been described that thyroid have a greater ability to defend against
7 oxidative damage mainly through the action of glutathione peroxidase (GPx) and
8 thioredoxin reductase (Ziros et al., 2018). Thus, it is assumed that antioxidants
9 levels were similar between groups because the thyroid's antioxidant capacity is
10 naturally high in physiological conditions and does not differ significantly in
11 pathological states. Despite the similarity between the groups, oxidative stress
12 could be present in the tumor microenvironment as indicated in the
13 immunofluorescence analysis.

14 In immunofluorescence, the higher staining of Nrf2, HIF-1 α , and GPx3 in
15 PTC tissues indicates a response of tumor cells to oxidative stress and hypoxia.
16 In the presence of ROS, especially H₂O₂, transcription factors such as HIF-1 α
17 are modulated (Sies 2016). Also, the thiol groups of Keap 1 are oxidized,
18 releasing Nrf2 from its complex with this protein (Sabatino et al., 2023). Then, it
19 is translocated to the nucleus, where it binds to antioxidants responsive elements
20 (ARE), a promoter region of some genes (Ziros et al., 2018). ARE triggers the
21 transcription of antioxidant defenses (mainly GPx and thioredoxin in thyroid)
22 protecting cells from oxidative damage (Lu et al., 2020). Since Nrf2 is stimulated
23 by ROS and its fluorescence was more intense in PTC tissues, it can be assumed
24 that an oxidative environment was present in this group.

25 GPx3 is an antioxidant enzyme present mostly within the thyrocytes, being
26 also found linked to thyroglobulin present in the colloid (Schmutzler et al., 2007).
27 Its main function consists in reducing H₂O₂ using GSH as a substrate (Zhang et
28 al., 2023). Its higher presence in PTC may reflect a compensatory mechanism
29 that enables cancer cells to survive under oxidative stress. In the literature,
30 Muzza et al., 2016 evaluated the activity of GPx in thyroid tumors and described
31 a higher activity in PTC compared to normal tissues. On the other hand, Zhang
32 et al., 2023 described lower levels of GPx3 protein in PTC compared with normal
33 tissues. However, in this study, GPx3 results coupled with elevated levels of Nrf2

1 supports the hypothesis that PTC cells activate antioxidant defenses to maintain
2 redox balance, resist apoptosis, and promote tumor progression. Considering
3 that Nrf2 induces the transcription of GPx gene, it makes sense that fluorescence
4 of both proteins was increased in the PTC group.

5 In parallel, HIF-1 α stabilization in response to oxidative stress and hypoxia
6 enhances tumor adaptation by inducing metabolic reprogramming, angiogenesis,
7 and immune evasion (Bae, Hallis, Kwak, 2024; Abdullah et al., 2019). In addition,
8 Nrf2 and HIF-1 α levels seem to be also associated; when both are
9 overexpressed, proliferation, angiogenesis, tumor growth, and invasion are also
10 increased (Bae, Hallis, Kwak, 2024). This association may be explained because
11 HIF-1 α regulates certain promoter regions of ARE (Bae, Hallis, Kwak, 2024).
12 Therefore, considering these results, it can be assumed that the oxidative stress
13 was higher in the PTC group.

14 Concisely, oxidative stress appears to act as a key driver of tumorigenesis
15 inducing genomic instability and irreversible cellular damage (Kosciuszko et al.,
16 2023; Ameziane-El-Hassani, et al., 2019). Possibly, inflammation, despite
17 modulating tumor progression, does not necessarily initiate malignancy, playing
18 a secondary role in modulating tumor behavior. The accumulation of oxidative
19 damage in benign tumors over time may drive the transition to malignancy
20 through DNA mutations, lipid and protein peroxidation (Ifeanyi, 2018; Barrera et
21 al., 2018; Pizzimenti et al., 2021). At the same time, ROS production triggers
22 inflammation that exacerbates oxidative stress through the continuous production
23 of ROS by immune cells, enhancing oxidative damage and contributing to
24 genomic instability (Xi et al., 2020; Stanley et al., 2016). Thus, monitoring
25 systemic oxidative stress could help to early identify patients at higher risk of
26 malignant transformation. Additionally, a broader evaluation of other potential
27 oxidative molecules and pathways could provide a more complete picture of the
28 tumor microenvironment.

29 Lastly, this study described for the first time higher TARC levels in plasma
30 of patients with benign tumors, challenging the previous report of TARC as a
31 chemokine predominantly associated with malignancy, and suggesting its
32 possible role in regulating immune responses. Furthermore, this study was

1 pioneering in showing the presence of oxidative stress and hypoxia proteins by
2 immunofluorescence (GPx3, Nrf2, and HIF-1 α), showing their potential as
3 biomarkers for the diagnosis and prognosis, in addition to quantifying
4 hydroperoxides in the tumor microenvironment. These findings contribute
5 substantially to the literature, offering insights for future studies aimed at
6 improving patient outcomes in PTC.

7

8 **Conclusion**

9 In conclusion, this study contributes to the understanding of the complex
10 interplay between oxidative stress and inflammation in thyroid tumors,
11 emphasizing the differences between tissue environments and systemic
12 biomarkers. The increased levels of TARC in benign group suggests immune
13 response different from the malignant environment. Additionally, the higher
14 presence of GPx3, Nrf2, and HIF-1 α proteins in PTC tissues supports the role of
15 oxidative stress and hypoxia in thyroid tumorigenesis. Together, these insights
16 highlight the potential of oxidative stress and inflammatory markers in improving
17 the diagnosis, prognosis, and therapeutic approaches for thyroid cancer.
18 Nonetheless, future studies with larger samples are necessary to confirm these
19 findings and fully elucidate the molecular mechanisms underlying the progression
20 of thyroid tumors.

21

22 **Acknowledgment**

23 We would like to express our sincere gratitude to technician Jesus Antônio
24 Vargas, whose expertise and support were essential to conduct the experiments.
25 Also, we would like to thank Amanda Dionisio for her valuable assistance in
26 obtaining the immunofluorescence images and the Laboratory of Material and
27 Molecular Analysis for providing access to the confocal fluorescence microscope,
28 which was essential for this study.

29

30 **References**

- 1 ABDULLAH, M. I. et al. **Papillary thyroid cancer: Genetic alterations and**
2 **molecular biomarker investigations.** International Journal of Medical
3 Sciences, v. 16, 2019.
- 4 AEBI, H. **Catalase in vitro.** Methods in Enzymology. Elsevier, v. 105, p.
5 121–126, 1984.
- 6 AKAGAWA, M. **Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological**
7 **implications, and analytical approaches.** Free Radical Research, v. 55, n. 4,
8 p. 1–37, 12 nov. 2020.
- 9 AMEZIANE EL HASSANI, R. et al. **Oxidative stress in thyroid carcinomas:**
10 **Biological and clinical significance.** Endocrine-Related Cancer, v. 26, n.3, p.
11 R131-R143, 2019.
- 12 BAE, T.; HALLIS, S. P.; KWAK, M. K. **Hypoxia, oxidative stress, and the**
13 **interplay of HIFs and NRF2 signaling in cancer.** Experimental and Molecular
14 Medicine, 2024.
- 15 BARNABEI, L. et al. **NF- κ B: At the Borders of Autoimmunity and**
16 **Inflammation.** Frontiers in Immunology, v. 12, 9 ago. 2021.
- 17 BARRERA, G. et al. **Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-**
18 **hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders.**
19 Antioxidants, v. 7, n. 8, p. 102, 2018.
- 20 BEKESCHUS, S. et al. **Physical plasma and leukocytes – immune or**
21 **reactive?** Biological chemistry, v. 400, n. 1, p. 63–75, 2018.
- 22 BERTOL, B. C. et al. **Plasma levels of soluble HLA-G and cytokines in**
23 **papillary thyroid carcinoma before and after thyroidectomy.** International
24 Journal of Clinical Practice, v. 74, n. 10, 2020.
- 25 BIRAGYN, A. et al. **Inhibition of Lung Metastasis by Chemokine CCL17-**
26 **mediated In Vivo Silencing of Genes in CCR4+ Tregs.** Journal of
27 Immunotherapy, v. 36, n. 4, p. 258–267, maio 2013.
- 28 BUCZYŃSKA, A. et al. **Clinical significance of oxidative stress markers as**
29 **angioinvasion and metastasis indicators in papillary thyroid cancer.**
30 Scientific Reports, v. 13, n. 1, 2023.
- 31 CARVALHO, D. F. G. et al. **High IL-17 expression is associated with an**
32 **unfavorable prognosis in thyroid cancer.** Oncology Letters, v. 13, n. 3, p.
33 1925–1931, 2017.
- 34 CAI, Y. et al. **Association between blood inflammatory indicators and**
35 **prognosis of papillary thyroid carcinoma: a narrative review.** Gland
36 Surgery, v.13, n.6, p.1088-1096, 2024.
- 37 CARVALHO, D. P.; DUPUY, C. **Thyroid hormone biosynthesis and release.**
38 Molecular and Cellular Endocrinology, v. 458, p. 6–15, 2017.

- 1 CAVALCANTI, L. F. et al. **Decreased plasma H₂O₂ levels are associated**
2 **with the pathogenesis leading to COVID-19 worsening and mortality.** Free
3 radical research, v. 56, n. 11–12, p. 740–748, 2022.
- 4 DANILOVIC, D. L. S. et al. **Oncogenic mutations in KEAP1 disturbing**
5 **inhibitory Nrf2-Keap1 interaction: Activation of antioxidative pathway in**
6 **papillary thyroid carcinoma.** Head and Neck, v. 40, n. 6, p. 1271–1278, 2018.
- 7 DIEPSTRA, A. et al. **Elevated serum TARC levels precede classic Hodgkin**
8 **lymphoma diagnosis by several years.** Blood, v. 42, n. 22, p. 928–1931,
9 2023.
- 10 ESKANDARI, F. et al. **From balance to imbalance: disruption of plasma**
11 **glutathione concentration in micropapillary thyroid carcinoma.** Thyroid
12 Research, v. 17, n. 1, 2024.
- 13 FAAM, B. et al. **Comparing oxidative stress status among iranian males**
14 **and females with malignant and non-malignant thyroid nodules.**
15 International Journal of Endocrinology and Metabolism, v. 19, n. 1, 2021.
- 16 FEBRERO, B. et al. **Tumor microenvironment in thyroid cancer: Immune**
17 **cells, patterns, and novel treatments.** Head and Neck, v.46, n.6, p.1486-
18 14991, 2024.
- 19 FERRARI, S. M. et al. **Immune and inflammatory cells in thyroid cancer**
20 **microenvironment.** International Journal of Molecular Sciences, v.20, n.18,
21 p.4413, 2019.
- 22 FLECHA, B. G.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. **Hydroperoxide-initiated**
23 **chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart,**
24 **liver, and muscle.** Free Radical Biology & Medicine, v.10, n.2, p.93-100, 1991.
- 25 GERIĆ, M. et al. **Cytogenetic status and oxidative stress parameters in**
26 **patients with thyroid diseases.** Mutation research. Genetic toxicology and
27 environmental mutagenesis, v. 810, p. 22–29, 2016.
- 28 GLOBAL CANCER OBSERVATORY. **Thyroid cancer mortality.** Lyon:
29 International Agency for Research on Cancer, 2020. Disponível em:
30 <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 13 dez. 2024.
- 31 GU, X. et al. The expression of CCL17 and potential prognostic value on tumor
32 immunity in thyroid carcinoma based on bioinformatics analysis. **Scientific**
33 **Reports**, v. 14, n. 1, 2024.
- 34 HAO, Z. et al. **Expression of HIF-1 α /PKM2 axis correlates to biological and**
35 **clinical significance in papillary thyroid carcinoma.** Medicine, v. 102, n. 10,
36 p. E33232, 2023.
- 37 HU, M.-L. **Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma.**
38 Methods in Enzymology. Elsevier, v. 233, p. 380–385, 1994.
- 39 IFEANYI, O. E. **A Review on Free Radicals and Antioxidants.** International
40 Journal of Current Research in Medical Sciences, v.4, n.2, p.123-133, 2018.

- 1 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Cânceres de cabeça e**
2 **pescoço**. Rio de Janeiro: INCA, 2023. Disponível em:
3 <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cabeca-e-pescoco>. Acesso em: 13 dez.
4 2024.
- 5 KAMMOUN-KRICHEN, M. et al. **IL- β a potential factor for discriminating**
6 **between thyroid carcinoma and atrophic thyroiditis**. European Cytokine
7 Network, v. 23, n. 3, p. 101–106, 2012.
- 8 KARIN, N.; RAZON, H. **Chemokines beyond chemo-attraction: CXCL10 and**
9 **its significant role in cancer and autoimmunity**. Cytokine, v. 109, p. 24–28,
10 2018.
- 11 KOBALY, K.; KIM, C. S.; MANDEL, S. J. **Contemporary Management of**
12 **Thyroid Nodules**. Annual Review of Medicine, v. 73, n. 1, p. 517–528, 27 jan.
13 2022.
- 14 KOBAWALA, T. P. et al. **Significance of TNF- α and the Adhesion Molecules:**
15 **L-Selectin and VCAM-1 in Papillary Thyroid Carcinoma**. Journal of Thyroid
16 Research, v. 2016, p. 8143695, 2016.
- 17 KOCHMAN, J. et al. **The influence of oxidative stress on thyroid diseases**.
18 Antioxidants, v. 10, n. 9, 2021.
- 19 KOELMAN, L. et al. **Cytokines for evaluation of chronic inflammatory**
20 **status in ageing research: reliability and phenotypic**
21 **characterisation**. Immunity & ageing: I & A, v. 16, n. 1, 2019.
- 22 KIM, H. et al. **Serum cytokine profiles in healthy young and elderly**
23 **population assessed using multiplexed bead-based**
24 **immunoassays**. Journal of Translational Medicine, v. 9, n. 1, p. 113, 2011.
- 25 KIM, W. B. **A closer look at papillary thyroid carcinoma**. Endocrinology and
26 Metabolism, v. 30, n. 1, p. 1–6, 2015.
- 27 KOŚCIUSZKO, M. et al. **Could Oxidative Stress Play a Role in the**
28 **Development and Clinical Management of Differentiated Thyroid Cancer?**
29 **Cancers**, v.15, n.12, p.3182, 2023.
- 30 LEVINE, R. L. et al. **Determination of Carbonyl Content in Oxidatively**
31 **Modified Proteins**. Methods Enzymol, v.186, p.464-78, 1990.
- 32 LI, Y. et al. **Normative dataset for plasma cytokines in healthy human**
33 **adults**. Data in brief, v. 35, n. 106857, p. 106857, 2021b.
- 34 LIM, J. B.; KIM, D. K.; CHUNG, H. W. **Clinical significance of serum thymus**
35 **and activation-regulated chemokine in gastric cancer: Potential as a**
36 **serum biomarker**. Cancer Science, v. 105, n. 10, p. 1327–1333, 2015.
- 37 LIU, Y. M. et al. **Expression of HIF-1 α and HIF-2 α correlates to biological**
38 **and clinical significance in papillary thyroid carcinoma**. World Journal of
39 Surgical Oncology, v. 14, n. 1, 2016.

- 1 LOWRY, O. et al. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** The
2 journal of biological chemistry, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.
- 3 LU, M. et al. **A hydrogen peroxide responsive prodrug of Keap1-Nrf2**
4 **inhibitor for improving oral absorption and selective activation in**
5 **inflammatory conditions.** Redox Biology, v. 34, p. 101565, 1 jul. 2020.
- 6 LV, N. et al. **The expression of transcription factors is different in papillary**
7 **thyroid cancer cells during TNF - α induced EMT.** Journal of Cancer, v. 12,
8 n. 9, p. 2777–2786, 2021.
- 9 MCGARRY, T. et al. **Hypoxia, oxidative stress and inflammation.** Free
10 Radical Biology and Medicine, v.125, p.15-24, 2018.
- 11 MUZZA, M. et al. **Oxidative stress and the subcellular localization of the**
12 **telomerase reverse transcriptase (TERT) in papillary thyroid**
13 **cancer.** Molecular and Cellular Endocrinology, v. 431, p. 54–61, ago. 2016.
- 14 MUZZA, M. et al. **Oxidative Stress Correlates with More Aggressive**
15 **Features in Thyroid Cancer.** Cancers, v. 14, n. 23, 2022.
- 16 OHUE, Y.; NISHIKAWA, H. **Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg**
17 **cells be a new therapeutic target?** Cancer Science, v. 110, n. 7, p.
18 2080–2089, 18 jun. 2019.
- 19 OSPINA, N. S.; PAPALEONTIOU, M. **Thyroid Nodule Evaluation and**
20 **Management in Older Adults: A Review of Practical Considerations for**
21 **Clinical Endocrinologists.** Endocrine Practice, v. 27, n. 3, p. 261–268, mar.
22 2021.
- 23 PIZZIMENTI, S. et al. **Oxidative stress-related mechanisms in melanoma**
24 **and in the acquired resistance to targeted therapies.** Antioxidants (Basel,
25 Switzerland), v. 10, n. 12, p. 1942, 2021.
- 26 PROVATOPOULOU, X. et al. **Interleukins as markers of inflammation in**
27 **malignant and benign thyroid disease.** Inflammation Research, v. 63, n. 8, p.
28 667–674, 2014.
- 29 QIN, X. J. et al. **CXCL10 is a potential biomarker and associated with**
30 **immune infiltration in human papillary thyroid cancer.** Bioscience Reports,
31 v. 41, n. 1, 2021.
- 32 RASHEED, K. et al. **CCL17/TARC and CCR4 expression in Merkel cell**
33 **carcinoma.** Oncotarget, v.9, n.59, p.31432-31447, 2018.
- 34 RENAUD, C. O. et al. **Keap1/Nrf2 Signaling: A New Player in Thyroid**
35 **Pathophysiology and Thyroid Cancer.** Frontiers in Endocrinology, v. 10,
36 2019.
- 37 SABATINO, L. **Nrf2-Mediated Antioxidant Defense and Thyroid Hormone**
38 **Signaling: A Focus on Cardioprotective Effects.** Antioxidants, v.12, n.6,
39 p.1177, 2023.

- 1 SCHMUTZLER, C. et al. **Selenoproteins of the thyroid gland: expression,**
2 **localization and possible function of glutathione peroxidase 3.** Biological
3 Chemistry, v. 388, n. 10, 1 jan. 2007.
- 4 SIES, H. **Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in**
5 **physiological oxidative stress: Oxidative eustress.** Redox Biology, v. 11, p.
6 613–619, abr. 2017.
- 7 STANLEY, J. A. et al. **Lipid peroxidation and antioxidants status in human**
8 **malignant and non-malignant thyroid tumours.** Human and Experimental
9 Toxicology, v. 35, n. 6, p. 585–597, 2016.
- 10 TABUR, S. et al. **Investigation of the role of 8-OHdG and oxidative stress in**
11 **papillary thyroid carcinoma.** Tumor Biology, v. 36, n. 4, p. 2667–2674, 2015.
- 12 TERZIOGLU, D. **Relationship of hemoxygenase-1 and prolidase enzyme**
13 **activity with oxidative stress in papillary thyroid cancer.** Hippokratia, v. 20,
14 n. 1, p. 55–59, 2016.
- 15 TIRPE, A. A. et al. **Hypoxia: Overview on hypoxia-mediated mechanisms**
16 **with a focus on the role of hif genes.** International Journal of Molecular
17 Sciences, v. 20, n. 24, p. 6140, 2019.
- 18 WANG, Z. et al. **Nrf2 as a novel diagnostic biomarker for papillary thyroid**
19 **carcinoma.** European Journal of Histochemistry, v. 67, n. 2, p. 3622, 2023.
- 20 WALIGÓRSKA-STACHURA, J. et al. **Survivin DEx3 as a biomarker of**
21 **thyroid cancers: A study at the mRNA and protein level.** Oncology Letters,
22 v. 13, n. 4, p. 2437–2441, 2017.
- 23 XI, C. et al. **Interleukins in Thyroid Cancer: From Basic Researches to**
24 **Applications in Clinical Practice.** Frontiers in Immunology, v.11, p.1124,
25 2020.
- 26 YANG, D. et al. **Correlations of PCNA expression with thyroid cancer**
27 **ultrasound and histopathologic features.** Int J Clin Exp Pathol, v. 12, n. 4, p.
28 1378–1384, 2019.
- 29 YAPA, S. et al. **The Role of Chemokines in Thyroid Carcinoma.** Thyroid, v.
30 27, n. 11, p. 1347–1359, 2017.
- 31 ZHANG, D. et al. **MiR-146b-5p regulates the scavenging effect of GPx-3 on**
32 **peroxide in papillary thyroid cancer cells.** Heliyon, v. 9, n. 8, p. e18489, ago.
33 2023.
- 34 ZHANG, L. et al. **HIF-1 α and Caspase-3 expression in aggressive papillary**
35 **thyroid carcinoma.** World Journal of Surgical Oncology, v. 20, n. 1, 2022.
- 36 ZHANG, N. et al. **Expressions of IL-17 and TNF- α in patients with**
37 **Hashimoto's disease combined with thyroid cancer before and after**
38 **surgery and their relationship with prognosis.** Clinical and Translational
39 Oncology, v. 22, n. 8, p. 1280–1287, 2020.

- 1 ZHANG, R.; ZHAO, J.; ZHAO, L. **EPAS1/HIF-2 α Acts as an Unanticipated**
2 **Tumor-Suppressive Role in Papillary Thyroid Carcinoma.** International
3 Journal of General Medicine, v. 16, p. 2165–2174, 2023.
- 4 ZIROS, P. G. et al. **NFE2-Related Transcription Factor 2 Coordinates**
5 **Antioxidant Defense with Thyroglobulin Production and Iodination in the**
6 **Thyroid Gland.** Thyroid, v. 28, n. 6, p. 780–798, jun. 2018.
- 7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

1 **ANEXO B – Aggressive infiltrative follicular variant of papillary thyroid**
2 **carcinoma**

3 “Liana Freitas Cavalcanti¹, João Pedro Kurtz Gritti², Gustavo Conrado
4 Brassoroto², Alessandra Lourenço Cecchini¹, Rubens Cecchini^{1*}, André
5 Armani^{2*}.”

6 *Both authors contributed equally to the article.

7 ¹State University of Londrina, Department of General Pathology, Laboratory of
8 Molecular Pathology. Londrina, Paraná, Brazil.

9 ²University Hospital of Londrina, Health Sciences Center, Londrina, Paraná,
10 Brazil.

11

12 Corresponding author:

13 Alessandra Lourenço Cecchini

14 Av. Gil de Abreu e Souza, 2335

15 Londrina – Paraná/PR, Brazil, zip code: 86058-100

16 Email: alcecchini@uel.br

17 Telephone: +55 43999121992

18

19 **Abstract**

20 Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common neoplasia of the thyroid
21 gland and has several variants, being the infiltrative follicular variant rare and
22 with variable prognosis. In this study, we reported the case of a 71-year-old male
23 patient with hypertension and hypothyroidism, who initially presented complaints
24 of pharyngeal discomfort after ingestion of fishbone. In two weeks, the patient
25 develops respiratory failure and cardiac arrest, both reversed. In complementary
26 examinations, a cervical neoplastic mass was detected with suspicion of
27 anaplastic carcinoma. The biopsy revealed an infiltrative follicular variant of PTC,
28 which was staged as cT4bcN1b. Due to the extent and invasion of the

1 neoplasm, only radiotherapy was chosen. After treatment, primary tumor
2 reduction and lymph node stability were observed, with no evidence of disease
3 progression.

4 Keywords: Cardiorespiratory arrest, hypothyroidism, larynx invasion, respiratory
5 failure.

6

7 **Introduction**

8 Thyroid cancer, the most common malignant neoplasm of the endocrine
9 system, occupies the seventh position among the most incident cancers [1],
10 being the fifth most common malignant neoplasm in women in Brazil [2]. In 2022,
11 821,000 cases and 47,507 deaths were recorded worldwide [3]. The World Health
12 Organization (WHO) classifies thyroid neoplasms into three groups according to
13 cell origin, biological behavior and pathological and molecular characteristics:
14 benign lesions, low-risk neoplasms, and malignant neoplasms [4]. Among the
15 malignant neoplasms, papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common,
16 corresponding to 87% of cases [5]. This neoplasm presents different subtypes,
17 among them the follicular subtype, the second most common [6]. This follicular
18 subtype still has two variants: encapsulated and infiltrative [7]. The infiltrative
19 variant does not have the typical papillary architecture of PTC and often invades
20 nerves and lymphatic vessels, being associated with a higher risk of metastasis
21 and worse prognosis [8].

22 Although survival rates are above 90% [9], the prognosis is worse when
23 present in men, in patients with advanced age or when the tumor mass is very
24 large [10]. Treatment consists of total thyroidectomy, with lymphadenectomy in
25 cases of metastasis or possible metastases [11]. In addition, radioiodine therapy
26 is recommended to promote ablation of possible remaining neoplastic cells after
27 surgery [10]. The present study aimed to present an atypical case of infiltrative
28 follicular variant PTC, contributing with new information about the disease.

29

30 **Case description**

1 The case report was approved by the research ethics committee of the
2 State University of Londrina (CAAE: 86096625.0.0000.5231) and the patient
3 signed the informed consent form.

4 Patient 71 years old, male, hypertensive, with hypothyroidism, without
5 other comorbidities, entered the emergency room of the University Hospital (HU)
6 of Londrina with complaints of cervical pain and odynophagia after ingestion of
7 a fish spine. The patient was in good general condition, showing no abnormalities
8 in the upper digestive endoscopy, and was discharged without any treatment.

9 Two weeks after initial care, he was treated in another hospital with a
10 severe and sudden dry cough. On the previous day, reported throat stridor and
11 dyspnea. The cough rapidly evolved into respiratory failure and required
12 orotracheal intubation and mechanical ventilation. Soon after, it evolves to
13 cardiorespiratory arrest reversed after five cycles of measures for
14 cardiopulmonary resuscitation.

15 Subsequently, he was transferred to HU, in mechanical ventilation and
16 need for vasoactive drugs. Clinical treatment for probable pulmonary sepsis was
17 instituted and after one week, a tracheostomy was performed and a pulmonary
18 thromboembolism was diagnosed. The patient evolved with bulging, hyperemia,
19 and pain in the left lateral neck.

20 On the tenth day of hospitalization, an exploratory cervicotomy was
21 performed to drain the infection of the neck in the visceral space, being found, in
22 addition to pus, a necrotic tumor of the left thyroid lobe with invasion of adjacent
23 structures (musculature, thyroid cartilage, esophagus and trachea) suggesting
24 anaplastic carcinoma of the thyroid. During the surgery, the cervical collection
25 was drained, and an incisional biopsy of the left thyroid lobe was performed.

26 The histological examination of the surgical specimen showed a PTC of
27 infiltrative follicular variant, in addition to evidencing areas of necrosis and
28 fibrosis. Samples of the piriformis sinus and trachea were also analyzed, and
29 despite the discreet chronic inflammatory infiltrate observed, the malignancy in
30 these regions was discarded. The neoplasia was staged as cT4bcN1b.

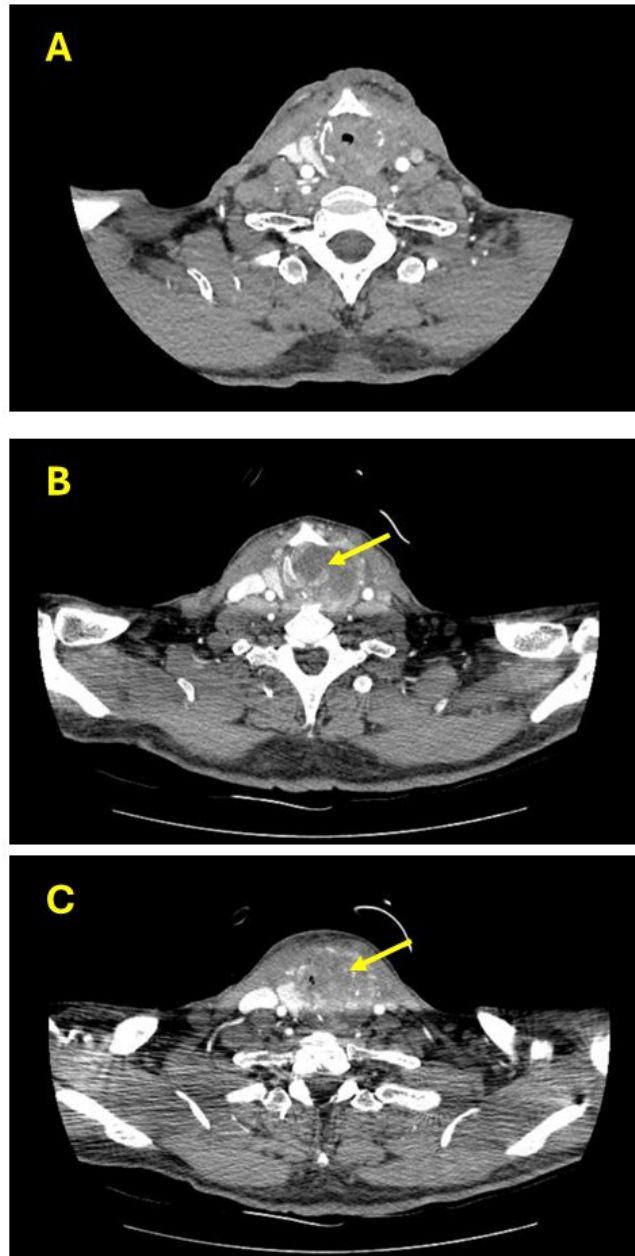
1 Ten days after cervicotomy, magnetic resonance imaging was performed,
2 where a tumor mass was observed in the left thyroid lobe, measuring 5.0 x 4.1 x
3 3.9 cm, and an estimated volume of 41.86 cm³. In addition, it showed signs of
4 invasion to the larynx and thyroid, cricoid cartilage, and the prevertebral fascia.
5 The involvement of the left internal jugular vein and lymph node involvement was
6 also observed.

7 After a few days, a neck tomography [Figure 1] and two
8 nasofibrolaryngoscopies were performed. The tomography ruled out the
9 presence of neoplasia in the light of the larynx and esophagus, although it
10 showed a thickening of the mucous and submucosa layers. Also, a suspicion of
11 lymph node spread and necrosis was evidenced, in addition to the involvement
12 of the left internal jugular vein due to the presence of the tumor mass. The
13 nasofibrolaryngoscopies showed supra-glottic edema, reduction of the antero-
14 posterior diameter, salivary stasis in the valvular and left piriformis sinus, and
15 bilateral vocal fold immobility.

16 A month later, a laryngoscopy was performed, and a new tissue sample
17 was obtained for histopathological analysis. The first diagnosis was then
18 confirmed as an infiltrative follicular variant of PTC.

19

20 **Figure 1** – Axial contrast enhanced tomography imaging showing the lesion in
21 the left thyroid lobe.



1

2 The yellow arrow points to the location of the tumor, measuring 5.0 x 4.1 x 3.9 cm, and estimated
 3 volume of 41.86 cm³. Expansive lesion in the left thyroid lobe, with signs of invasion of adjacent
 4 moles in the visceral space, including larynx on the left, with signs of obliteration of airspace. The
 5 images show signs of invasion of thyroid and cricoid cartilage and probable necrotic areas. A
 6 heterogeneity of the anterior adipose and cervical muscular planes was also evidenced, in
 7 addition to the liphonodomegalia in the left IIb level, and possibly a calcified lesion measuring 2.5
 8 cm.

9 Due to the impossibility of surgery, external beam radiotherapy in thyroid
 10 bed and neck lymph nodes was carried out six months after the first visit. The
 11 follow-up showed a decrease in primary tumor and stability of neck lymph nodes.

1 Clinically, the patient presented improvement of symptoms, being able to occlude
2 the tracheostomy; however, it maintained the need for the cannula. The patient
3 can feed orally, not being necessary supplementation and does not report pain.
4 He was in outpatient follow-up for nine months without evidence of disease
5 progression.

6

7 **Discussion**

8 PTC is the most common thyroid neoplasm [5]. According to the WHO,
9 this carcinoma has different subtypes [4]. In the present case, histopathological
10 examination revealed an infiltrative follicular variant of PTC, where it is common
11 the infiltration of neoplastic cells into the thyroid parenchyma and nearby
12 structures such as lymphatic vessels and nerves [12]. In addition, the prognosis
13 of the follicular subtype is worse when compared to other subtypes due to the
14 greater chance of near and distant metastases [8]. In the present case, invasion
15 of adjacent tissues was present, however, distant metastases were not observed.
16 Also, lymph node metastases, destruction of the thyroid and cricoid cartilage and
17 involvement of the left internal jugular vein were evidenced.

18 The clinical presentation of this patient was atypical, with an initial
19 framework of pharyngeal discomfort followed by intense cough and respiratory
20 failure, culminating in a cardiac arrest. According to the literature, PTC usually
21 manifests itself asymptotically or as a palpable and painful mass in the neck,
22 with or without involvement of the cervical lymph nodes; dysphagia and
23 dysphonia may occur in some cases [13,14].

24 In this type of neoplasm, invasion to the trachea is rare and is associated
25 with worse prognosis [15]. To date, the only reports of respiratory failure followed
26 by mechanical ventilation in PTC have been in pediatric patients. Al-Tonbary, et
27 al., 2009 reported the case of a pediatric patient, where the tumor invaded into
28 the airways causing airway obstruction, respiratory failure, and metastases in the
29 lungs [16]. In addition, Platzer et al., 2006 and Dujovne et al., 2021 presented
30 pediatric cases similar to those mentioned above [17,18]. However, it is important
31 to note that, in this case, the patient was an adult, and the invasion and distant
32 metastasis were absent. Therefore, considering the rapid progression to

1 respiratory failure and pulmonary thromboembolism, it is suggested the tumor
2 mass was compressing the airway and adjacent vascular structures.

3 In the present study, the patient presented thromboembolism even before
4 surgeries. This should be pointed out since the surgical intervention is configured
5 as a risk for pulmonary thromboembolism, as already reported in the literature
6 [19], which was not the case. To date, the relationship between thromboembolism
7 and PTC was not described in the literature. Ordookhani, Motazed, Burman,
8 2018 evidenced a great divergence of information, being inconclusive this
9 affirmation [20]. Therefore, the relationship between hypothyroidism (a disease
10 that the patient had previously) and variations in hemostasis is still uncertain,
11 transiting between states of hyper and hypocoagulability [21].

12 Another relevant aspect in this case was the signs of infection in the neck
13 and the development of local hyperemia, which were initially not attributed to
14 PTC. However, the cervicotomy revealed a necrotic tumor with adhesion in
15 muscles, cartilage, and trachea, suggesting a potential mass effect with
16 inflammation secondary to the invasive process. This initial manifestation
17 highlights the more aggressive behavior of the follicular infiltrative variant that
18 can mask the usual clinical presentation of PTC.

19 In general, the first choice of treatment for thyroid cancer is total
20 thyroidectomy [10]. In this case, only external beam radiotherapy was performed.
21 Considering that the patient responded well to treatment, did not report pain, and
22 fed well, the clinical outcome of this case was favorable considering the
23 aggressiveness of the infiltrative follicular variant and the challenges encountered
24 during the case.

25

26 **Conclusion**

27 This case report illustrates the complexity of the infiltrative follicular variant
28 of PTC. The initial atypical presentation, with intense respiratory symptoms and
29 signs of cervical invasion, demonstrated the infiltrative nature of this subtype,
30 which differs significantly from the behavior of the most common PTC. Therefore,

1 the events reported here will contribute to the literature for a greater
2 understanding of this subtype.

3

4 **References**

5 [1] Bogović Crnčić T, Ilić Tomaš M, Girotto N, Grbac Ivanković S. Risk factors for
6 thyroid cancer: What do we know so far? *Acta Clin Croat.* 2020; 59(Suppl 1):
7 66–72.

8 [2] **INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA)**. Cânceres de cabeça e
9 pescoço. Rio de Janeiro: INCA; 2023 [cited 2024 Dec 13]. Available from:
10 <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cabeca-e-pescoco>

11 [3] **GLOBAL CANCER OBSERVATORY**. Thyroid cancer mortality. Lyon:
12 International Agency for Research on Cancer; 2020 [cited 2024 Dec 13].
13 Available from: <https://gco.iarc.fr/>

14 [4] **WORLD HEALTH ORGANIZATION**. Cancer. Geneva: WHO; [cited 2024
15 Dec 13]. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer)
16 [sheets/detail/cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer)

17 [5] Chen W, Wei T, Li Z, Jiang D, Liu Y, Zheng X, et al. Association of the
18 preoperative inflammation-based scores with TNM stage and recurrence in
19 patients with papillary thyroid carcinoma: a retrospective, multicenter analysis.
20 *Cancer Manag Res.* 2020; 12: 1809–18.

21 [6] Jung CK, Bychkov A, Kakudo K. Update from the 2022 World Health
22 Organization Classification of Thyroid Tumors: A Standardized Diagnostic
23 Approach. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2022; 37(5): 703–718.

24 [7] Sohn SY, Lee JJ, Lee JH. Molecular profile and clinicopathologic features of
25 follicular variant papillary thyroid carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2020; 26(2):
26 927–936.

27 [8] Baloch Z, Mete O, Asa SL. Immunohistochemical biomarkers in thyroid
28 pathology. *Endocr Pathol.* 2018; 29(2): 91–112.

29 [9] Stergioula A, Pantelis E, Kormas T, Agrogiannis G. Case report: skeletal
30 muscle metastasis from follicular thyroid carcinoma presenting as synovial
31 sarcoma. *Front Oncol.* 2023; 13: 994729.

32 [10] Abdullah MI, Junit SM, Ng KL, Jayapalan JJ, Karikalan B, Hashim OH.
33 Papillary thyroid cancer: genetic alterations and molecular biomarker
34 investigations. *Int J Med Sci.* 2019; 16(3): 450–460.

35 [11] **AMERICAN CANCER SOCIETY**. Thyroid cancer. Atlanta: American Cancer
36 Society; c2022 [cited 2025 Jan 15]. Available from:
37 <https://www.cancer.org/cancer/types/thyroid-cancer>

38 [12] J Juhlin CC, Mete O, Baloch ZW. The 2022 WHO classification of thyroid
39 tumors: novel concepts in nomenclature and grading. *Endocr Relat Cancer.*
40 2022; 30(2): e220293.

- 1 [13] Hunsaker JC, Hoffman G. Papillary thyroid carcinoma: an autobiographical
2 case report. *Cureus*. 2022; 14(2): e22559.
- 3 [14] Choi H, Kasaian K, Melck A, Ong K, Jones SJM, Wiseman SM. Papillary
4 thyroid carcinoma: prognostic significance of cancer presentation. *Am J Surg*.
5 2015; 210(2): 298–301.
- 6 [15] Ahmed M, Saleem M, Al-Arifi A, Almahfouz A, Mahasin Z, Al-Sobhi S, et al.
7 Obstructive endotracheal lesions of thyroid cancer. *J Laryngol Otol*. 2002; 116(8):
8 613–621.
- 9 [16] Al-Tonbary Y, Zalata K, El-Ashry R, Fouda A. Papillary thyroid carcinoma
10 presenting with upper respiratory tract obstruction and pulmonary metastases.
11 *World J Pediatr*. 2009; 5(3): 229–231.
- 12 [17] Platzer ML, Vega-Briceño LE, González DH, Iñiguez OF, Escobar FC, Prado
13 AF. Cáncer tiroideo: una causa infrecuente de obstrucción de vía aérea superior
14 en niños. Caso clínico. *Rev Med Chil*. 2006; 134(6): 772–776.
- 15 [18] Dujovne N, Lucero MB, Gazek N, Pitoia F, Felipe L, Ayarzabal V, et al.
16 Respuesta al lenvatinib en una paciente pediátrica con insuficiencia respiratoria
17 asociada a carcinoma papilar de tiroides. *Arch Argent Pediatr*. 2021; 119(1):
18 e70–e74.
- 19 [19] Reinke CE, Hadler RA, Karakousis GC, Fraker DL, Kelz RR. Does the
20 presence of thyroid cancer increase the risk of venous thromboembolism in
21 patients undergoing thyroidectomy? *Surgery*. 2011; 150(6): 1275–1285.
- 22 [20] Ordoorkhani A, Motazedi A, Burman KD. Thrombosis in thyroid cancer. *Int J*
23 *Endocrinol Metab*. 2017; 16(1): e57897.
- 24 [21] Wei WT, Liu PP, Lin SM, Peng CCH, Wang JH, Huang HK, et al.
25 Hypothyroidism and the risk of venous thromboembolism: a nationwide cohort
26 study. *Thromb Haemost*. 2020; 120(3): 505–514.
- 27
- 28