



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

HANNAH HAMADA MENDONÇA LENS

**RESPOSTA OXIDATIVA E VIABILIDADE DA CÉLULA DE
CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREOIDE K1, APÓS
TRATAMENTO INDIRETO COM PLASMA FÍSICO FRIO**

Londrina
2020

HANNAH HAMADA MENDONÇA LENS

**RESPOSTA OXIDATIVA E VIABILIDADE DA CÉLULA DE
CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREOIDE K1, APÓS
TRATAMENTO INDIRETO COM PLASMA FÍSICO FRIO**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Alessandra Lourenço Cecchini Armani

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

L573r Lens, Hannah Hamada Mendonça.
Resposta oxidativa e viabilidade da célula de carcinoma papilífero de tireoide, k1, após tratamento indireto com plasma físico frio / Hannah Hamada Mendonça Lens. - Londrina, 2020.
67 f. : il.

Orientador: Alessandra Lourenço Cecchini Armani.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Tireóide - Doenças - Tese. 2. Carcinoma papilífero de tireóide - Tese. 3. Água oxigenada - Tese. I. Armani, Alessandra Lourenço Cecchini. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

HANNAH HAMADA MENDONÇA LENS

**RESPOSTA OXIDATIVA E VIABILIDADE DA CÉLULA DE
CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREOIDE K1, APÓS TRATAMENTO
INDIRETO COM PLASMA FÍSICO FRIO**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a Dr^a Alessandra Lourenço
Cecchini Armani
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Dr^a Flávia Alessandra Guarnier
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. André Armani
Universidade Estadual de Londrina- UEL

Londrina, 08 de Abril de 2020.

AGRADECIMENTOS

À professora Alessandra Lourenço Cecchini Armani, minha orientadora de mestrado, quem me proporcionou a oportunidade de realizar um projeto de pesquisa no laboratório de Patologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina e me acolheu neste período da pós-graduação, me fornecendo todas as ferramentas e experiências que permearam minha caminhada.

Aos professores componentes da minha banca de qualificação e defesa, Prof. Dr. André Armani, Prof^a Dr^a Flávia Alessandra Guarnier, Dr^a Larissa Juliani Sanches e ao Prof Dr Rodrigo Cabral Luiz, por terem concordado em avaliar e contribuir com minha dissertação e formação profissional.

Aos meus companheiros de laboratório, e de mestrado, que estiveram ao meu lado durante toda a dura caminhada, principalmente aos doutorandos Natália Medeiros Dias Lopes, Fernanda Paschoal Blegniski, Gabriella Pasqual-Melo e Bruno Sekiguchi; às mestrandas Isabela Chagas Silva, Julya Karen Bianchi, Liara Freitas, Joyce Ribeiro e Ana Carolina Jacob. Ao técnico Jesus Antonio Vargas, por todo o auxílio em todos os experimentos, sempre à disposição, e um exemplo de profissional fiel à pesquisa.

Aos professores que contribuíram muito para a minha formação na graduação e pós-graduação, principalmente à Prof^a Dr^a Vanessa Jacob Victorino, por ter me mostrado o mundo da Patologia e possibilitado tantas conquistas. À Prof^a Dr^a Poliana Camila Marinello, que se dispôs a me ajudar sempre, com conselhos e direcionamentos, sempre com paciência e profissionalismo.

À Universidade, que mesmo em meio a crises financeiras e burocráticas, me proporcionou a oportunidade e o ambiente de trabalho, com os recursos necessários para tal. Ao CNPq, ITEDS e CAPES pelos recursos financeiros e materiais.

À minha família, por todo apoio, pela compreensão nas horas difíceis, noites em claro e reclamações, pelo carinho e por todo amor incondicional. Com toda certeza, sou quem sou, graças a eles, que sempre acreditaram em mim e me deram a oportunidade de chegar até aqui. E finalmente, ao meu melhor amigo, companheiro e namorado, Felipe, por todas as palavras em momentos frustrantes e desesperadores; por todos os finais de semana e noites de experimento no laboratório, na sua companhia; pelo apoio durante os momentos difíceis e pelas comemorações pelas pequenas e grandes conquistas. Obrigada por todo seu apoio, que foi fundamental durante a caminhada do mestrado, e ao final dela também.

LENS, Hannah Hamada Mendonça. **Resposta oxidativa e viabilidade da célula de carcinoma papilífero de tireoide, K1, após tratamento indireto com plasma físico frio.** 2020. 67 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

O carcinoma de tireoide é considerado o tipo mais comum de câncer endócrino e uma das neoplasias que mais cresce em número de diagnósticos. A incidência aumenta a cada ano, sendo o carcinoma papilífero de tireoide (CPT) o tipo mais prevalente. A K1, diferentemente de outras linhagens, possui uma mutação em BRAF (V600E), que representa grande parte dos casos de CPT, e proteína p53 ativa, culminando numa linhagem única de carcinoma tireoidiano. A linhagem de células de CPT- K1, é uma das linhagens que possui o menor número de estudos que discutem sua interação com espécies reativas (ER), pouco sabendo-se sobre ela nesse cenário. O efeito das ER em células tumorais pode desempenhar papel tanto pró quanto anti-tumoral, justificando a necessidade de investigar o comportamento de carcinomas frente às espécies reativas. Este trabalho teve como objetivo compreender os efeitos do tratamento indireto com plasma frio atmosférico de argônio, um gerador de ER mistas, na K1. Este plasma físico é um potente produtor de ER, principalmente peróxido de hidrogênio e espécies reativas de nitrogênio (ERN). Foi avaliado o comportamento da K1 com a terapia indireta com plasma e com cada uma dessas espécies por meio da caracterização tanto da viabilidade quanto do balanço redox das células de CPT. Os tempos de irradiação (30, 60 e 120 segundos) com o plasma frio atmosférico, afetaram a K1 de forma a diminuir sua viabilidade, principalmente o tempo de 120 segundos ($p < 0,0001$), e aumentar o estresse sofrido de forma significativa ($p < 0,0001$) em todos os tempos. Os resultados também mostraram que apenas altas concentrações de peróxido de hidrogênio ($1800\mu\text{M}$) e nitroprussiato de sódio (doador de ERN) ($400\mu\text{M}$), foram capazes de afetar a célula K1 isoladamente, mostrando diminuições significativas ($p < 0,05$) nos parâmetros de viabilidade, tanto proliferativo quanto metabólico, e de estresse oxidativo sofrido pelas células ($p < 0,05$). É possível concluir, portanto, que a linhagem K1 sofre diminuição da viabilidade celular e aumento do estresse oxidativo com o tratamento indireto com plasma frio, principalmente no tempo de irradiação maior (120 segundos), conferindo ao plasma físico frio uma nova possibilidade terapêutica. O peróxido de hidrogênio e as ERN também afetam a célula, isoladamente, principalmente em altas concentrações.

Palavras-chave: CPT. Tireoide. Espécies reativas. Peróxido de hidrogênio. Plasma físico frio.

LENS, Hannah Hamada Mendonça. **Oxidative response and viability of the thyroid papillary carcinoma cell K1, after indirect treatment with cold physical plasma.** 2020. 67 p. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Thyroid carcinoma is considered the most common type of endocrine cancer and one of the fastest growing neoplasms in number of diagnoses. The incidence increases each year, with papillary thyroid carcinoma (PTC) being the most prevalent type. K1, unlike other lineage, has a BRAF mutation (V600E), which represents most cases of PTC, and active p53 protein, culminating in a single lineage of thyroid carcinoma. The PTC-K1 cell line is one of the lines that has the least number of studies that discuss its interaction with reactive species (RS), little is known about it in this scenario. The effect of RS on tumor cells can play both a pro and anti-tumor role, justifying the need to investigate the behavior of carcinomas against reactive species. This work aimed to understand the effects of indirect treatment with atmospheric cold argon plasma, a mixed RS generator, on K1. This physical plasma is a potent producer of RS, mainly hydrogen peroxide and reactive nitrogen species (RNS). The behavior of K1 with indirect plasma therapy and with each of these species was evaluated by characterizing both the viability and the redox balance of PTC cells. The irradiation times (30, 60 and 120 seconds) with atmospheric cold plasma, affected K1 in order to decrease its viability, especially the time of 120 seconds ($p < 0,0001$), and significantly increase the stress suffered ($p < 0,0001$) at all times. The results also showed that only high concentrations of hydrogen peroxide (1800 μ M) and sodium nitroprusside (RNA donor) (400 μ M), were able to affect the K1 cell alone, showing significant decreases ($p < 0,05$) in the parameters of viability, both proliferative and metabolic, and oxidative stress suffered by cells ($p < 0,05$). It is possible to conclude, therefore, that the K1 lineage suffers a decrease in cell viability and an increase in oxidative stress with indirect treatment with cold plasma, especially in the longer irradiation time (120 seconds), giving cold physical plasma a new therapeutic possibility. Hydrogen peroxide and RNA also affect the cell, in isolation, mainly in high concentrations.

Keywords: PTC. Thyroid. Reactive species. Hydrogen peroxide. Cold physical plasma.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

131 I	Isótopo 131 de iodo
5-FU	5- Fluoracil
ATA	American Thyroid Association
ATP	Trifosfato de adenosina
BRAF	Gene que codifica a proteína B-Raf
CPT	Carcinoma papilífero de tireoide
CT	Carcinoma de tireoide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido Desoxirribunucleico
DUOX	Dupla oxidase
E2	Estradiol ou 17 β -estradiol
EGRF	Epidermal growth factor receptor
ER	Espécies Reativas
ERE	Espécie Reativa de Enxofre
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERRO	Espécies Reativas de Oxigênio
GCL	Glumate-cysteine ligase
GLAG-66	Linhagem celular de carcinoma papilífero de tireoide imortalizada
GLS2	Isoforma 2 glutaminase
GSH	Glutationa
INCA	Instituto Nacional do Câncer
K1	Tipo de linhagem celular de carcinoma papilífero de tireoide
MAPK	Via da proteína-quinase ativada por mitógenos
MDA	Malondialdeído
MK2206	Droga alostérica inibidora de Akt
NAD+	Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NADP+	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (forma reduzida)
NIS	Co-transportador de sódio/iodeto
NOX	NADPH oxidase
NPS	Nitroprussiato de sódio

NTRK/TRKA	Neurotrophic receptor tyrosine kinase/ Tropomyosin receptor kinase A
O2	Oxigênio
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PI3K	Via da fosfatidilinositol 3-quinase
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma (família de proteínas)
RAS	Rapidly accelerated sarcoma (família de proteínas)
RET	Rearranged during transfection (família de proteínas)
RI	Radiação ionizante
Slm	standard litre per minute
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TPM	Gene da tropomiosina não-muscular
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
UEL	Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	CARCINOMA DE TIREOIDE	10
1.1.1	Carcinoma Papilífero De Tireoide.....	13
1.2	ESPÉCIES REATIVAS E TIREOIDE.....	16
1.3	PLASMA	20
2	JUSTIFICATIVA	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	ARTIGO	28
5	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54


1 1 INTRODUÇÃO

2 A tireoide está localizada no pescoço, abaixo da laringe e
3 anteriormente à traqueia, e é constituída por dois lobos (direito e esquerdo)
4 conectados por uma massa de tecido, chamada de istimo, altamente vascularizada,
5 sendo a principal glândula do sistema endócrino, responsável pela produção de
6 hormônios (principalmente T3- triiodotironina e T4- tetraiodotironina). A tireoide é
7 formada por unidades esféricas chamadas de folicúlos, compostos por células
8 chamadas foliculares, que circundam uma massa coloidal, onde o T3 e o T4, e a
9 tiroglobulina- uma glicoproteína iodada- são sintetizados. Entre os folicúlos, existem
10 estruturas chamadas de células parafoliculares, ou células C, as quais produzem
11 calcitonina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). A tireoide auxilia na manutenção da
12 homeostase do organismo, modulando diversos processos, como o metabolismo e o
13 uso do cálcio (MOHEBATI; SHAHA, 2012).

14 Segundo a Associação Americana de Tireoide (*American Thyroid*
15 *Association- ATA*), doenças como câncer de tireoide, hipertireoidismo,
16 hipotireoidismo, tireoidites autoimunes, bócio e nódulos, figuram como as mais
17 comuns relacionadas à tireoide, sendo o carcinoma a principal doença nesse cenário,
18 devido ao número de casos diagnosticados (que aumentam década po década); às
19 alterações que provoca na qualidade de vida dos pacientes, e aos efeitos que
20 desencadeia, visto que não apenas a estrutura da glândula é alterada, mas sua
21 funcionalidade também, afetando diversos outros sistemas.

22 1.1 CARCINOMA DE TIREOIDE

23 Dentre as neoplasias que atingem o sistema endócrino, o câncer de
24 tireoide é destaque, sendo o mais incidente (SAPUPPO et al., 2018). O câncer
25 tireoidiano afeta principalmente a população feminina, sendo raro em pacientes abaixo
26 de 18 anos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019), e prevalente naqueles entre 30 a 75
27 anos (VIANNA et al., 2012). Segundo a estimativa mais recente do INCA (2020), esta
28 neoplasia ocupa o 5º lugar no ranking de neoplasias malignas que mais atingem a
29 população feminina no Brasil, principalmente nas regiões Sudeste e Nordeste (figura
30 1).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

INCA 2020

1
2 Figura 1: Incidência de neoplasias malignas de acordo com o sexo, no Brasil (não incluso
3 carcinoma de pele não melanoma). INCA 2020.

4 Os carcinomas de tireoide podem ser identificados em quatro tipos,
5 no geral: papilífero, folicular, medular e anaplásico (TUTTLE et al., 2014), sendo que
6 desta classificação generalista, existem subtipos de cada categoria, e/ou outros tipos
7 menos incidentes (BALOCH; LIVOLSI, 2018). A divisão baseia-se nas diferenças de
8 morfologia tecidual, nas mutações que carregam e no nível de diferenciação em que
9 se encontram (KUMAR, 2010). 94% dos carcinomas de tireoide são provenientes de
10 células foliculares do epitélio glandular e possuem lesões bem definidas, sendo
11 considerados, portanto, bem diferenciados, ou seja, possuem maior similaridade com
12 o tecido original (PELLEGRITI et al., 2013). Esses carcinomas respondem bem a
13 tratamentos mais ou menos agressivos, de acordo com o comportamento, quadro
14 clínico, evolução da doença, etc. As terapias com iodo radioativo e /ou radioterapia,
15 são utilizados após a cirurgia de forma adjuvante à remoção de parte ou de toda a
16 glândula, as chamadas tireoidectomias parcial ou total, com retirada dos linfonodos
17 regionais, como forma de diminuir as chances de recidiva (KUMAR, 2010).

18 Os tumores indiferenciados (anaplásico e pouco diferenciado), por
19 outro lado, são caracterizados por epitélio indiferenciado com anaplasia intensa e
20 perda de função (MOLINARO et al., 2017). Geralmente, não respondem bem aos
21 tratamentos, e mesmo após tireoidectomia total, as chances de recidiva são altas
22 (MALETTA et al., 2019). Outras doenças associadas, como tireoidites autoimunes,
23 são considerados fatores que influenciam o prognóstico e desenvolvimento da doença
24 (LIANG et al., 2017); para alguns autores, essa associação pode contribuir para
25 prognósticos melhores, curso da doença menos agressivo, aumento da sobrevida e
26 melhor resposta aos tratamentos; enquanto outros autores consideram que a

1 presença de doenças autoimunes associadas seja fator de risco para a piora do
2 quadro, acompanhado de pior prognóstico, persistência do carcinoma, menor taxa de
3 sobrevida e aumento da mortalidade específica (PAPARODIS et al., 2014).

4 São considerados fatores de risco para desenvolvimento de
5 neoplasias tireoidianas: o contato contínuo com radiação ionizante (RI), a deficiência
6 ou alta ingestão de iodo, e histórico familiar de câncer na tireoide associado a genes
7 hereditários (KITAHARA; SOSA, 2016). O diagnóstico citológico de nódulos
8 tireoidianos, é feito por meio de punção aspirativa com agulha fina (PAAF); entretanto,
9 15 a 20% dos achados são inconclusivos (NA et al., 2017), seguido normalmente do
10 procedimento de retirada total ou parcial da tireoide. O diagnóstico de carcinoma de
11 tireoide vem sofrendo inovações bem sucedidas, principalmente na área de
12 marcadores biológicos, como a identificação de marcadores de superfície celular
13 (ANGELL et al., 2014; LI et al., 2014), de fatores no microambiente tumoral que atuam
14 como promotores tumorais, como o ATP extracelular (BERTONI et al., 2018), a
15 especificidade de anticorpos presentes no microambiente tumoral quando associado
16 a doenças autoimunes (LUPOLI et al., 2015; YU et al., 2016), entre outros marcadores
17 que contribuem para esclarecer prognósticos e diagnósticos. Estes fatores estão
18 diretamente ligados ao aumento na incidência de casos confirmados na última década
19 (CHMIELIK et al., 2018), sendo que o carcinoma de tireoide é considerado um dos
20 únicos carcinomas que vem sofrendo aumento no número de diagnósticos (INCA,
21 2012).

22 Atualmente, além da retirada da glândula tireoide total ou parcial, o
23 tratamento para carcinoma de tireoide pode incluir o esvaziamento cervical, ou seja,
24 a ressecção de nódulos linfáticos adjacentes afetados pelo tumor (LAMARTINA et al.,
25 2017). O pós-operatório é caracterizado pela supressão hormonal, onde há reposição
26 de hormônio tireoidiano em dose um pouco maior que a necessária, com o intuito de
27 diminuir a produção, pela hipófise, do TSH, inibindo a proliferação celular tumoral
28 tireoidiana que é induzida pelo hormônio hipofisário (INCA, 2017). O tratamento com
29 iodo radioativo, quando indicado, só ocorre após a cirurgia de tireoidectomia total; sua
30 administração diminui as recorrências, metástase e recidivas, configurando uma
31 terapia importante para a sobrevida e cura de pacientes em determinados casos
32 (GOLDSMITH, 2017). O iodo radioativo atua em carcinomas bem diferenciados, visto
33 que eles mantêm a expressão de um transportador importante de iodo, o NIS, proteína
34 essa que é expressa na membrana das células foliculares e desempenha a função de

1 internalizar o iodo adquirido pelo organismo; por isso carcinomas indiferenciados
2 necessitam de outras terapias, visto que não expressam NIS.

3 Segundo Goldsmith (2017), o Iodo Radioativo, ^{131}I , foi isolado em
4 1937, e a partir de 1942, diversos médicos e pesquisadores começaram a utilizá-lo
5 como tratamento para carcinomas de tireoide. Entretanto, com o advento da 2ª Guerra
6 Mundial, o uso de compostos radioativos tornou-se restrito e controlado, e por esta
7 razão, as publicações e pesquisas só foram autorizadas após o término da Guerra
8 (1946), assim como o estabelecimento de legislações específicas para manipulações
9 de compostos radioativos. As principais observações do uso de ^{131}I foram o acúmulo
10 na região da tireoide; os efeitos na funcionalidade da glândula, principalmente em
11 pacientes com hipertireoidismo; a persistência da captação do iodo, mesmo após
12 tireoidectomias realizadas em pacientes com câncer de tireoide, fato esse decorrente
13 da captações por remanescentes de tecido tireoidiano, massas neoplásicas
14 metastáticas, ou recorrentes; a relação dos níveis de TSH e o tratamento com Iodo
15 Radioativo; e por fim, o uso de Iodo Radioativo como fator de “atordoamento” nos
16 carcinomas, combinando seu uso na imagem, com uso terapêutico.

17 O Iodo radioativo traz efeitos colaterais custosos ao paciente, e por
18 esta razão, a administração da terapia ainda tem muitas dificuldades. Os efeitos
19 colaterais vão desde ageusia e vômitos, até infertilidade e cânceres secundários (LEE,
20 2010). Já existem evidências, ainda, de que células de carcinoma papilífero de
21 tireoide, apesar de serem afetadas pelo ^{131}I , ainda assim, não respondem ao
22 aumento da dose administrada (STASIOLEK et al., 2017). Tendo em vista os efeitos
23 colaterais provocados pelo tratamento com ^{131}I , e que o objetivo da administração
24 do iodo radioativo é evitar o desenvolvimento de metástase, diminuir a recorrência e
25 recidivas (GOLDSMITH, 2017), outros tratamentos que possam atuar como
26 adjuvantes, ou que dispensem o uso do iodo radioativo, são de interesse para
27 proporcionar melhores condições aos pacientes e maiores chances de cura e
28 sobrevida, principalmente visando a qualidade de vida e evitando danos colaterais.

29 1.1.1 Carcinoma Papilífero de Tireoide

30 O tipo mais incidente de carcinoma tireoidiano é o papilífero,
31 representando cerca de 80% dos casos diagnosticados (BONGIOVANNI et al., 2017).
32 Seu epitélio é caracterizado por células foliculares, organizadas em forma de papilas,

1 similares à morfologia das papilas gustativas da língua, provendo a origem do nome
2 (KUMAR, 2010). Possuem crescimento lento, porém com recorrência considerada alta
3 (30%). Segundo a ATA, os fatores que podem contribuir para a recorrência são:
4 invasão vascular, multifocalidade, número e tamanho de linfonodos cervicais com
5 metástase e invasão capsular.

6 Apesar de não apresentar fenótipo agressivo, o carcinoma papilífero
7 de tireoide (CPT) responde relativamente bem aos tratamentos, em comparação aos
8 outros tipos (GILLANDERS; O'NEILL, 2018). O CPT também possui subclassificação,
9 com nomeações diferenciadas, (como por exemplo: carcinoma papilífero de tireoide
10 variante folicular, variante encapsulada folicular e oncótica), as quais representam
11 subtipos com morfologia distinta do carcinoma papilífero clássico (LLOYD et al., 2017),
12 e que possuem variações nas respostas aos tratamentos. Segundo Nath e Erickson
13 (2018), alguns subtipos destacam-se como mais preocupantes, por apresentarem
14 fenótipo agressivo e de difícil tratamento, diferentemente do papilífero clássico, como:
15 *Hobnail, Tall Cell, Columnar, e Solid.*

16 O carcinoma papilífero de tireoide clássico pode ser dividido ainda em
17 dois tipos, considerando as mutações que carrega e morfologia que apresenta. Os
18 grupos são: *BRAF-like*, consideravelmente mais comum que o outro grupo, o *RAS-*
19 *like* (CARIA et al., 2019). Essas vias mutadas são comuns nesse tipo de carcinoma, e
20 a classificação associa a morfologia da arquitetura tecidual com a presença dessas
21 mutações; o tipo *BRAF* possui mutação no gene *BRAF* e *RET*, e arquitetura papilar;
22 enquanto o tipo *RAS* possui mutação na via de mesmo nome, e arquitetura folicular,
23 semelhante ao tecido normal da tireoide (GIORDANO, 2016).

24 As principais mutações que caracterizam o CPT em geral, são:
25 pontuais, translocação e inversão (KATOH et al., 2015). A via mais afetada, neste
26 carcinoma de tireoide, é a via *MAPK (mitogen-activated protein kinase)*, a qual, em
27 condições fisiológicas, é responsável por modular a diferenciação, o crescimento, a
28 sobrevivência celular e a apoptose (TANG; LEE, 2010), incluindo principalmente os
29 proto-oncogenes da família *RAS, BRAF, RET (RET/PTC) 1e 3, NTRK1* (que assim
30 como *RET*, é normalmente restrita a células neurais, mas quando mutada, passa a
31 ser expressa nas células tireoidianas) e *TERT*, clássicos para CPT (HSIAO;
32 NIKIFOROV, 2019)

33 Os genes *RAS* e *BRAF*, estão envolvidos no controle da via *MAPK* e
34 na regulação da capacidade proliferativa e de diferenciação, respectivamente

1 (ZLOBIN; BLOODWORTH; OSIPO, 2019). Quando *RAS* é afetado por mutações, leva
2 a ativação intermitente da via *MAPK* e à perda do controle do ciclo celular, resultando
3 na proliferação descontrolada das células foliculares (PUZZIELO et al., 2016). A
4 alteração mais comum no gene *BRAF* neste caso, é constituída pela transversão de
5 Timina para Adenina (T1799A) no éxon 15, resultando na substituição do aminoácido
6 Valina pelo Glutamato (V600E), levando ao surgimento do genótipo *BRAFV600E*
7 (FRASCA et al., 2008), resultando por fim, no descontrole da diferenciação celular e
8 capacidade proliferativa das células na tireoide.

9 A linhagem K1 é uma linhagem de carcinoma papilífero de tireoide,
10 descrita e utilizada pela primeira vez por Wyllie e colaboradores (1995), a linhagem
11 celular humana de carcinoma papilífero de tireoide K1, possui mutação heterozigótica
12 no gene *BRAF* (V600), representando uma linhagem específica para estudos em
13 carcinomas papilíferos do tipo *BRAF*. As informações citogenéticas sobre a nova
14 linhagem, entretanto, só foram caracterizadas mais tarde, por Ribeiro e colaboradores
15 (2008), os quais mostraram que a K1 se assemelha com outra linhagem de carcinoma
16 papilífero, a GLAG-66, uma linhagem proveniente de tumor metastático de CPT. Os
17 autores afirmaram que levando em conta o cenário citogenético, a K1 é na verdade
18 uma subpopulação tetraploide da GLAG-66. Essa linhagem é semelhante aos
19 carcinomas papilíferos com mutação heterozigótica em *PI3KCA*, além de *BRAF*, que
20 possuem *p53* ativa normal e polimorfismos no gene *EGRF* (MEIRELES et al., 2007).
21 É uma linhagem considerada bem diferenciada, pois ainda retém a diferenciação das
22 células foliculares da tireoide, como a síntese de tiroglobulina.

23 Pelas mutações e características que abarca, a linhagem K1
24 representa uma ferramenta valiosa no estudo de características de carcinomas
25 papilíferos de tireoide, principalmente no que se refere ao estudo de linhagens com
26 mutação em *BRAF*, provenientes de tumor primário com invasão, e com *p53* normal
27 ativa, e no estudo de terapias. Os carcinomas bem diferenciados de tireoide
28 representam uma minoria excepcional de carcinomas, que aparentemente não
29 requerem mutação em *p53*, de forma a inativá-la (MEIRELES et al., 2007). É mais
30 frequente que células com mutação em *RET/PTC* não possuam mutação em *p53*, que
31 as do tipo *BRAF*, as quais geralmente apresentam alterações nessa proteína (ITO et
32 al., 1992). A linhagem K1 torna-se uma linhagem valiosa no estudo de carcinomas
33 bem diferenciados, com mutação em *BRAF* e *p53* normal, podendo também ser
34 extrapolada para o estudo do comportamento e efetividade de tratamentos em

1 populações metastáticas, como visto a seguir.

2 Em relação a outras linhagens de CPT, a K1 exibe um perfil
3 metabólico alterado, conferindo adaptação metabólica crucial para o desenvolvimento
4 das células (TRONCI et al., 2019). Sua alta taxa de crescimento, proliferação e
5 sobrevivência estão associadas à uma mutação que induz a maior sinalização de uma
6 via, chamada *Wnt/βcatenina*, via essencial para desenvolvimento de diversos outros
7 tumores (YANG et al., 2017). A capacidade de evadir dos mecanismos de apoptose
8 da célula, também é descrita nos carcinomas papilíferos de tireoide, que em alguns
9 casos, mesmo possuindo p53 normal, ainda exibem perfil antiapoptótico
10 descontrolado. Em 2011, Lavra e colaboradores, identificaram que apesar da
11 linhagem K1 possuir p53 normal, a proteína antiapoptótica Galectina-3, estava
12 superexpressa (contrariando a já estabelecida relação: p53 normal leva a inibição da
13 Galectina-3). Essa habilidade dos carcinomas papilíferos em evadir da apoptose pode
14 ser explicada pela falta de ativação da p53, que apesar de normal, pode não ser
15 ativada pela HIPK2, proteína quinase que no caso da linhagem K1 está diminuída, e
16 a qual é necessária para ativar a p53 e levar a apoptose das células.

17 1.2 ESPÉCIES REATIVAS E TIREOIDE

18 Os radicais livres foram identificados pela primeira vez em 1924, porém
19 somente mais tarde é que se constatou seu papel em mecanismos fisiológicos e
20 inclusive no desenvolvimento de doenças (MOSLEN, 1994). Eles referem-se a átomos,
21 moléculas ou íons com elétrons desemparelhados na última camada de valência,
22 altamente instáveis e reativos com outras moléculas, e que apresentam meia vida curta
23 (HALLIWELL, 2001). Atualmente, existe um conceito mais abrangente que inclui os
24 radicais livres e que considera outras moléculas reativas, que não possuem as
25 características eletrônicas do radical e geralmente possuem maior tempo de vida média,
26 as chamadas espécies reativas; elas podem ser derivadas de oxigênio, nitrogênio e
27 enxofre, os quais originaram três classes: (1) espécies reativas de oxigênio (ERO), (2)
28 espécies reativas de nitrogênio (ERN) e (3) espécies reativas de enxofre (ERE) (VALKO
29 et al., 2007).

30 Alguns exemplos de radicais livres são: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$),
31 oxigênio singlet (1O_2), radical hidroxila ($\bullet OH$), peroxinitrito ($ONOO^-$) (FERREIRA;
32 MATSUBARA, 1997). Muitas vezes, os radicais livres, quando reagem com eles

1 mesmos ou com outras moléculas podem dar origem a outros radicais que propagam
2 efeitos em cadeia, como o radical hidroxil e sua relação com a lipoperoxidação de
3 membrana, gerando radical peroxil (GASCHLER; STOCKWELL, 2017). As espécies
4 reativas, por sua vez, podem ser exemplificadas pelo: peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que
5 possui vida longa (acima de 10^{-2} segundos), e atua como base para a produção do
6 radical de O_2 mais reativo, o radical hidroxil (SIES, 2017) e o óxido nítrico (NO), indutor
7 de vasodilatação de veias e artérias, e que ao reagir com radical superóxido, forma o
8 radical livre, peroxinitrito (RADI, 2018). Apesar de não serem considerados radicais
9 livres, as espécies reativas podem apresentar risco às células, assim como os radicais,
10 caso estejam em excesso ou em outras situações de desequilíbrio, podendo, inclusive,
11 apresentar toxicidade ao meio/sistema (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Por esta
12 razão, é necessário que seja mantido o balanço redox da célula, conceito que envolve a
13 manutenção do equilíbrio celular e a adaptação a novas condições de estresse. Esse
14 conceito inclui compostos e moléculas que reagem com as espécies reativas,
15 neutralizando-as ou controlando-as, os chamados antioxidantes (HALLIWEEL, 2011).

16 Um dos conceitos mais popularmente envolvidos com espécies reativas
17 é o de estresse oxidativo, definido em tradução livre, como o “desequilíbrio entre
18 espécies reativas e antioxidantes, numa escala total”. Atualmente, a literatura descreve
19 que o estresse oxidativo tem um papel adaptativo importante frente a novas condições,
20 sejam elas estressantes ou apenas diferentes do cenário anterior, o estado homeostático
21 (ao qual o sistema já estava adaptado). As espécies reativas geradas, neste caso,
22 agiriam como moduladoras de processos adaptativos. A capacidade de adaptação de
23 uma célula a um novo cenário, buscando um novo estado de equilíbrio, envolveria
24 modulação da produção e da interação de diversas vias de sinalização redox sensíveis,
25 sem necessariamente alterar o balanço global da produção e atuação de espécies
26 reativas e de antioxidantes, o que representaria um aumento de baixo a moderado, de
27 algumas das moléculas mencionadas. Levando em consideração esses preceitos, é
28 importante então que se acrescente à definição original de estresse oxidativo, a
29 “interrupção ou desequilíbrio na sinalização redox sensível, assim como em seu
30 controle” (JONES, 2006).

31 As espécies reativas e o estresse oxidativo estão envolvidos em
32 múltiplas funções no organismo de mamíferos, como: a participação no processo
33 inflamatório, principalmente durante a ação de leucócitos; o envolvimento na adesão
34 celular, na embriogênese, na diferenciação celular, no reparo, na cicatrização, apoptose

1 e até mesmo na expressão gênica (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). A ativação de vias
2 de sinalização, também está na lista de funções dessas espécies reativas, direcionando
3 a resposta específica da via ativada (MARTINDALE; HOLBROOK, 2002). As espécies
4 reativas também têm papel essencial na produção de hormônio tireoidianos, a exemplo
5 do peróxido de hidrogênio (OHYE; SUGAWARA, 2010).

6 Por outro lado, altas quantidades de espécies reativas, produzidas sem
7 controle, e/ou resultantes de mutações, e/ou de alterações em vias celulares
8 importantes, e/ou diminuição da produção de antioxidantes, desencadeiam uma série de
9 eventos que podem levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (INCALZA
10 et al., 2018), neurológicas (ELFAWY; DAS, 2019), diabetes (ASMAT; ISMAIL, 2016), e
11 até neoplasias (TOYOKUNI, 2016). Nesses casos, o estresse oxidativo produzido tem
12 consequências negativas ao organismo. Os efeitos da RI, por exemplo, um dos fatores
13 de risco para desenvolvimento de carcinoma de tireoide, baseia-se no estresse oxidativo
14 induzido pela radiação, o qual é responsável pelos rearranjos cromossômicos
15 encontrados em carcinomas papilíferos de tireoide (AMEZIANE-EL-HASSAN et al.,
16 2010). Evidências também mostram que níveis intracelulares de espécie reativas de
17 oxigênio, podem levar a ativação de vias como *MAPK*, e *PI3K/Akt* (NOGUEIRA; HAY,
18 2013), que são descritas como as principais vias alteradas no carcinoma papilífero de
19 tireoide.

20 Na tireoide, uma das espécies reativas de oxigênio, o peróxido de
21 hidrogênio, é gerado nas próprias células, para a produção de hormônios, e possui
22 importante papel na conversão do substrato iodo para as formas pré-hormonais
23 (CARVALHO; DUPUY, 2017). Devido à presença robusta dessa espécie reativa, a
24 tireoide dispõe de mecanismos antioxidantes abundantes em suas células, e por este
25 motivo suporta níveis celulares maiores da espécie reativa em sua estrutura (OHYE;
26 SUGAWARA, 2010). Entretanto existem evidências de que a produção de peróxido
27 pelas famílias de NADPH-oxidases (NOX e DUOX) pode sair do controle e gerar excesso
28 de peróxido de hidrogênio, que desempenha papel carcinogênico. Este cenário foi
29 identificado principalmente em CPT (SZANTO; PUSZTASZERI; MAVROMATI, 2019).
30 Nas células tireoidianas, a produção de peróxido de hidrogênio e a regulação da
31 produção de hormônios dependem de algumas proteínas como a DUOX2, e seu fator
32 de ativação DUOXA2, e proteínas da família NOX, principalmente a NOX4 (CARVALHO;
33 DUPUY, 2013). Essas proteínas têm papel de oxidases, e a NOX4 é referenciada como
34 fonte de ERO intracelular na tireoide humana. A literatura mostra que o estresse

1 oxidativo em CPT está relacionado também à atividade de NOX4, a qual é encontrada
2 em níveis aumentados em carcinomas diferenciados de tireoide, sob influência do TSH
3 (WEYEMI et al., 2010).

4 As espécies reativas e o estresse oxidativo relacionam-se de diversas
5 formas no cenário do desenvolvimento do carcinoma papilífero de tireoide, entre elas,
6 evidencia-se o papel do estrógeno, destaque para E2, que já é identificado em muitas
7 pesquisas como pró-oxidante (YAGER, 2000; TIAN et al., 2016). O E2 (17 β -estradiol),
8 é um potente estimulante de células da tireoide, tanto malignas, quanto benignas,
9 vinculado a vias como *MAPK* e *PI3K* (STEPNIAK et al., 2018), e quando aumentado,
10 promove, portanto, a proliferação e até metástase de células tumorais (DERWAHL;
11 NICULA, 2014). Essa associação entre CPT, ERO e E2, vem explicar a maior incidência
12 de carcinoma tireoidiano na população feminina.

13 É também em células de CPT que são encontradas alterações
14 referentes às defesas antioxidantes, como: diminuição de xantina oxidase, glutathiona
15 peroxidase, superóxido dismutase-Cu e superóxido dismutase-Zn; enquanto, foram
16 observados aumentos em superóxido dismutase-Mn e nos níveis de MDA (MONO et al.,
17 1997). Em 2019, Tronci e colaboradores identificaram que a linhagem K1, apresenta
18 NAD⁺ e NADP⁺ em níveis elevados, assim como os níveis médios de GCL, enzima
19 envolvida na síntese da glutathiona, conferindo à célula, adaptações redox importantes e
20 defesa antioxidante das células tumorais. É importante lembrar que a literatura mostra
21 que alguns antioxidantes agem a favor das células tumorais, conferindo um mecanismo
22 de proteção às próprias células neoplásicas, como é o caso do GSH (KOU et al., 2019).

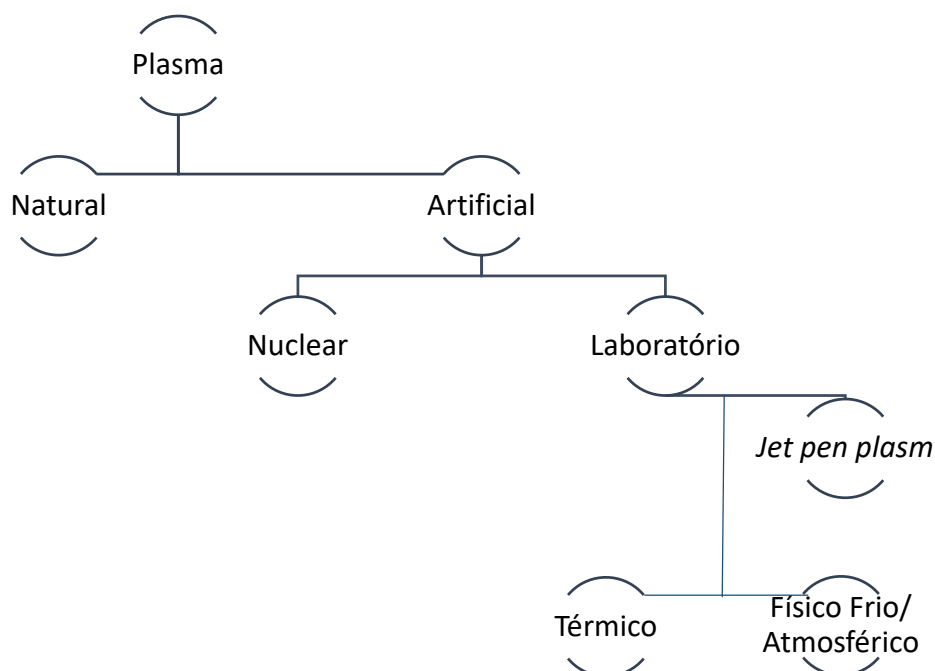
23 As espécies reativas também são consideradas ferramentas
24 importantes para instituir novas terapias, pois apresentam versatilidade quanto à ação
25 em vias de sinalização, ativação de genes, e estão intimamente ligados com homeostase
26 celular. O efeito terapêutico de espécies reativas e do estresse oxidativo é relatado
27 principalmente no uso de certos quimioterápicos (YANG et al., 2018), na radioterapia
28 (ZHANG; MARTIN, 2014), e na imunoterapia (ZOU et al., 2017), que podem aumentar o
29 nível intracelular de ERO ou podem ser os próprios doadores dessas ER. A indução da
30 produção de ER no geral, pode contribuir para ativação de mecanismos como apoptose,
31 autofagia, necroptose e ferroptose, e pode inciar outros, como despolarização
32 mitocondrial, lesão de DNA, alterações metabólicas e diminuição da defesa antioxidante
33 por exemplo (ZOU et al., 2017). Atualmente sabe-se que muitas dessas terapias também
34 afetam células normais, principalmente as quimioterapias, podendo levar a danos em

1 tecidos saudáveis, provocar efeitos colaterais, prejudicando o bem-estar físico e psíquico
2 dos pacientes em tratamento, e podendo também levar a danos severos que podem
3 afetar a sobrevivência, como por exemplo, a indução da caquexia (RYAN et al., 2019).
4 Apesar de promissor, ainda não existe um modo de especificar a atuação desses
5 tratamentos indutores de ER, levando-se em conta tanto as células saudáveis quanto as
6 tumorais. Esta terapia já provou ser eficaz em diversos tipos de cânceres, e portanto é
7 de interesse encontrar terapias que utilizem dessas ER em tecidos tumorais
8 seletivamente, sem provocar danos às saudáveis, trazendo maior eficiência e
9 segurança.

10 1.3 PLASMA

11 O plasma é o quarto estado físico da matéria, um gás que recebe
12 energia suficiente para excitar os elétrons externos e promover sua ionização (BURM,
13 2012), sua denominação pode aparecer apenas como plasma, ou mais específico
14 como plasma físico que se refere justamente ao quarto estado físico da matéria e não
15 a outras substâncias de mesmo nome (exemplo: plasma sanguíneo). Apesar da
16 semelhança entre o estado plasmático e o estado gasoso, há uma diferença crucial:
17 a conformação atômica em que as partículas se encontram, visto que no gás, os
18 átomos permanecem íntegros, enquanto que no plasma, a energia é suficiente para
19 dissociar os elétrons dos átomos ou moléculas (NANDKUMAR, 2014). O plasma físico
20 é formado por um conjunto de átomos livres, elétrons e íons, em uma distribuição na
21 qual o número de partículas positivas e negativas é praticamente igual, esse conjunto
22 denso de átomos possuem comportamento coletivo e é eletricamente condutor
23 (FRIDMAN et al., 2008).

24 Para a formação desse estado da matéria, um gás precisa ser
25 aquecido térmica ou eletricamente, de forma que haja o rompimento das moléculas
26 que compõem essa matéria gasosa, formando os átomos livres que perdem e ganham
27 elétrons de forma dinâmica (KEIDAR et al., 2013). Esse processo gerador de plasma
28 físico pode ser natural, ocorrendo de forma espontânea nas condições necessárias
29 para tal, e que resulta em fenômenos como relâmpagos e auroras boreais, e até
30 nebulosas e a corona solar, por exemplo; ou pode ser artificial, produzido em
31 laboratório (térmico ou frio/atmosférico) ou em usinas (ALVES; PEREIRA; RIBEIRO,
32 2019).



1
 2 O processo que leva à formação do plasma artificial nuclear, é
 3 realizado em usinas e reatores, nos quais, através da fusão termonuclear controlada,
 4 e produz este determinado tipo (MERLINO; GOREE, 2004). Já o plasma produzido
 5 artificialmente em laboratório, se dá por meio de aparelhos que modificam uma fonte
 6 de gás ou o ar atmosférico, os quais levam à excitação dos elétrons, e à uma
 7 consequente formação de energia que pode ser térmica ou não (REUTER;
 8 WOEDTKE; WELTMANN, 2018). O plasma térmico é altamente reativo e produz calor;
 9 todas as suas moléculas estão em equilíbrio termodinâmico entre si, possuindo a
 10 mesma energia e temperatura, resultando num plasma que reage com outras matérias
 11 de forma expansiva (BOGAERTS et al., 2002).

12 O plasma físico frio ou atmosférico não dispõe de equilíbrio
 13 termodinâmico, resultando em temperaturas diferentes para cada partícula, entretanto
 14 é graças à estrutura do equipamento gerador que a temperatura do plasma em si
 15 permanece abaixo dos 40°C (FRIDMAN et al., 2008). Devido às suas características
 16 térmicas, este plasma é amplamente utilizado no âmbito medicinal, principalmente na
 17 área dermatológica (BERNHARDT et al., 2019), odontológica, de diagnósticos, onde
 18 respectivamente, contribui para cicatrização de feridas (BEKESCHUS et al., 2016),
 19 procedimentos cirúrgicos (KEIDAR et al., 2013), de reparação dentária (ISBARY ey
 20 al., 2014), e em endoscopias (ROBERT et al., 2013); já na pesquisa experimental, o
 21 plasma destaca-se em tratamentos experimentais para tumores, onde foi possível

1 observar certa capacidade de seletividade, principalmente no que diz respeito a
2 atuação distinta em células tumorais e em células saudáveis e normais; os
3 mecanismos envolvidos nessa seletividade, entretanto, ainda não compreendidos
4 completamente (BEKESCHUS et al., 2019). Este plasma pode ser sintetizado de duas
5 formas: através do uso de equipamentos com descargas de barreira dielétrica (DBD)
6 que geram plasma com o ar atmosférico; ou através de equipamentos *jet pen plasma*,
7 que se utilizam da ionização de gases nobres ou inertes, misturando-se aos
8 componentes do ar atmosférico, para gerar o plasma (PRIVAT-MALDONADO et al.,
9 2019).

10 *A jet pen plasm*, um equipamento próprio para ionização de gases
11 como Argônio, Hélio e Nitrogênio, induz a fissão homolítica de moléculas do gás, um
12 processo que leva à formação de radicais livres, altamente instáveis (LEDUC et al.,
13 2009); além deles, íons positivos, negativos, partículas neutras e espécies reativas de
14 oxigênio e nitrogênio, de meia vida longa, também são produzidos a medida que as
15 moléculas ionizadas do gás reagem com as do ar (JO et al., 2015; BEKESCHUS et
16 al., 2016). É este plasma frio sintetizado pelas *jet pen plasm* que figura como novidade
17 no tratamento de carcinomas, por ser considerado uma terapia menos invasiva,
18 específica, que não danifica o tecido adjacente, nem provoca necrose em células
19 saudáveis (WANG et al., 2013).

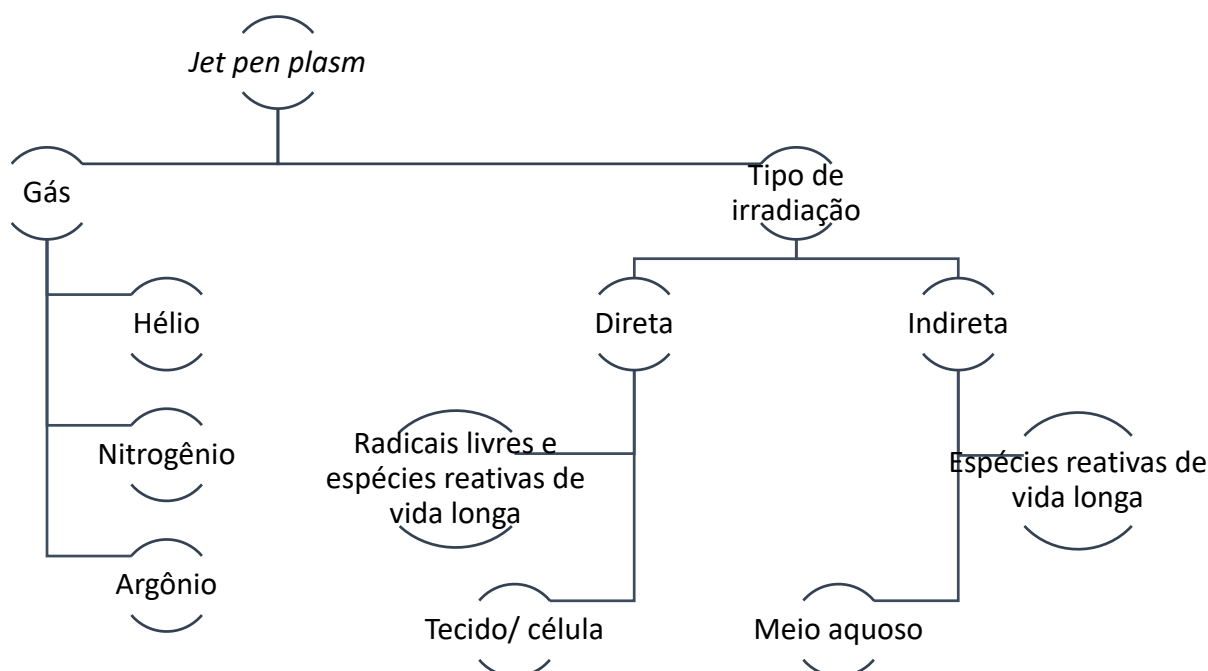
20 O objetivo deste plasma como terapia não é desnaturar o tecido, mas
21 operar abaixo do limiar de dano térmico e induzir resposta ou modificação
22 quimicamente específicas, focando principalmente no efeito das espécies reativas e
23 radicais livres gerados pelo plasma e nas alterações provocadas por elas nas células
24 tumorais (BEKESCHUS et al., 2013). As reações químicas podem ser promovidas
25 ajustando a pressão, a composição do gás e a potência (BISCOP et al., 2019). O uso
26 de gases nobres são preferíveis nos aparelhos como a *kiNPen jet plasma*, pois
27 contribuem para otimização das condições do plasma físico, como fluxo, estabilização
28 da velocidade, constância, difusão e produção de espécies reativas, como apontado
29 por Reuter; Woedtke & Weltmann (2018), que também apontaram o gás argônio como
30 fonte da fase gasosa, ao lado do gás hélio. O gás Argônio já é bem estabelecido para
31 outros procedimentos aplicados na biomedicina. Ele já é utilizado em humanos, e
32 segundo Chen e colaboradores (2016) apresentou os melhores resultados quando
33 comparado aos outros gases, no âmbito de terapia para modelos neoplásico.

34 Com equipamentos indutores de plasma frio, como a *kiNPen jet*

1 *plasma*, é possível irradiar amostras de diferentes formas, levando a reações e efeitos
2 distintos dependendo do procedimento. Segundo Keidar e colaboradores (2013)
3 existem, no geral, três tipos de irradiação, que consideram o mecanismo gerador e o
4 de aplicação do plasma atmosférico frio: diretos, indiretos e híbridos. Em pesquisas
5 do âmbito terapêutico, os ensaios experimentais utilizam-se principalmente da
6 irradiação direta ou da indireta. O tipo de irradiação direta utiliza-se do tecido vivo
7 como parte do sistema de formação e condução do plasma; é necessário que a
8 corrente de condução obedeça a um *range* específico para evitar efeitos térmicos ou
9 estimulação elétrica do tecido, como os músculos, por exemplo, neste caso a amostra
10 é diretamente irradiada com o plasma, seja ela um tecido ou uma linhagem celular
11 (KEIDAR, 2015). Na irradiação direta, os efeitos observados são provocados
12 diretamente pelos componentes do plasma, como radicais livres e espécies reativas
13 tanto de meia vida curta quanto as de vida longa (VON WOEDTKE et al., 2019).

14 Na irradiação indireta há um sistema de geração de plasma frio, em
15 aparelhos como *jet pen plasma*, que incidem sobre um líquido (KEIDAR, 2013). Este
16 meio aquoso, com o qual o tecido ou as células serão tratados com o plasma, pode
17 ser, por exemplo, a salina ou meio de cultura. Neste caso, os efeitos observados são
18 provenientes: das espécies reativas de vida longa, que permanecem no meio após a
19 irradiação; e dos produtos da interação dos compostos presentes no plasma com os
20 do meio de cultura (BISCOP et al., 2019). É por meio da irradiação indireta que se
21 analisa os efeitos produzidos pelas espécies reativas de longa vida, as únicas
22 presentes nos líquidos irradiados (KURAKE et al., 2016; TANAKA et al., 2018). A
23 irradiação indireta também aumenta o alcance da terapia com plasma frio, pois o
24 líquido pode ir onde a irradiação direta é impossibilitada (PEREIRA et al., 2019).
25 Nesses casos, a composição do líquido pode interferir no que é produzido, como a
26 composição do meio de cultura por exemplo, porém já se sabe que o peróxido de
27 hidrogênio e espécies reativas de nitrogênio estão presentes e permanecem nos
28 líquidos irradiados (BISCOP et al., 2019).

1 A eliminação de células tumorais sem afetar as células normais,



2 mesmo a longo prazo, em pesquisas *in vitro*, é uma conquista importante do
 3 tratamento com plasma, mesmo que ainda não completamente compreendida,
 4 (KAUSHIK et al., 2015). Considerando que o mecanismo pelo qual o plasma frio/
 5 atmosférico age seja a indução de um desbalanço redox, levando à morte celular,
 6 alguns autores consideram que a dinâmica desta indução em células tumorais se dê
 7 mais facilmente que em células normais, visto que as primeiras já estão sob uma
 8 condição muito estressante, o que as deixaria vulneráveis à terapia (BISCOP et al.,
 9 2019). Entretanto, outros autores questionam essa hipótese, visto que diversos
 10 tumores já demonstraram que possuem altos níveis de antioxidantes, como fator
 11 essencial para sobrevivência (CAIRNS et al., 2011). Outras hipóteses também foram
 12 propostas, todas com base na ação de espécies reativas e produtos de interação com
 13 meio de cultura, mas a especificidade da terapia com plasma, no câncer, ainda não é
 14 certa. Os efeitos em células tumorais, tanto em modelos *in vitro*, quanto em modelos
 15 *in vivo* de diversos tumores, já o classificam como potencial tratamento para cânceres,
 16 mostrando efeitos tanto na viabilidade, quanto no tamanho do tumor (KEIDAR et al.,
 17 2013).

18 Considerando que os principais produtos da irradiação com plasma,
 19 seja direta ou indireta, são as espécies reativas e os radicais livres, devemos
 20 considerá-los como os responsáveis pelos efeitos provocados pelos sistemas
 21 sintetizadores de plasma, como as *jet pen plasm*. Diversos trabalhos mostram efeitos

1 como: o aumento no dano à membrana das células tumorais, devido à lipoperoxidação
2 por exemplo, desencadeada por espécies reativas que reagem com os ácidos graxos
3 da membrana (TANAKA et al., 2015; FURUTA et al., 2017); dano e modificações no
4 DNA e proteínas também são reportados por diversos trabalhos (ADHIKARI &
5 PTASINSKA, 2016; RAY et al., 2017; KURITA et al., 2020); e alterações em vias de
6 sinalização, nas quais radicais livres e espécies reativas desempenham papéis
7 modulatórios (TANAKA et al., 2014; PASQUAL-MELO et al., 2018). Outros efeitos são
8 relatados, como maior dano mitocondrial e indução de apoptose em células tumorais
9 por meio da ativação da proteína p53, e de alterações em Bax e Bcl-2 (KIM et al.,
10 2010; SAADATI et al., 2018), ou através dos efeitos produzidos pelo peróxido de
11 hidrogênio, levando as células tumorais não só à apoptose, como também induzem a
12 quebra de dupla fita do DNA (MA et al., 2017). A diminuição da migração de células
13 tumorais (RECEK et al., 2015; PRANDA et al., 2020), diminuição do tamanho do tumor
14 (JUDEE et al., 2016) e efetividade anti-tumoral em carcinomas difíceis de tratar como
15 os osteosarcomas (CANAL et al., 2017), incrementam os alvos terapêuticos que a
16 terapia com plasma pode atuar. Como apontado por Tanaka e colaboradores (2018),
17 o plasma direto fica restrito ao uso em superfícies, como a pele e outros tecidos duros,
18 atingindo até cerca de 3 ou 4 camadas de células, entretanto para outros tipos de
19 cânceres, principalmente aqueles profundos, que ultrapassam esse limite de
20 camadas, ou estão em locais de risco e/ou difícil acesso, o uso do plasma indireto
21 representa uma importante e eficaz ferramenta, capaz de percorrer outros locais do
22 corpo.

1 2 JUSTIFICATIVA

2 O carcinoma papilífero de tireoide compreende cerca de 80% dos
3 casos de carcinoma de tireoide, uma das neoplasias que mais cresce em número de
4 diagnósticos no mundo. O entendimento dos efeitos de espécies reativas (ER) sobre
5 a viabilidade, proliferação e estado redox das células tumorais da tireoide auxilia na
6 compreensão de diferentes respostas, quando submetidas a diferentes cenários,
7 envolvendo o estresse oxidativo. É partindo desse ponto, que terapias baseadas na
8 indução de estresse oxidativo em células tumorais podem tornar-se acessíveis para
9 carcinomas papilíferos de tireoide, atuando como terapias únicas, ou mesmo como
10 adjuvantes.

11 O tratamento com plasma físico frio, um potente produtor de ER, que
12 vem sendo estudado no tratamento de vários tipos de tumores, apresenta vantagens
13 como: possibilidade de aplicação diretamente no tecido, quando de fácil acesso,
14 irradiando radicais livres, de vida curta e espécies reativas de vida curta e longa; em
15 locais de maior dificuldade a terapia também é possível por meio da irradiação indireta,
16 igualmente eficiente indutora de ER, principalmente de longa vida, tanto de oxigênio
17 quanto de nitrogênio. A literatura já demonstra que a terapia com plasma físico frio
18 afeta células tumorais, podendo induzi-las à perda de viabilidade, à degradação de
19 DNA e até à morte celular, como a apoptose. Em especial, essa terapia tem mostrado
20 efeitos preferencialmente no tecido tumoral, pouco afetando ou não afetando o tecido
21 normal.

22 Em CPT, apenas uma linhagem foi investigada no âmbito da terapia
23 com plasma físico frio, a BCPAP, mostrando a carência de estudos com esse potencial
24 instrumento terapêutico em CPT. A linhagem K1 de carcinoma papilífero de tireoide
25 está entre as linhagens de carcinoma tireoidiano com menor número de pesquisas
26 que discutem sua interação com ER. Dessa forma, a utilização da K1 para estudar o
27 efeito do tratamento com plasma físico frio não apenas auxiliará na compreensão do
28 comportamento de CPT frente a exposição a diferentes ER, como também servirá
29 como base para a investigação de novas estratégias terapêutico.

1 3 OBJETIVOS

2 3.1 OBJETIVO GERAL

3 Compreender os efeitos da irradiação indireta com plasma físico frio
4 sobre o balanço redox e a viabilidade de células K1.

5 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

6 3.2.1 Comparar alterações no balanço redox das células K1, induzidas pelo
7 tratamento com plasma frio atmosférico com argônio em diferentes tempos de
8 irradiação, e se estas alterações influenciam a viabilidade celular;

9 3.2.2 Estabelecer os efeitos de espécies reativas específicas de longa vida
10 produzidas pelo tratamento indireto com plasma frio atmosférico com argônio, sobre
11 as células K1, compreendendo os efeitos de cada uma delas.

1 **4 ARTIGO**

2

3

4

5

6

7 RESPOSTA OXIDATIVA E VIABILIDADE DA CÉLULA DE CARCINOMA
8 PAPILÍFERO DE TIREOIDE K1, APÓS TRATAMENTO INDIRETO COM PLASMA
9 FÍSICO FRIO

10

11

12 OXIDATIVE RESPONSE AND VIABILITY OF THE THYROID
13 PAPILLARY CARCINOMA CELL K1, AFTER INDIRECT TREATMENT WITH COLD
14 PHYSICAL PLASMA

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

1 **OXIDATIVE RESPONSE AND VIABILITY OF THE THYROID PAPILLARY**
2 **CARCINOMA CELL K1, AFTER INDIRECT TREATMENT WITH COLD**
3 **PHYSICAL PLASMA**

4
5 Hannah Hamada Mendonça Lens¹; Natália Medeiros Dias Lopes¹; Poliana Camila Marinello¹;
6 Gabriella Pasqual-Melo²; Sander Bekeschus²; Alessandra Lourenço Cecchini¹; Rodrigo Cabral
7 Luiz¹; Rubens Cecchini³.

8
9 ¹Molecular Pathology Laboratory, Department of Pathological Sciences, Universidade Estadual
10 de Londrina, Londrina, Brazil;

11 ²Institute for Plasma Science and Technology (INP Greifswald)- Leibniz, ZIK plasmatic,
12 Greifswald, Germany;

13 ³Pathophysiology Laboratory of Free Radicals, Departamento f Pathological Sciences,
14 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil.

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28 **Corresponding author:**

29 Alessandra Lourenço Cecchini Armani

30 Laboratory of Molecular Pathology

31 Department of Pathological Sciences

32 Londrina State University

33 E-mail: alcecchini@uel.br

34 86051- 990 Londrina, Brazil

1

ABSTRACT

2 Thyroid carcinoma is considered the most common type of endocrine cancer and one of the
3 fastest growing neoplasms in number of diagnoses. The incidence increases each year, with
4 papillary thyroid carcinoma (PTC) being the most prevalent type. K1, unlike other lineage, has
5 a BRAF mutation (V600E), which represents most cases of PTC, and active p53 protein,
6 culminating in a single lineage of thyroid carcinoma. The PTC-K1 cell line is one of the lines
7 that has the least number of studies that discuss its interaction with reactive species (RS), little
8 is known about it in this scenario. The effect of RS on tumor cells can play both a pro and anti-
9 tumor role, justifying the need to investigate the behavior of carcinomas against reactive
10 species. This work aimed to understand the effects of indirect treatment with atmospheric cold
11 argon plasma, a mixed RS generator, on K1. This physical plasma is a potent producer of RS,
12 mainly hydrogen peroxide and reactive nitrogen species (RNS). The behavior of K1 with
13 indirect plasma therapy and with each of these species was evaluated by characterizing both the
14 viability and the redox balance of PTC cells. The irradiation times (30, 60 and 120 seconds)
15 with atmospheric cold plasma, affected K1 in order to decrease its viability, especially the time
16 of 120 seconds ($p < 0,0001$), and significantly increase the stress suffered ($p < 0,0001$) at all
17 times. The results also showed that only high concentrations of hydrogen peroxide ($1800\mu\text{M}$)
18 and sodium nitroprusside (RNA donor) ($400\mu\text{M}$), were able to affect the K1 cell alone, showing
19 significant decreases ($p < 0,05$) in the parameters of viability, both proliferative and metabolic,
20 and oxidative stress suffered by cells ($p < 0,05$). It is possible to conclude, therefore, that the K1
21 lineage suffers a decrease in cell viability and an increase in oxidative stress with indirect
22 treatment with cold plasma, especially in the longer irradiation time (120 seconds), giving cold
23 physical plasma a new therapeutic possibility. Hydrogen peroxide and RNA also affect the cell,
24 in isolation, mainly in high concentrations.

25

26 Key-words: PTC. Thyroid. Reactive species. Hydrogen peroxide. Cold physical plasma.

1 INTRODUCTION

2 Among the neoplasms that affect the endocrine system, we can highlight
3 thyroid cancer (SAPUPPO et al., 2018). There are four types of thyroid carcinoma, which can
4 be divided mainly according to morphological aspects: papillary, follicular, medullary
5 and anaplastic (TUTTLE et al., 2014). The most incident type is the papillary, covering about
6 80% of diagnosed cases (BONGIOVANNI et al., 2017). Its epithelium is characterized by
7 follicular cells, organized in the form of papillae, similar to the morphology of the tongue's taste
8 buds (KUMAR, 2010), have slow growth, but with recurrence considered high
9 (30%). According to the American Thyroid Association (ATA), the factors that can contribute
10 to the recurrence are: vascular invasion, multifocality, number and size of cervical lymph nodes
11 with metastasis and capsular invasion.

12 The K1 is a lineage of papillary thyroid carcinoma, described and used for the
13 first time by Wyllie and collaborators (1995), the human lineage
14 of papillary thyroid carcinoma K1 has a heterozygous mutation in the BRAF gene (V600),
15 representing a specific lineage for studies in papillary carcinomas of the BRAF
16 type. Cytogenetics information about the new lineage, however, were only characterized later,
17 by Ribeiro and collaborators (2008), who showed that K1 resembles another lineage
18 of papillary carcinoma, the GLAG-66, a lineage that comes from PTC's metastatic tumor. The
19 authors stated that considering the cytogenetic scenario, K1 is actually a tetraploid
20 subpopulation of GLAG-66. This lineage is similar to papillary carcinomas with heterozygous
21 mutation in PI3KCA, in addition to BRAF, which have normal active p53 and polymorphisms
22 in the EGRF gene (MEIRELES et al., 2007). It is a lineage considered to be well differentiated,
23 as it still retains the differentiation of thyroid follicular cells, such as thyroglobulin synthesis.

24 The presence of an exacerbated amount of reactive species has been described
25 in various tumors (OBRADOR et al., 2019; CARINI et al., 2017; THOM et al., 2017; HECHT
26 et al., 2016). But in addition, these increased levels of reactive oxygen species (ROS) would be
27 also the source of damage, either to the cell or to the tissue; considering that this perspective
28 also applies to tumor cells, the reactive species (RS) are considered important tools for
29 instituting new therapies against tumor, because they have versatility in terms of action in
30 signaling pathways, gene activation and are closely linked with cellular homeostasis. The
31 therapeutic effect of reactive species, and oxidative stress, is mainly reported in the use of certain
32 chemotherapeutic agents (YANG et al., 2018), in radiotherapy (ZHANG; MARTIN, 2014) and in
33 immunotherapy (ZOU et al., 2017), that can increase the intracellular level of ROS or can be the
34 donors of those RS themselves.

35 Reactive species, such as oxygen and nitrogen species (ROS; RNS), are part
36 of the composition of cold plasma, a proposal for tumor therapies. Plasma is the fourth physical
37 state of matter, a gas that receives enough energy to excite external electrons and promote their

1 ionization (BURM, 2012). Physical plasma is formed by a set of free atoms, electrons and ions,
2 in a distribution in which the number of positive and negative particles is practically equal, this
3 dense set of atoms has a collective behavior and is electrically conductive (FRIDMAN et al.,
4 2008). Cold or atmospheric physical plasma does not have a thermodynamic balance, resulting
5 in different temperatures for each particle, however it is thanks to the structure of the generating
6 equipment that the temperature of the plasma itself remains below 40 ° C (FRIDMAN et al.,
7 2008). Due to its thermal characteristics, this plasma is widely used in the experimental field as
8 tumor therapy. The jet pen plasm, equipment for ionizing gases such as Argon, Helium and
9 Nitrogen, induces the homolytic fission of gas molecules, which leads to the formation of highly
10 unstable free radicals, such as ROS and RNS of long and half-life, positive and ions negatives
11 and neutral particles (JO et al., 2015; BEKESCHUS et al., 2016). The irradiation can be done
12 directly or indirectly; in indirect irradiation, there is a system for generating cold plasma, in
13 devices such as the plasma jet pen, which radiates a liquid (KEIDAR, 2013). This aqueous
14 medium can be, for example, saline or culture medium (BISCOP et al., 2019).

15 The use of cold physical plasma in the area of cancer treatment, involves the
16 action of these mixed reactive species and the changes in the redox balance induced by them.
17 It is considered a less invasive, specific therapy, which does not damage the adjacent tissue, nor
18 causes necrosis in healthy cells (WANG et al., 2013). In indirect treatment, the cold physical
19 plasma can be irradiated in the culture medium and thereby produce, in addition to RS, other
20 molecules that are in contact with the cell. The main responsible for the cytotoxic and genotoxic
21 effects of cancer treatments with indirect cold physical plasma, *in vitro*, are hydrogen peroxide,
22 nitrite and nitrate (produced from NO) (GRISSETI; MERBAHI; GOLZIO, 2020). Cold physical
23 plasma is rated as a new therapy for tumors, showing effects such as decreased incidence of
24 metastases, tumor size, cell migration speed and induction of apoptosis in tumor cells (KEIDAR
25 et al., 2011).

26 Both in the effect on the redox balance and the therapeutic use of reactive
27 species, as is the case with cold physical plasma, the K1 lineage needs studies, even though it
28 represents a group as important as PTC, and possessing its important characteristics, which
29 contribute to investigate the most incident type of thyroid carcinoma in the oxidative stress
30 scene. In this work, therefore, we sought to verify the changes in the redox balance of K1 cells,
31 induced by treatment with atmospheric cold plasma with argon at different irradiation times,
32 whether these changes influence cell viability and the effects of long-lived reactive species,
33 produced in indirect treatment with atmospheric cold plasma with argon, in K1 cells, alluding
34 to the long-term effects of plasma in papillary thyroid carcinoma cells.

35

1 METHODOLOGY

2 CELL CULTURE

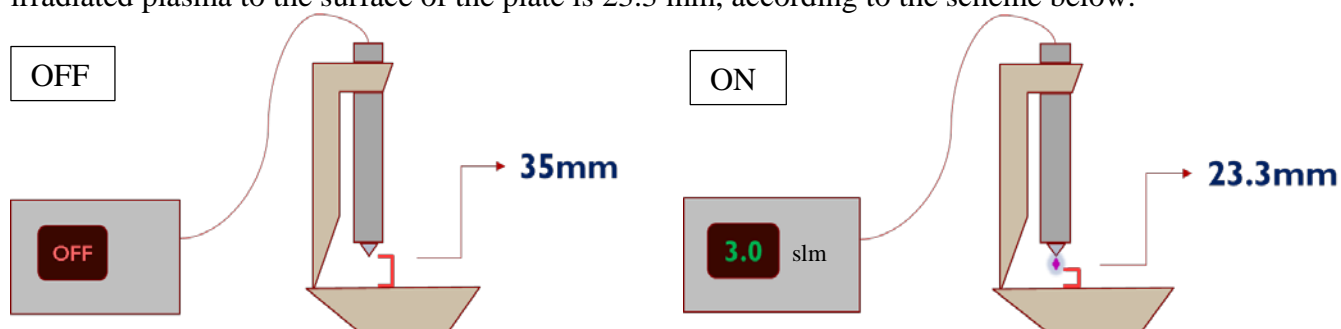
3 The cell lineage of papillary thyroid carcinoma used was K1
4 (ECACC ® 92030501). The cells were cultured in DMEM medium supplemented with Ham's
5 F12:MCDB 105, 2mM Glutamine and 10% Bovine Fetal Serum (BFS), following the
6 manufacturer's instructions, and kept at 37°C in a humidified incubator containing 5% of CO₂
7 (Sanyo CO₂ Incubator ; Sanyo, Kitanagoya, Aichi). The K1 is an adherent lineage and
8 therefore, its cultivation took place in small cell culture bottles (25 cm²).

9 EXPERIMENTAL SKETCH

10 The treatments to which the K1 lineage was submitted were: a) irradiation
11 with cold plasma; b) hydrogen peroxide; c) sodium nitroprusside (SNP). For each of these
12 treatments, a concentration curve or irradiation time were made to establish which would be the
13 best to be worked on in the following tests. The control for all treatments was performed with
14 the administration of only normal K1 culture medium.

15 Cold plasma irradiation

16 The plasma generating equipment used for irradiation was kINPen ®IND
17 (Neoplas), with argon gas as a pure gas phase for the production of cold plasma, which was set
18 to 3.0 slm (standart liters per minut), the specific dosage used by the gas, which is sufficient for
19 plasma production by the kINPen ®IND device (BISCOP et al., 2019; WEISS et al., 2019;
20 BUNDSHERER et al., 2013). The distance from the pen tip of the device, when turned off, to
21 the sample support surface, is 35 mm, and when turned on, the distance from the end of the
22 irradiated plasma to the surface of the plate is 23.3 mm, according to the scheme below.



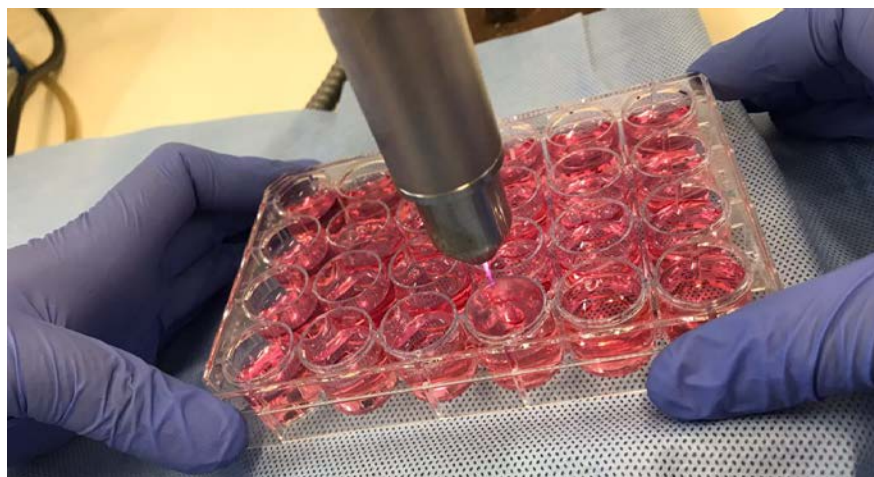
23

24

25 Figure 1: Illustrative image of the surface x plasma distances.

26

1 The treatment with irradiated plasma was performed indirectly, where only
2 the K1 lineage culture medium (DMEM; Hams F12; MCDB) came into contact with the
3 plasma. The culture medium was irradiated at different times with plasma, where each well was
4 in contact with the plasma for a specific time. The stipulated times were: 30 seconds (30s), 60
5 seconds (60s) and 120 seconds (120s), which have already been shown to be effective in other
6 types of plasma-treated cancers (WEISS et al., 2019; BEKESHUS et al., 2019; CHEN et al.,
7 2016).



9
10 Figure 2: Irradiation of the well with culture medium.

11 In each well, 1.4 ml of culture medium was placed for irradiation, and after
12 the procedure, only 1 ml of this volume is used for the treatment in question. In another plate,
13 the cells were cultured at a concentration of 2×10^5 ; after 24h, the medium was removed and
14 replaced with irradiated culture medium (1ml). For each time (30s, 60s and 120s), triplicates of
15 the treatment were performed. The control consists of a normal culture medium, without being
16 irradiated.

17 Hydrogen peroxide

18 The main products of irradiation in culture medium with plasma are long-
19 lived reactive species, such as hydrogen peroxide. For the treatment with hydrogen peroxide, a
20 concentration curve was performed with the peroxide diluted in culture medium for 24 hours,
21 in order to observe the cell viability behavior in face of the increasing stress induced by the
22 reactive species. From the results obtained in viability parameters, a concentration was
23 established at which the cell reached approximately the IC50, to carry out the oxidative and
24 antioxidant parameter tests.

1 The viability tests were performed on plates of 24 wells. After mounting the
2 plate, in which the cells were in the concentration: 2×10^5 , it was expected that 80% of
3 confluence would be reached in the well to perform the treatment with hydrogen peroxide,
4 which is diluted in culture medium in the well to achieve the desired concentration. MTT
5 and Trypan Blue tests were performed after 24 hours.

6 For the tests of oxidant and antioxidant parameters, the treatment was
7 carried out in culture bottles, in which the cells were in the concentration of 1×10^6 grown in 5
8 ml of culture medium. The concentration of hydrogen peroxide selected was $1800\mu\text{M}$, diluted
9 in 5ml. The cells were under treatment for 24 hours, and after that period, they
10 were trypsinized from the bottle, inactivated with culture medium and centrifuged at 600G, for
11 5 minutes, at 24°C ; the supernatant was discarded and the remaining pellet
12 was resuspended with PBS; the cells were counted in a Neubauer chamber and corrected to $1 \times$
13 10^6 in PBS, to undergo the process of cell lysis .

14 Sodium Nitroprusside

15 For the treatment with sodium nitroprusside (SNP), a concentration curve
16 was performed, with culture medium with SNP in the experimental concentrations, for 24 hours,
17 in order to observe the cell viability behavior in face of the increasing stress induced by the
18 reactive nitrogen species donor. From the results obtained in viability parameters, the highest
19 concentration was established, with which a certain influence on cell viability was observed, to
20 carry out tests of oxidative and antioxidant parameters.

21 Feasibility tests were performed on 24 well plates. After the assembly of the
22 plate, in which the cells were in the concentration: 2×10^5 , it was expected that 80% of
23 confluence would be reached in the well to carry out the treatment with SNP, which is diluted
24 in culture medium in the well to achieve the desired concentration. MTT
25 and Trypan Blue tests were performed after 24 hours.

26 For the tests of oxidant and antioxidant parameters, the treatment was
27 carried out in culture bottles, in which the cells were at a concentration of 1×10^6 , grown in 5
28 ml of culture medium. The SNP concentration selected was $400\mu\text{M}$, diluted in 5ml. The cells
29 were under treatment for 24 hours, and after that period, they were trypsinized from the bottle,
30 inactivated with culture medium and centrifuged at 600G, for 5 minutes, at 24°C ; the
31 supernatant was discarded and the remaining pellet was resuspended with PBS; the cells were

1 counted in a Neubauer chamber and corrected to 1×10^6 in PBS, to undergo the process
2 of cell lysis .

3 CELL VIABILITY

4 In order to establish the best concentrations of treatments and the best
5 irradiation time, as well as to verify the influence of treatments on cell viability, proliferation
6 parameters, % of non-viable cells and mitochondrial activity- by means of MTT- were used.

7 Cell count - Trypan Blue

8 The trypan exclusion test (0.05%), described by Tolnai (1975), uses Neubauer
9 chamber counting. The cells will be classified as viable (without staining) and not viable (blue
10 staining) to determine the percentage of viable cells, and concomitantly the proportion of non-
11 viable cells.

12 K1 cells were trypsinized from their bottles, counted in a Neubauer chamber,
13 and corrected to a concentration of 2×10^5 . In a 24-well plate was added 500 μ l of the cell
14 solution in the previous concentration. After treatment, the cells were removed from the wells
15 and placed in eppendorfs, being centrifuged soon after. The formed pellet was resuspended with
16 200 μ l of medium. The cells were counted through the Neubauer chamber, 1:1
17 with Trypan Blue (0.05%), in total number and number of non-viable cells (blue ones).

18 MTT

19 The MTT assay ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
20 bromide]) described by Mosmann (1983) has the principle of evaluating the mitochondrial
21 metabolic activity of cells based on the ability of the viable cells in converting the compound
22 “2- (3,5-diphenyltetrazol-2-ium-2-yl) -4,5-dimethyl-1,3-thiazole bromide”- MTT (Sigma-
23 AldrichTM, St. Louis, MO, USA) in formazan, a purple colored crystal.

24 The K1 cells were trypsinized from their bottles, counted in a Neubauer
25 chamber, and corrected to a concentration of 2×10^5 . In a 24-well plate was added 500 μ l of cell
26 solution in the previous concentration. After the treatment, the MTT is incubated with the cells
27 and, after 40 minutes, DMSO was placed, for the formazan to solubilize and enable reading by
28 spectrophotometry at 570 nm.

1 CELL LYSIS

2 For the following tests (Chemiluminescence and TRAP), the cells must
3 be lysed, as mentioned previously. The cell lysis process was carried out by freezing with
4 nitrogen and thawing with a water bath at 30-37°C. This process was repeated for 3 cycles,
5 therefore, cell lysis occurred through the thermal shock suffered by aliquoted cells in
6 cryotubes at 1×10^6 . At the end of the 3 cycles, the cells were centrifuged at 1000G for 5
7 minutes at 4°C. After all preparation, the samples were ready for use.

8

9 MEASUREMENT OF TERT-BUTYL HYDROPEROXIDE-INITIATED ANT CHEMILUMINESCENCE

10 This assay, described by Gonzalez-Flecha, Llesuy and Boveris, (1991),
11 contributes to the analysis of the effect of reactive species on cells, verifying whether there is
12 induction of damage to the membrane, as would occur in the case of lipoperoxidation. This
13 analysis is based on the induction of lipoperoxidation by tert-butyl hydroperoxide, that
14 when incubated with the cell, forms peroxy radical, which interacts with membrane lipids,
15 inducing and propagating the oxidative event. The detection of lipoperoxidation through the
16 emission of photons by a chemical system, characterizes the stress suffered in the treated cell,
17 showing whether it has higher or lower levels of lipoperoxidation, which may vary according
18 to the effects of the free radicals present, or the antioxidant potential presented in the sample.

19 For the technique, were used: solution of tert-butyl hydroperoxide (6mM),
20 monobasic phosphate buffer (10mM), solution of Hemine (1mM) and cell suspension
21 (concentration of 1×10^6 cells). The readings were performed in a luminometer (GloMax® 20/20
22 Luminometer- Promega), for 20 minutes (1 reading per second). The test was carried out in an
23 environment at 30°C and with Glycine buffer at 37°C.

24 TOTAL RADICAL ANTIOXIDANT POTENTIAL (TRAP)

25 The evaluation of the total antioxidant capacity (TRAP- Total radical
26 antioxidant potential) was determined as described by Repetto et al. (1996) adapted to cells.
27 This technique evaluates the levels of total antioxidants in a sample, especially soluble
28 antioxidants. The ABAP [2,2-azo-bis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride], a system
29 that generates an alkoxy radical by thermal decomposition, produces photons that are amplified
30 by luminol and measured in a luminometer. The addition of antioxidants inhibits the emission

1 for a determined time. The results obtained from the samples refer to the quantity and capacity
2 of the present antioxidants in delaying the effects of ABAP; these are compared to a known
3 antioxidant, Trolox , a vitamin E analogue.

4 For this test were used: Glycine buffer (0.1M) pH 8.6; ABAP solution
5 (200mM); Luminol solution (215 μ M); Trolox solution (0.025mM) and cell suspension
6 (concentration of 1×10^6 cells). The readings were performed in a luminometer (GloMax[®] 20/20
7 Luminometer- Promega), 5 readings per second. The result is expressed in μ M of Trolox. For
8 the standard, readings of ABAP and Trolox are taken without samples.

9 STATISTIC

10 All analyzes were performed in triplicates. Statistical analysis were made using
11 the GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA), Microsoft Office Excel
12 2007 and OriginLab software 8.0. The normality test used was D' Agostin & Pearson. For
13 parametric data, ($\alpha=0.05$), the analysis of variance was One-Way ANOVA,
14 with Tukey's test as *post-hoc*, multiple comparisons, and the results were expressed as mean \pm
15 standard error of the mean (SEM). For nonparametric data, ($\alpha=0.1$), the analysis of variance
16 was Kruskal-Wallis, with Dunn's test as *post-hoc*, multiple comparisons, and the results were
17 expressed as minimum and maximum in box-plot. For the lipoperoxidation curves, Two-Way
18 ANOVA was used as analysis of variance with Tukey's test as *post-hoc* and the results were
19 expressed with only the mean. Differences were considered statistically signi

1 RESULTS

2 CELL VIABILITY

3 Proliferation and percentage of non-viable cells

4 The Trypan blue assay provides two parameters: proliferation and proportion
5 of unviable cells. This test was carried out in all groups: control (K1), K1 + irradiation with
6 cold plasma, K1 + hydrogen peroxide and K1 + sodium nitroprusside. As shown in figures 1A
7 and 1B, plasma irradiation, a system that generates reactive species, affected the levels of cell
8 proliferation and % of non-viable cells.

9 The hydrogen peroxide in highest concentrations, significantly decreases the
10 level of cell proliferation in relation to the control, as observed in figure 1C, and increased the
11 percentage of non-viable cells, as showed in figure 1D. The SNP on the other hand, showed
12 dose-response both in proliferation as in the proportion of non-viable cells, as seen in figure 1E
13 and figure 1F.

14 Metabolic activity

15 The MTT assay on the other hand, showed another parameter of viability, the
16 metabolic activity in relation to the control. In all experimental groups (irradiation with plasma,
17 hydrogen peroxide and SNP), there was a dose-dependent decrease in metabolic activity.

18 ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS

19 The curves of the chemiluminescence test with tert-butyl hydroperoxide (CL),
20 showed an increase in the readings of relative luminescence units (RLU) in all irradiation times
21 when compared to the control, however, the pattern of the curves was higher in the times of
22 irradiation 30 and 60 seconds (figure 3A). For the CL of hydrogen peroxide and sodium
23 nitroprusside, only one concentration of each treatment was used: 1800 μ M and 400 μ M
24 respectively, their curves were plotted together to visualize the general effect of the treatments
25 considering the lineage K1 (figure 3B).

1 EVALUATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY

2 The evaluation of the total antioxidant capacity (TRAP) of the cells, shows
3 the amount of total antioxidants present in the samples, both the natural production of the cells
4 themselves, as in the treated cells. The results obtained with plasma irradiation (figure 4A) show
5 increasing of the lecture at the highest irradiation time, 120 seconds. The data obtained with the
6 TRAP assay for the treatments with hydrogen peroxide (1800 μ M) and SNP (400 μ M) (figure
7 4B) showed that the SNP induced a significant decrease in the total antioxidant capacity of the
8 K1 lineage ($p < 0.005$)

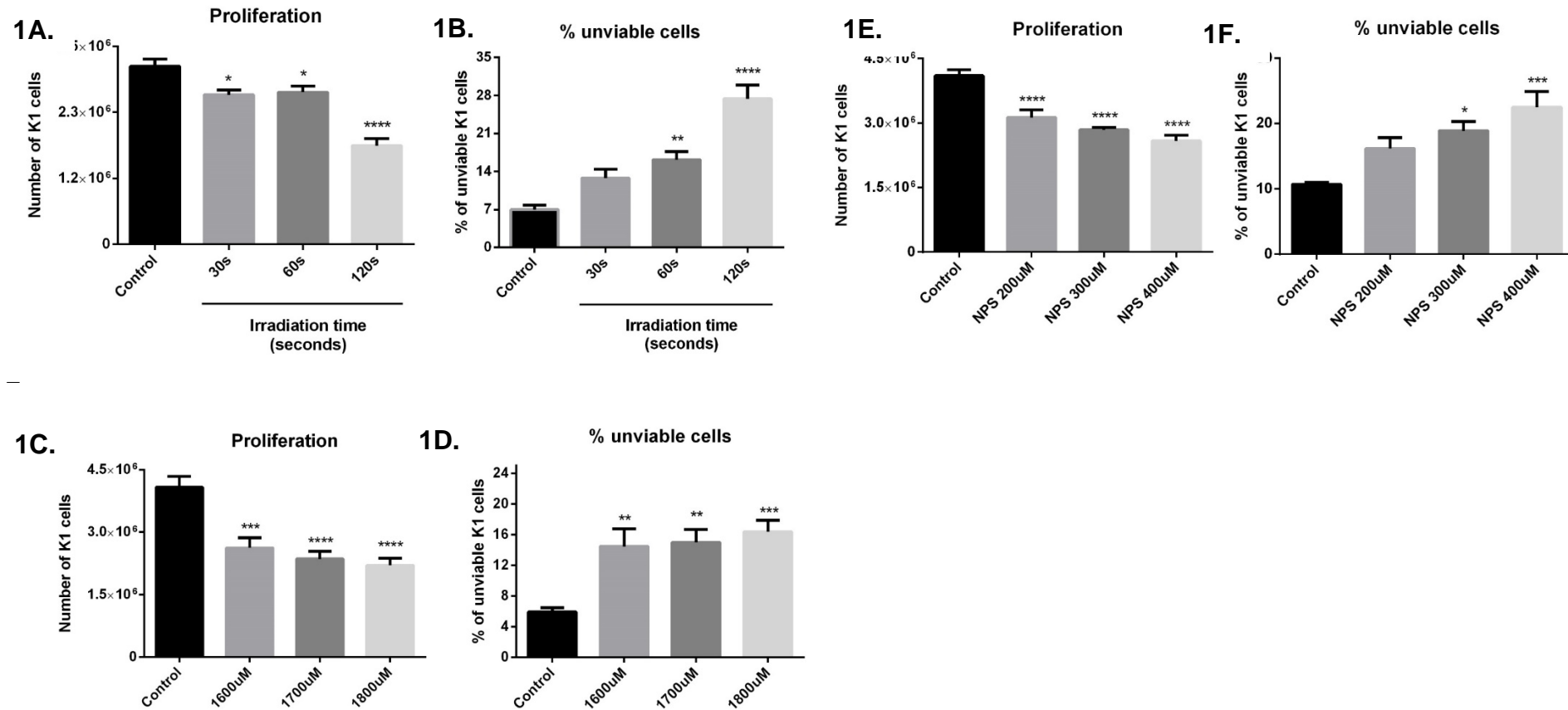


Figure 1: Feasibility tests: proliferation (A, C and E) and % of non-viable cells (B, D and F) - Trypan blue. The graphs show the results with the Trypan Blue technique, from K1 in the experimental groups: hydrogen peroxide, sodium nitroprusside (SNP) and cold plasma, in different concentrations or irradiation times. Results are expressed in histograms, representing mean \pm standard error. (n=12) (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.005$; (***) $p < 0.0005$; (****) $p < 0.0001$, compared to Control (K1).

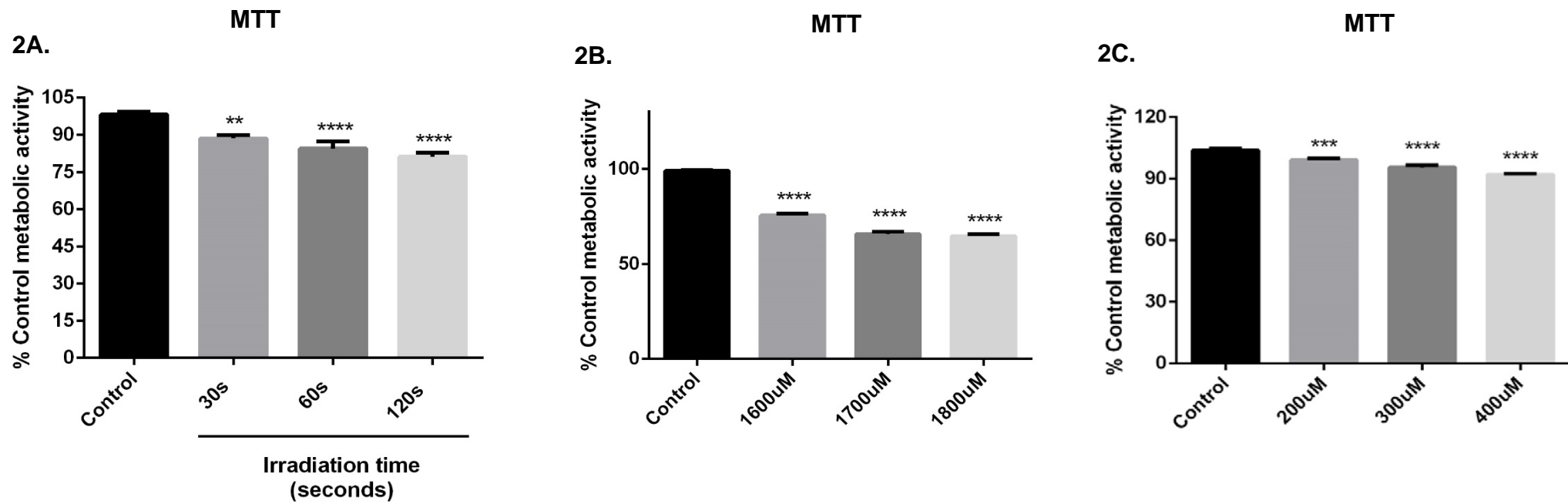
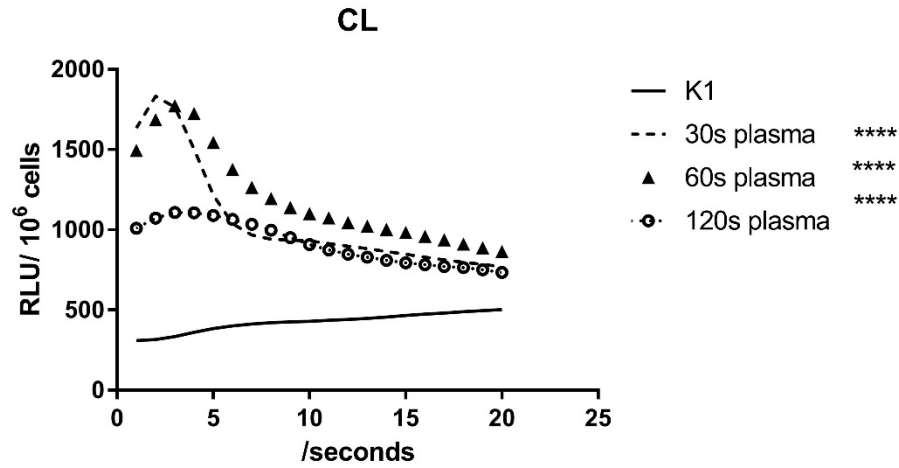


Figure 2: Evaluation of the metabolic activity of K1 (MTT) in the experimental groups: cold plasma (2A), hydrogen peroxide (2B) and SNP (2C), in different concentrations or irradiation times. Results are expressed in histograms, representing mean \pm standard error. (n=12). (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.005$; (***) $p < 0.0005$; (****) $p < 0.0001$, compared to Control (K1).

3A.



3B.

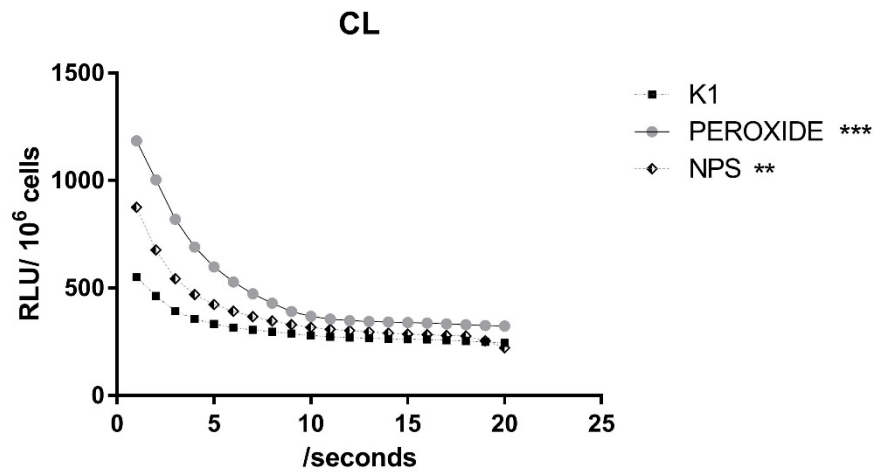
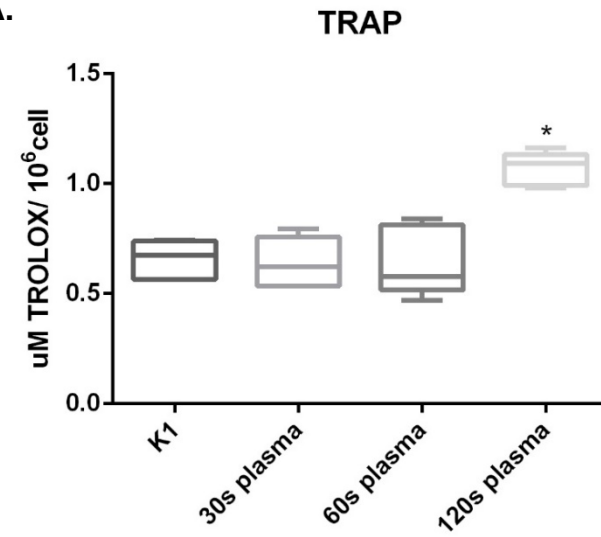


Figure 3: Chemiluminescence test (QL) showing the oxidative stress suffered by the cell after the plasma irradiation times (figure 3A), the treatment with peroxide (1800 μ M) and SNP (400 μ M), in relative luminescence units for seconds (figure 3B). (n=7). (*) p<0.05; (**) p<0.005; (***) p<0.0005; (****) p<0.0001, compared to Control (K1).

4A.



4B.

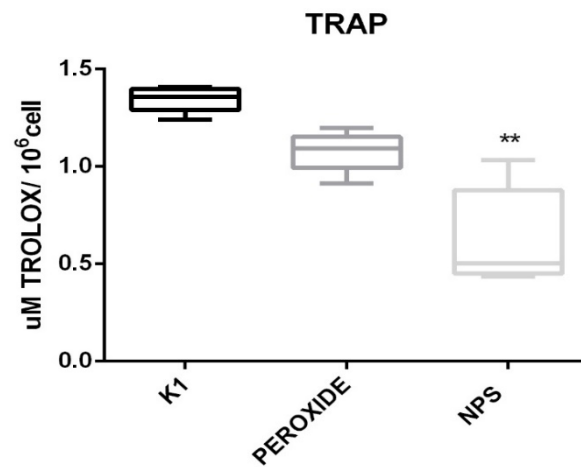


Figure 4: TRAP assay showing the total antioxidant capacity of the cell after the irradiation times with plasma (4A), with the treatments with peroxide (1800 μ M) and SNP (400 μ M), in μ M of TROLOX (4B). (n=5). (*) p<0.05; (**) p<0.005; (***) p<0.0005;

1 DISCUSSION

2 Plasma is the fourth physical state of matter, a gas that receives enough energy
3 to excite external electrons and promote their ionization (BURM, 2012). For a gas to reach this
4 state of matter, it needs to be heated thermally or electrically (KEIDAR et al., 2013). The
5 purpose of cold physical plasma as therapy is not to denature the tissue, but to induce a
6 chemically specific response or modification, without thermally affecting the sample, focusing
7 mainly on the effect of reactive species and free radicals generated by the plasma and the
8 changes caused by them in tumor cells (BEKESCHUS et al., 2013). Through the action of the
9 reactive species it produces, cold physical plasma is able to decrease the viability of tumor cells,
10 and even induce death by apoptosis, presenting little/no toxicity or influence on normal cells,
11 as already shown (AMINRAYAJEZEH et al., 2019; LIEDTKE et al., 2018; GANDHIRAJAN
12 et al., 2018; METELMANN et al., 2018; ROWE III et al., 2018; KARKI et al., 2017).

13 With cold plasma inducing equipment, such as kiNPen jet plasma, it is
14 possible to irradiate samples in two different ways: direct and indirect (KEIDAR et al., 2015).
15 In indirect irradiation, there is a cold plasma generation system in devices such as plasma jet
16 pen, which focus on a liquid (KEIDAR, 2013). It is through indirect irradiation that the effects
17 produced by long-lived reactive species, the only ones present in irradiated liquids, are analyzed
18 (KURAKE et al., 2016; TANAKA et al., 2018). Indirect irradiation also increases the extent of
19 cold plasma therapy, as the liquid can go where for direct irradiation is impossible to (PEREIRA
20 et al., 2019).

21 The relationship between thyroid carcinoma and in vitro research with cold
22 physical plasma is still in the beginning, so the number of studies is still very low and not all
23 types of thyroid carcinomas are mentioned. The types of lineage most used in the researches
24 are anaplastic and medullary carcinomas, with types of cold plasma such as atmospheric
25 pressurized for example, leading to the induction of apoptosis, decreased viability and changes
26 in the redox balance of tumor cells (KAUSHIK et al., 2014; LEE et al., 2014). With PTC
27 lineage, the literature just show two studies: one showing the inhibition of metastasis and
28 invasion using pressurized cold plasma, attested in TPC-1 and BHP 10-3 cells, two PTC's
29 lineages (CHAN et al., 2014), and another research showed in 2019, that a cold plasma
30 treatment with argon was able to increase the rates of apoptosis in PTC cells- BCPAP, by
31 immunogenic cell death, representing a pioneering research for the cold plasmas with argon
32 treatment in PTCs which have mutation in BRAF and p53 (YOON et al., 2019). All irradiations

1 carried out in these studies were direct. Therefore, it is possible to observe that the PTC lineage
2 is not as investigated, despite representing 80% of diagnosed thyroid carcinomas.

3 The K1 is a lineage of papillary thyroid carcinoma with a BRAF mutation but
4 no TP53 mutation, and comes from a metastatic tumor. This lineage was never investigated
5 with cold physical plasma (SAISELET et al., 2012; RIBEIRO et al., 2008; MEIRELES et al.,
6 2007). The preliminary results with other lineages showed the potential of plasma to affect
7 viability, induce death and redox imbalance in thyroid carcinoma cells. In this study, K1 was
8 used to investigate the effects of cold physical plasma and its products on PTC lineage using
9 indirect irradiation. The results showed that cellular viability was affected all the times plasma
10 irradiation was used, in a dose-dependent manner, and mainly by high concentrations of
11 hydrogen peroxide and SNP. The chemiluminescence test showed that all treatments
12 significantly affected the oxidative stress suffered by K1, but cold physical plasma (mainly in
13 30 and 60 seconds) and hydrogen peroxide affected this level of stress more significantly,
14 showing that in the indirect treatment with cold argon plasma, there is a predominant role of
15 hydrogen peroxide when in high concentrations, in stress induction in tumor cells.

Experimental Group	Viability	Oxidative Stress	Antioxidant Capacity
Cold physical plasma (30s, 60s, 120s)	↓ Proliferation; unviable cells; MTT.	✓	↑ 120 s
Hydrogen Peroxide	↓ Proliferation; unviable cells; MTT	✓	X
NPS	↓ Proliferation; unviable cells; MTT	✓	↓

16 Table1: Summary of the results obtained in the treatments with K1 in parameters, such as: viability
17 (Trypan Blue counting, MTT), oxidative stress (CL) and antioxidant capacity (TRAP).

18 The pattern observed in the viability tests, corroborates with what we see in
19 the QL curves in the times of 30 and 60 seconds of irradiation, however, the highest time -120
20 seconds-, despite presenting the most potent effects in cell viability, did not show
21 correspondingly effect to the stress pattern induced by RS, presented in the QL test. As the time
22 of exposure to plasma irradiation was longer (120 seconds of exposure), the increased amount
23 of reactive species present should interfere more robustly; the reason for this is answered by the
24 TRAP test, since the production of antioxidants intensified significantly, and contained the
25 oxidative effects identified with the QL test. This possible adaptive response, however, was not
26 able to maintain the viability of the cells, which still maintains the dose-response aspect of the
27 treatment with atmospheric cold argon plasma in the K1 viability.

1 Hydrogen peroxide is a stressor for cells in general, but thyroid tissue
2 supports high levels of this ROS, since they use peroxide as a substrate for hormone synthesis;
3 the antioxidant defense system of these cells is already naturally prepared to protect them from
4 the high levels to which they were exposed (OHYE; SUGAWARA, 2010), which explains the
5 fact that the TRAP trial hardly reported differences in control and treatment with peroxide. In
6 order to know the resistance of K1 to peroxide, the concentration was increased until obtaining
7 expressive results, finally establishing three working concentrations (1600 μ M, 1700 μ M and
8 1800 μ M). The role of hydrogen peroxide produced by cold physical plasma is essential for
9 inducing apoptosis and breaking the double stranded DNA as already shown by MA and
10 collaborators (2017). The effects that this species induces in high quantities, such as DNA
11 damage and induction of apoptosis (ZOU et al., 2017), also affect the K1 cell, since at
12 concentrations above 2000 μ M the cell viability was drastically affected, it concerns
13 proliferation and non-viable cells, showing the toxic effect of this concentration (data not
14 shown).

15 SNP, in turn, significantly affected the total antioxidant capacity, decreasing
16 the expression of soluble antioxidants. The nitroprusside sodium is a chemical compound, a
17 potent nitric oxide (NO) donor (RANADIVE et al., 2017). The SNP concentrations were chosen
18 as the highest concentration of treatment with cells (400 μ M) that induces death in the literature
19 (VARGA et al., 2016), and two lower ones, to establish a concentration curve. The SNP not
20 only affected the cell to the point of decreasing its proliferation and increasing the number of
21 non-viable cells, but also altered the metabolic activity, presenting dose-response in both
22 patterns, a fact explained by the interaction of nitric oxide in the mitochondrial respiratory
23 chain. NO competes for the same binding site as oxygen (O₂), inhibiting the ATP production
24 process and consequently decreasing its production for the cell. The connection with the
25 cytochrome oxidase c binding site is reversible, but if NO concentrations are high, competition
26 with O₂ will be greater (MASON et al., 2006). The metabolic activity shown by MTT was
27 affected because the chain of events in the mitochondria is blocked and / or the mitochondria
28 may have lost its conformation, as we will see below.

29 In the mitochondria, NO also participates in the reaction with a free radical
30 present in the organelle, derived from O₂, the superoxide radical (O₂^{•-}), generating
31 peroxynitrite (ONOO⁻), a reactive nitrogen species, which decreases the antioxidant defense,
32 through the inhibition of Mn-SOD (VALDEZ et al., 2018), the TRAP assay showed this
33 significantly decrease in the amount of total antioxidants; this whole picture also corroborates
34 the result of the significant increase in oxidative stress, observed by the QL test. The presence

1 of peroxyxynitrite in the mitochondria also generates pores in the membrane, an exit to the RNA,
2 and consequently Ca^{+2} efflux and depolarization of the membrane, losing mitochondrial
3 activity and conformation (PODEROSO; HELFENBERG; PODEROSO, 2019). The
4 concentrations of SNP used caused important changes in the cell, but not the loss of its viability
5 or changes in proliferation, indicating that the K1 cell is resistant to NO concentrations
6 considered high for other cells.

7 The Nitrate (NO_3^-) and Nitrite (NO_2^-), are more stable than NO and both are
8 produced from NO. They are present in the irradiation of indirect plasma and are responsible
9 for part of the cytotoxic and genotoxic effects of this therapy (GRISSETI; MERHABI; GOLZIO,
10 2020). According to these same authors, Nitrite mainly has a synergistic effect with hydrogen
11 peroxide in order to induce the death of cells in greater proportions, since many studies bring
12 the importance of the effect of two reactive species on the inherent plasma cytotoxicity
13 (GIRARD et al., 2016), which corroborates the different results presented by the plasma
14 treatment and by the donors themselves separately. These two species can react with
15 components of the culture medium, or even with air, and generate by-products capable of
16 affecting the viability of the cell, such as peroxyxynitrite, or acids that contribute to lower the pH
17 (HNO_3 e HNO_2) (KURAKE et al., 2016) and a series of events that can lead to enzyme
18 activation, generation of new reactive species, and may lead to apoptosis.

19 Reactive species are not the only products of plasma irradiated in culture
20 medium, which is in contact with K1. Other molecules and compounds are also produced,
21 therefore the effects observed both in viability and in the redox balance when analyzed
22 separately with peroxide hydrogen and SNP, show how specifically these RS affect these
23 parameters, but further analysis are necessary to be able to analyze all indirect plasma products
24 in the observed effects on viability and redox balance of the K1 lineage under treatment with
25 atmospheric argon plasma.

26 **CONCLUSION**

27 Although scarce, the study of cold plasma with thyroid carcinoma is very
28 promising. This work present for the first time, the effect of indirect treatment with cold
29 physical plasma in the K1, a lineage from PTC which have a mutation in BRAF and TP53
30 normal. The K1 was affected in all parameters: mitochondrial viability, proliferation and redox
31 balance, at times 30, 60 and 120 seconds of indirect treatment with cold physical plasma.
32 Hydrogen peroxide and reactive nitrogen species are produced by cold physical plasma and

1 both were able to significantly affect K1 in mitochondrial viability, proliferation and redox
2 balance. Cold argon physical plasma was able to decrease the viability of papillary carcinoma
3 tumor cells with mutation in BRAF and normal TP53, leading to redox imbalance of these cells
4 and mitochondrial metabolic changes as well.

5 REFERENCES

- 6 AMINRAYA JEZEH, Mahya et al. Effects of cold atmospheric plasma on viability of breast
7 (MDA-MB-231) and cervical (Hela) cancer cells. *Koomesh*, v. 21, n. 4, p. 694-701, 2019.
- 8 BEKESCHUS, Sander et al. Human mononuclear cell survival and proliferation is modulated
9 by cold atmospheric plasma jet. *Plasma Processes and Polymers*, v. 10, n. 8, p. 706-713, 2013.
- 10 BEKESCHUS, Sander et al. Redox stimulation of human THP-1 monocytes in response to
11 cold physical plasma. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2016, 2016.
- 12 BEKESCHUS, Sander et al. Risk assessment of kINPen plasma treatment of four human
13 pancreatic cancer cell lines with respect to metastasis. *Cancers*, v. 11, n. 9, p. 1237, 2019.
- 14 BISCOP, Eline et al. The Influence of Cell Type and Culture Medium on Determining Cancer
15 Selectivity of Cold Atmospheric Plasma Treatment. *Cancers*, v. 11, n. 9, p. 1287, 2019.
- 16 BONGIOVANNI, Massimo et al. Columnar cell variant of papillary thyroid carcinoma: 24
17 cytomorphological characteristics of 11 cases with histological correlation and 25 literature
18 review. *Cancer cytopathology*, v. 125, n. 6, p. 389-397, 2017.
- 19 BUNDSCHERER, Lena et al. Impact of non-thermal plasma treatment on MAPK signaling
20 pathways of human immune cell lines. *Immunobiology*, v. 218, n. 10, p. 1248-1255, 2013.
- 21 BURM, K. T. A. L. Plasma: the fourth state of matter. *Plasma Chemistry and Plasma*
22 *Processing*, v. 32, n. 2, p. 401-407, 2012.
- 23 CARINI, Francesco et al. Colorectal carcinogenesis: Role of oxidative stress and 4
24 antioxidants. *Anticancer research*, v. 37, n. 9, p. 4759-4766, 2017.
- 25 CHANG, Jae Won et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma inhibits thyroid papillary
26 cancer cell invasion via cytoskeletal modulation, altered MMP-2/-9/uPA activity. *PloS one*, v.
27 9, n. 3, 2014.
- 28 CHEN, Zhitong et al. Cold atmospheric plasma discharged in water and its potential 14 use in
29 cancer therapy. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 50, n. 1, p. 15 015208, 2016.
- 30 FRIDMAN G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A (2008) Applied
31 plasma medicine. *Plasma Process Polym* 5: 503–533
- 32 FLECHA, Beatriz Gonzalez; LLESUY, Susana; BOVERIS, Alberto. Hydroperoxide-6
33 initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, 7 and
34 muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 10, n. 2, p. 93-100, 1991.

- 1 GANDHIRAJAN, Rajesh Kumar et al. Cytochrome c oxidase inhibition and cold plasma-
2 derived oxidants synergize in melanoma cell death induction. *Scientific reports*, v. 8, n. 1,
3 p. 1-12, 2018.
- 4 GIRARD, Pierre-Marie et al. Synergistic effect of H₂O₂ and NO₂ in cell death induced by
5 cold atmospheric He plasma. *Scientific reports*, v. 6, p. 29098, 2016.
- 6 GRISSETI, Elena; MERBAHI, Nofel; GOLZIO, Muriel. Anti-Cancer Potential of Two
7 Plasma-Activated Liquids: Implication of Long-Lived Reactive Oxygen and Nitrogen
8 Species. *Cancers*, v. 12, n. 3, p. 721, 2020.
- 9 GUO, Dehuang et al. Cytokeratin-8 in anaplastic thyroid carcinoma: More than a 4 simple
10 structural cytoskeletal protein. *International journal of molecular sciences*, 5 v. 19, n. 2, p.
11 577, 2018.
- 12 HECHT, Fabio et al. The role of oxidative stress on breast cancer development and 11
13 therapy. *Tumor biology*, v. 37, n. 4, p. 4281-4291, 2016.
- 14 ITO, Takashi et al. Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with
15 differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Cancer research*, v. 52, n. 5, p. 1369-1371,
16 1992.
- 17 JO, H. W. Jun, J. Shin, and S. H. Lee, "Biomedical Engineering: Frontier Research 24 and
18 Converging Technologies", vol. 9, 511p, 2015.
- 19 KARKI, Surya B. et al. Miniature dielectric barrier discharge nonthermal plasma 1 induces
20 apoptosis in lung cancer cells and inhibits cell migration. *BioMed research 2 international*, v.
21 2017, 2017.
- 22 KAUSHIK, Nagendra K. et al. Altered antioxidant system stimulates dielectric barrier 6
23 discharge plasma-induced cell death for solid tumor cell treatment. *PloS one*, v. 9, n. 7 7,
24 2014.
- 25 KEIDAR, M. et al. Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer
26 therapy. *British journal of cancer*, v. 105, n. 9, p. 1295-1301, 2011.
- 27 KEIDAR, Michael et al. Cold atmospheric plasma in cancer therapy. *Physics of Plasmas*, v.
28 20, n. 5, p. 057101, 2013.
- 29 KEIDAR, Michael. Plasma for cancer treatment. *Plasma Sources Science and Technology*, v.
30 24, n. 3, p. 033001, 2015.
- 31 KOSHIMURA, Kunio et al. Self-protection of PC12 cells by 6R-tetrahydrobiopterin from
32 nitric oxide toxicity. *Journal of neuroscience research*, v. 54, n. 5, p. 664-672, 1998.
- 33 KUMAR, Vinay et al. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia, 27 PA:
34 Saunders Elsevier, 8^a edition, 1504 p., 2010.
- 35 KURAKE, N.; Tanaka, H.; Ishikawa, K.; Kondo, T.; Sekine, M.; Nakamura, K.; Kajiyama,
36 H.; Kikkawa, F.; Mizuno, M.; Hori, M. Cell survival of glioblastoma grown in medium

- 1 containing hydrogen peroxide and/or nitrite, or in plasma-activated medium. Arch. Biochem.
2 Biophys. 605, 102–108, 2016.
- 3 LEE, Sei Young et al. Nonthermal plasma induces apoptosis in ATC cells: involvement of
4 JNK and p38 MAPK-dependent ROS. Yonsei medical journal, v. 55, n. 6, p. 1640-1647,
5 2014.
- 6 LIEDTKE, Kim Rouven et al. Cold physical plasma selectively elicits apoptosis in 11 murine
7 pancreatic cancer cells in vitro and in ovo. Anticancer research, v. 38, n. 10, 12 p. 5655-5663,
8 2018.
- 9 MA, Jie et al. Contribution of hydrogen peroxide to non-thermal atmospheric pressure plasma
10 induced A549 lung cancer cell damage. Plasma Processes and Polymers, v. 14, n. 7, p.
11 1600162, 2017.
- 12 MASON, Maria G. et al. Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive 32
13 (heme) and noncompetitive (copper) binding to cytochrome c oxidase. Proceedings 33 of the
14 National Academy of Sciences, v. 103, n. 3, p. 708-713, 2006.
- 15 MEIRELES, Ana Margarida et al. Molecular and genotypic characterization of human thyroid
16 follicular cell carcinoma–derived cell lines. Thyroid, v. 17, n. 8, p. 707-715, 2007.
- 17 METELMANN, Hans-Robert et al. Clinical experience with cold plasma in the 1 treatment of
18 locally advanced head and neck cancer. Clinical Plasma Medicine, v. 2 9, p. 6-13, 2018.
- 19 MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: 20 application
20 to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological 21 methods, v. 65, n. 1-2,
21 p. 55-63, 1983.
- 22 OBRADOR, Elena et al. Oxidative stress and antioxidants in the pathophysiology of 34
23 malignant melanoma. Biological chemistry, v. 400, n. 5, p. 589-612, 2019.
- 24 OHYE, Hidemi; SUGAWARA, Masahiro. Dual oxidase, hydrogen peroxide and 1 thyroid
25 diseases. Experimental biology and medicine, v. 235, n. 4, p. 424-433, 2010.
- 26 PEREIRA, S. et al. Study of a cold atmospheric pressure plasma jet device for indirect
27 treatment of squamous cell carcinoma. Clinical Plasma Medicine, v. 13, p. 9-14, 2019.-1026,
28 2019.
- 29 PODEROSO, Juan José; HELFENBERGER, Katia; PODEROSO, Cecilia. The effect 9 of
30 nitric oxide on mitochondrial respiration. Nitric Oxide, v.8, p. 61-72, 2019.
- 31 RANADIVE, Sushant M. et al. Comparison of the vasodilatory effects of sodium 16
32 nitroprusside vs. nitroglycerin. Journal of Applied Physiology, v. 123, n. 2, p. 402-17 406,
33 2017.
- 34 REPETTO, Marisa et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. Clinica 21
35 Chimica Acta, v. 255, n. 2, p. 107-117, 1996.

- 1 RIBEIRO, Franclim Ricardo et al. Conventional and molecular cytogenetics of human 23
2 non-medullary thyroid carcinoma: characterization of eight cell line models and 24 review of
3 the literature on clinical samples. *BMC cancer*, v. 8, n. 1, p. 371, 2008.
- 4 ROWE III, Warren J. et al. Cold Atmospheric Plasma Selectively Induces Apoptosis 29 In
5 Renal Adenocarcinoma. *Clinical Plasma Medicine*, v. 9, p. 29-30, 2018.
- 6 SAISELET, Manuel et al. Thyroid cancer cell lines: an overview. *Frontiers in 34*
7 *endocrinology*, v. 3, p. 133, 2012.
- 8 SAPUPPO, Giulia et al. Time to separate persistent from recurrent differentiated 1 thyroid
9 cancer: different conditions with different outcomes. *The Journal of Clinical 2 Endocrinology*
10 *& Metabolism*, v. 104, n. 2, p. 258-265, 2019.
- 11 TANAKA, H.; Mizuno, M.; Ishikawa, K.; Takeda, K.; Kondo, H.; Sekine, M.; Hashizume,
12 H.; Nakamura, K.; Kajiyama, H.; Okazaki, Y.; et al. Similarities and differences in the
13 cellular responses between plasma-activated medium-treated glioblastomas and plasma-
14 activated Ringer's lactate solution-treated glioblastomas. *Clin. Plasma. Med.* 9, 42–43, 2018.
- 15 TELL, Gianluca et al. Control of phosphatase and tensin homolog (PTEN) gene expression in
16 normal and neoplastic thyroid cells. *Endocrinology*, v. 145, n. 10, p. 4660-4666, 2004.
- 17 THOM, Stephen R. et al. Oxidative stress mediated by nitrogen at elevated pressure 29
18 inhibits non-small cell lung cancer growth. *Experimental lung research*, v. 43, n. 4-30 5, p.
19 175-180, 2017.
- 20 TOLNAI, Susan. A method for viable cell count. *TCA Manual/Tissue Culture Association*, v.
21 1, n. 1, p. 37-38, 1975.
- 22 TUTTLE, R. Michael et al. Thyroid carcinoma, version 2.2014. *Journal of the 6 National*
23 *Comprehensive Cancer Network*, v. 12, n. 12, p. 1671-1680, 2014.
- 24 VALDEZ, Laura Batriz et al. Mitochondrial peroxynitrite generation is mainly driven by 11
25 superoxide steady-state concentration rather than by nitric oxide steady-state 12
26 concentration. *Internation Journal of Molecular Biology*, v.3; n.2 ; p.58-63, 2018.
- 27 VALVERDE, Mahara et al. Hydrogen Peroxide-Induced DNA Damage and Repair 20
28 through the Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem 21 Cells. *Stem*
29 *cells international*, v. 2018, 2018.
- 30 VARGA, J., Bátor, J., Nádasdi, G. et al. Partial Protection of PC12 Cells from Cellular Stress
31 by Low-Dose Sodium Nitroprusside Pre-treatment. *Cell Mol Neurobiol* 36, 1161–1168, 2016.
- 32 WANG, Mian et al. Cold atmospheric plasma for selectively ablating metastatic 28 breast
33 cancer cells. *PloS one*, v. 8, n. 9, 2013.
- 34 WEISS, Martin et al. Cold atmospheric plasma for potential in vivo applications: Raman
35 microspectrometry determined effects on cervical cancer cells. *European Journal of*
36 *Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, v. 234, p. e162-e163, 2019.

- 1 WYLLIE, F. S. et al. Evasion of p53-mediated growth control occurs by three alternative
2 mechanisms in transformed thyroid epithelial cells. *Oncogene*, v. 10, n. 1, p. 49-59, 1995.
- 3 XING, Mingzhao. Oxidative stress: a new risk factor for thyroid cancer. *Endocrine-1 related*
4 *cancer*, v. 19, n. 1, p. C7, 2012.
- 5 YANG, Haotian et al. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy.
6 *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 37, n. 1, p. 266, 2018.
- 7 YOON, Yongdae et al. Cold Atmospheric Plasma Induces HMGB1 Expression in Cancer
8 Cells. *Anticancer research*, v. 39, n. 5, p. 2405-2413, 2019.
- 9 ZENG, Rong et al. Positive effect of ROR γ t on the prognosis of thyroid papillary 10
10 carcinoma patients combined with Hashimoto's thyroiditis. *American journal of 11*
11 *translational research*, v. 10, n. 10, p. 3011, 2019
- 12 ZHANG, Y.; MARTIN, S. G. Redox proteins and radiotherapy. *Clinical oncology*, v. 26, n. 5,
13 p. 289-300, 2014.
- 14 ZOU, Zhengzhi et al. Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for 19 cancer
15 therapy. *Apoptosis*, v. 22, n. 11, p. 1321-1335, 2017.

1 CONCLUSÃO

2 A linhagem K1 apresentou alterações na viabilidade e balanço redox,
3 quando tratada com plasma físico frio de argônio indiretamente. Essa irradiação
4 indireta levou a diminuição da viabilidade, tanto proliferativa quanto metabólica, e ao
5 aumento no estresse oxidativo sofrido pela célula K1, mostrando-se efetiva em todos
6 os tempos de irradiação, principalmente no tempo irradiado de 120s, onde foi
7 observado o maior impacto no balanço redox e diminuição da viabilidade das células
8 K1. As espécies reativas que desempenham papel importante no efeito do plasma
9 físico como terapia anti-tumoral: peróxido de hidrogênio e espécies reativas de
10 nitrogênio, induziram alterações em viabilidade e balanço redox nas células K1, mas
11 apenas em altas concentrações dessas espécies reativas isoladas, mostrando que
12 essa linhagem de CPT é resistente a elas, principalmente ao peróxido de hidrogênio.

1

REFERÊNCIAS

- 2 ADHIKARI, Ek R.; PTASINSKA, Sylwia. Correlation between helium atmospheric
3 pressure plasma jet (APPJ) variables and plasma induced DNA damage. **The**
4 **European Physical Journal D**, v. 70, n. 9, p. 180, 2016.
- 5 AKAMIZU, Takashi; AMINO, Nobuyuki. Hashimoto's thyroiditis. In: **Endotext**
6 **[Internet]**. MDText. com, Inc., Julho 2017.
- 7 ALVES, Douglas Pereira; PINHEIRO, Christiano Jorge Gomes; RIBEIRO, Claudio
8 Moises. Construção de um reator de plasma frio à pressão atmosférica com materiais
9 de baixo custo/Construction of a cold plasma reactor at atmospheric pressure with low
10 cost materials. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 5, p. 3914-3919, 2019.
- 11 AMEZIANE-EL-HASSANI, Rabii; DUPUY, Corinne. Detection of reactive oxygen
12 species in cells undergoing oncogene-induced senescence. In: **Oncogene-Induced**
13 **Senescence**. Humana Press, New York, NY. p. 139-145., 2017.
- 14 AMINRAYAJEZEH, Mahya et al. Effects of cold atmospheric plasma on viability of
15 breast (MDA-MB-231) and cervical (Hela) cancer cells. **Koomesh**, v. 21, n. 4, p. 694-
16 701, 2019.
- 17 ANGELL, Trevor E. et al. MHC class I loss is a frequent mechanism of immune escape
18 in papillary thyroid cancer that is reversed by interferon and selumetinib treatment in
19 vitro. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 23, p. 6034-6044, 2014.
- 20 ASMAT, Ullah; ABAD, Khan; ISMAIL, Khan. Diabetes mellitus and oxidative stress—
21 A concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 547-553, 2016.
- 22 BALOCH, Zubair W.; LIVOLSI, Virginia A. Special types of thyroid
23 carcinoma. **Histopathology**, v. 72, n. 1, p. 40-52, 2018.
- 24 BEKESCHUS, Sander et al. Human mononuclear cell survival and proliferation is
25 modulated by cold atmospheric plasma jet. **Plasma Processes and Polymers**, v. 10,
26 n. 8, p. 706-713, 2013.
- 27 BEKESCHUS, Sander et al. Redox stimulation of human THP-1 monocytes in
28 response to cold physical plasma. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v.
29 2016, 2016.
- 30 BEKESCHUS, Sander et al. Risk assessment of kINPen plasma treatment of four
31 human pancreatic cancer cell lines with respect to metastasis. **Cancers**, v. 11, n. 9, p.
32 1237, 2019.
- 33 BERNHARDT, Thoralf et al. Plasma medicine: Applications of cold atmospheric
34 pressure plasma in dermatology. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v.
35 2019, 2019.

- 1 BERTONI, Ana Paula Santin et al. Extracellular ATP is differentially metabolized on
2 papillary thyroid carcinoma cells surface in comparison to normal cells. **Cancer**
3 **Microenvironment**, v. 11, n. 1, p. 61-70, 2018.
- 4 BISCOP, Eline et al. The Influence of Cell Type and Culture Medium on Determining
5 Cancer Selectivity of Cold Atmospheric Plasma Treatment. **Cancers**, v. 11, n. 9, p.
6 1287, 2019.
- 7 BOGAERTS, Annemie et al. Gas discharge plasmas and their applications.
8 **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 4, p. 609-658, 2002.
- 9 BONGIOVANNI, Massimo et al. Columnar cell variant of papillary thyroid carcinoma:
10 cytomorphological characteristics of 11 cases with histological correlation and
11 literature review. **Cancer cytopathology**, v. 125, n. 6, p. 389-397, 2017.
- 12 BRASIL. Ministério da Saúde - **INCA**, Rio de Janeiro; 2017
- 13 BRASIL. Ministério da Saúde - **INCA**, Rio de Janeiro; 2020
- 14 BUNDSCHERER, Lena et al. Impact of non-thermal plasma treatment on MAPK
15 signaling pathways of human immune cell lines. **Immunobiology**, v. 218, n. 10, p.
16 1248-1255, 2013.
- 17 BURM, K. T. A. L. Plasma: the fourth state of matter. **Plasma Chemistry and Plasma**
18 **Processing**, v. 32, n. 2, p. 401-407, 2012.
- 19 CAIRNS, Rob A.; HARRIS, Isaac S.; MAK, Tak W. Regulation of cancer cell
20 metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85-95, 2011.
- 21 CANAL, Cristina et al. Plasma-induced selectivity in bone cancer cells death. **Free**
22 **radical biology and medicine**, v. 110, p. 72-80, 2017.
- 23 CARIA, Paola et al. Characterizing the three-dimensional organization of telomeres in
24 papillary thyroid carcinoma cells. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 4, p. 5175-
25 5185, 2019.
- 26 CARINI, Francesco et al. Colorectal carcinogenesis: Role of oxidative stress and
27 antioxidants. **Anticancer research**, v. 37, n. 9, p. 4759-4766, 2017.
- 28 CARVALHO, Denise P.; DUPUY, Corinne. Role of the NADPH oxidases DUOX and
29 NOX4 in thyroid oxidative stress. **European thyroid journal**, v. 2, n. 3, p. 160-167,
30 2013.
- 31 CARVALHO, Denise P.; DUPUY, Corinne. Thyroid hormone biosynthesis and
32 release. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 458, p. 6-15, 2017.
- 33 CHANG, Jae Won et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma inhibits thyroid

- 1 papillary cancer cell invasion via cytoskeletal modulation, altered MMP-2/-9/uPA
2 activity. **PloS one**, v. 9, n. 3, 2014.
- 3 CHANG, Yuan-Ching et al. Local anesthetics induce apoptosis in human thyroid
4 cancer cells through the mitogen-activated protein kinase pathway. **PloS one**, v. 9, n.
5 2, 2014.
- 6 CHEN, Zhitong et al. Cold atmospheric plasma discharged in water and its potential
7 use in cancer therapy. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 50, n. 1, p. 015208,
8 2016.
- 9 CHENG, Lingxiao et al. HER inhibitor promotes BRAF/MEK inhibitor-induced
10 redifferentiation in papillary thyroid cancer harboring BRAFV600E. **Oncotarget**, v. 8,
11 n. 12, p. 19843, 2017.
- 12 CHMIELIK, Ewa et al. Heterogeneity of Thyroid Cancer. **Pathobiology**, v. 85, n. 1-2,
13 p. 117-129, Fevereiro 2018
- 14 CORTÉS-FUNES, H., Coronado, C. Role of anthracyclines in the era of targeted
15 therapy. *Cardiovasc Toxicol* 7, 56–60 (2007)
- 16 CRUZ, Margarida; DUARTE-RODRIGUES, Joana; CAMPELO, Manuel.
17 Cardiotoxicidade na terapêutica com antraciclinas: estratégias de prevenção. **Revista**
18 **Portuguesa de Cardiologia**, v. 35, n. 6, p. 359-371, 2016.
- 19 DAI, Xin-Zheng et al. Potential therapeutic efficacy of curcumin in liver cancer. **Asian**
20 **Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 6, p. 3855-3859, 2013.
- 21 DANG, Rajan P. et al. Neoadjuvant therapy in differentiated thyroid
22 cancer. **International journal of surgical oncology**, v. 2016, 2016.
- 23 DERWAHL, Michael; NICULA, Diana. Estrogen and its role in thyroid
24 cancer. **Endocrine-related cancer**, v. 21, n. 5, p. T273-T283, 2014.
- 25 ELFAWY, Hasnaa A.; DAS, Biswadeep. Crosstalk between mitochondrial dysfunction,
26 oxidative stress, and age related neurodegenerative disease: Etiologies and
27 therapeutic strategies. **Life sciences**, v. 218, p. 165-184, 2019.
- 28 FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças
29 relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica**
30 **brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- 31 FLECHA, Beatriz Gonzalez; LLESUY, Susana; BOVERIS, Alberto. Hydroperoxide-
32 initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver,
33 and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 10, n. 2, p. 93-100, 1991.
- 34 FRASCA, F. et al. BRAF (V600E) mutation and the biology of papillary thyroid
35 cancer. **Endocrine-related cancer**, v. 15, n. 1, p. 191, 2008.

- 1 FRIDMAN G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A (2008)
2 Applied plasma medicine. **Plasma Process Polym** 5: 503–533
- 3 FURUTA, Ryo et al. Intracellular responses to reactive oxygen and nitrogen species,
4 and lipid peroxidation in apoptotic cells cultivated in plasma-activated medium. **Plasma**
5 **Processes and Polymers**, v. 14, n. 11, p. 1700123, 2017.
- 6 GANDHIRAJAN, Rajesh Kumar et al. Cytochrome c oxidase inhibition and cold
7 plasma-derived oxidants synergize in melanoma cell death induction. **Scientific**
8 **reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.
- 9 GASCHLER, Michael M.; STOCKWELL, Brent R. Lipid peroxidation in cell
10 death. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 482, n. 3, p.
11 419-425, 2017.
- 12 GILLANDERS, S. L.; O'NEILL, J. P. Prognostic markers in well differentiated papillary
13 and follicular thyroid cancer (WDTC). **European Journal of Surgical Oncology**, v.
14 44, n. 3, p. 286-296, 2018.
- 15 GIORDANO, Thomas J. Follicular cell thyroid neoplasia: insights from genomics and
16 The Cancer Genome Atlas research network. **Current opinion in oncology**, v. 28, n.
17 1, p. 1-4, 2016.
- 18 GIRARD, Pierre-Marie et al. Synergistic effect of H₂O₂ and NO₂ in cell death
19 induced by cold atmospheric He plasma. **Scientific reports**, v. 6, p. 29098, 2016.
- 20 GOLDSMITH, Stanley J. Radioactive iodine therapy of differentiated thyroid
21 carcinoma: redesigning the paradigm. **Molecular imaging and radionuclide therapy**,
22 v. 26, n. Suppl 1, p. 74, 2017.
- 23 GOU, MaLing et al. Curcumin-loaded biodegradable polymeric micelles for colon
24 cancer therapy in vitro and in vivo. **Nanoscale**, v. 3, n. 4, p. 1558-1567, 2011.
- 25 GRAVES, David B. Reactive species from cold atmospheric plasma: implications for
26 cancer therapy. **Plasma Processes and Polymers**, v. 11, n. 12, p. 1120-1127, 2014.
- 27 GRECO, Angela; MIRANDA, C.; PIEROTTI, M. A. Rearrangements of NTRK1 gene in
28 papillary thyroid carcinoma. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 321, n. 1, p.
29 44-49, 2010.
- 30 GRISSETI, Elena; MERBAHI, Nofel; GOLZIO, Muriel. Anti-Cancer Potential of Two
31 Plasma-Activated Liquids: Implication of Long-Lived Reactive Oxygen and Nitrogen
32 Species. **Cancers**, v. 12, n. 3, p. 721, 2020.
- 33 GUO, Dehuang et al. Cytokeratin-8 in anaplastic thyroid carcinoma: More than a simple
34 structural cytoskeletal protein. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n.
35 2, p. 577, 2018.

- 1 HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants—quo vadis?. **Trends in**
2 **pharmacological sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.
- 3 HALLIWELL, Barry. Free radicals and other reactive species in disease. **Els**, p. 1-9,
4 2001.
- 5 HECHT, Fabio et al. The role of oxidative stress on breast cancer development and
6 therapy. **Tumor biology**, v. 37, n. 4, p. 4281-4291, 2016.
- 7 HIMA, Sithul; SREEJA, Sreeharshan. Regulatory role of estrogen-induced reactive
8 oxygen species in the modulatory function of UCP 2 in papillary thyroid cancer
9 cells. **IUBMB life**, v. 67, n. 11, p. 837-846, 2015.
- 10 HSIAO, Susan J.; NIKIFOROV, Yuri E. Molecular Genetics and Diagnostics of Thyroid
11 Cancer. In: **The Thyroid and Its Diseases**. Springer, Cham, 2019. p. 549-561.
- 12 HUANG, Wen-Juan; ZHANG, X. I. A.; CHEN, Wei-Wei. Role of oxidative stress in
13 Alzheimer's disease. **Biomedical reports**, v. 4, n. 5, p. 519-522, 2016.
- 14 INCALZA, Maria Angela et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in
15 endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic
16 diseases. **Vascular pharmacology**, v. 100, p. 1-19, 2018.
- 17 ISBARY, Georg et al. Cold atmospheric plasma devices for medical issues. **Expert**
18 **review of medical devices**, v. 10, n. 3, p. 367-377, 2013.
- 19 ITO, Takashi et al. Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not
20 with differentiated carcinomas of the thyroid gland. **Cancer research**, v. 52, n. 5, p.
21 1369-1371, 1992
- 22 JO, H. W. Jun, J. Shin, and S. H. Lee, "Biomedical Engineering: Frontier Research and
23 Converging Technologies", vol. 9, 511p, 2015
- 24 JONES, Dean P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8,
25 n. 9-10, p. 1865-1879, 2006.
- 26 JUDEE, F., Fongia, C., Ducommun, B., Yousfi, M., Lobjois, V., and Merbahi, N. (2016).
27 Short and long time effects of low temperature plasma activated media on 3D
28 multicellular tumor spheroids. **Sci. Rep.** 6, 21421.
- 29 JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 13 Ed. Rio de Janeiro:
30 Guanabara Koogan, 2017.
- 31 KANG, Hee Joon et al. Antiproliferation and redifferentiation in thyroid cancer cell lines
32 by polyphenol phytochemicals. **Journal of Korean medical science**, v. 26, n. 7, p.
33 893-899, 2011.
- 34 KARKI, Surya B. et al. Miniature dielectric barrier discharge nonthermal plasma

- 1 induces apoptosis in lung cancer cells and inhibits cell migration. **BioMed research**
2 **international**, v. 2017, 2017.
- 3 KATOH, Hiroshi et al. Classification and general considerations of thyroid cancer. **Ann**
4 **Clin Pathol**, v. 3, n. 1, p. 1045, 2015.
- 5 KAUSHIK, Nagendra K. et al. Altered antioxidant system stimulates dielectric barrier
6 discharge plasma-induced cell death for solid tumor cell treatment. **PloS one**, v. 9, n.
7 7, 2014.
- 8 KAUSHIK, Nagendra K. et al. Effect of jet plasma on T98G human brain cancer
9 cells. **Current Applied Physics**, v. 13, n. 1, p. 176-180, 2012.
- 10 KAUSHIK, Neha et al. Responses of solid tumor cells in DMEM to reactive oxygen
11 species generated by non-thermal plasma and chemically induced ROS
12 systems. **Scientific reports**, v. 5, p. 8587, 2015.
- 13 KEIDAR, M. et al. Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in
14 cancer therapy. **British journal of cancer**, v. 105, n. 9, p. 1295-1301, 2011.
- 15 KEIDAR, M., Shashurin, A., Volotskova, O., Ann Stepp, M., Srinivasan, P., Sandler,
16 A., & Trink, B. (2013). Cold atmospheric plasma in cancer therapy. **Physics of**
17 **Plasmas**, 20(5), 057101
- 18 KEIDAR, Michael. Plasma for cancer treatment. **Plasma Sources Science and**
19 **Technology**, v. 24, n. 3, p. 033001, 2015.
- 20 KIM, G. J. et al. DNA damage and mitochondria dysfunction in cell apoptosis induced
21 by nonthermal air plasma. **Applied Physics Letters**, v. 96, n. 2, p. 021502, 2010.
- 22 KITAHARA, Cari M.; SOSA, Julie A. The changing incidence of thyroid cancer. **Nature**
23 **Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 11, p. 646, 2016.
- 24 KLAUNIG, James E.; KAMENDULIS, Lisa M.; HOCEVAR, Barbara A. Oxidative stress
25 and oxidative damage in carcinogenesis. **Toxicologic pathology**, v. 38, n. 1, p. 96-
26 109, 2010.
- 27 KONG, Ling-Ling et al. Downregulation of LSD1 suppresses the proliferation,
28 tumorigenicity and invasion of papillary thyroid carcinoma K1 cells. **Oncology letters**,
29 v. 11, n. 4, p. 2475-2480, 2016.
- 30 KOSHIMURA, Kunio et al. Self-protection of PC12 cells by 6R-tetrahydrobiopterin from
31 nitric oxide toxicity. **Journal of neuroscience research**, v. 54, n. 5, p. 664-672, 1998.
- 32 KOU, Longfa et al. Ambidextrous Approach To Disrupt Redox Balance in Tumor Cells
33 with Increased ROS Production and Decreased GSH Synthesis for Cancer
34 Therapy. **ACS applied materials & interfaces**, v. 11, n. 30, p. 26722-26730, 2019.

- 1 KUMAR, Vinay et al. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. **Philadelphia,**
2 **PA: Saunders Elsevier**, 8ª edição, 1504 p., 2010.
- 3 KURAKE, N.; Tanaka, H.; Ishikawa, K.; Kondo, T.; Sekine, M.; Nakamura, K.;
4 Kajiyama, H.; Kikkawa, F.; Mizuno, M.; Hori, M. Cell survival of glioblastoma grown in
5 medium containing hydrogen peroxide and/or nitrite, or in plasma-activated medium.
6 **Arch. Biochem. Biophys.** 605, 102–108, 2016.
- 7 KURITA, Hirofumi et al. Strand breaks and chemical modification of intracellular DNA
8 induced by cold atmospheric pressure plasma irradiation. **Plos one**, v. 15, n. 5, p.
9 e0232724, 2020.
- 10 LAMARTINA, Livia et al. Surgery for neck recurrence of differentiated thyroid cancer:
11 outcomes and risk factors. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.
12 102, n. 3, p. 1020-1031, 2017.
- 13 LAVRA, Luca et al. The loss of the p53 activator HIPK2 is responsible for galectin-3
14 overexpression in well differentiated thyroid carcinomas. **PLoS One**, v. 6, n. 6, 2011.
- 15 LEDUC, M. et al. Cell permeabilization using a non-thermal plasma. **New Journal of**
16 **Physics**, v. 11, n. 11, p. 115021, 2009.
- 17 LEE, Sei Young et al. Nonthermal plasma induces apoptosis in ATC cells: involvement
18 of JNK and p38 MAPK-dependent ROS. **Yonsei medical journal**, v. 55, n. 6, p. 1640-
19 1647, 2014.
- 20 LEE, Stephanie L. Complications of radioactive iodine treatment of thyroid
21 carcinoma. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 8, n. 11, p.
22 1277-1287, 2010.
- 23 LI, Dapeng et al. TLR3 correlated with cervical lymph node metastasis in patients with
24 papillary thyroid cancer. **International journal of clinical and experimental**
25 **medicine**, v. 7, n. 12, p. 5111, 2014.
- 26 LIANG, J. et al. Clinical analysis of Hashimoto thyroiditis coexistent with papillary
27 thyroid cancer in 1392 patients. **Acta Otorhinolaryngologica Italica**, v. 37, n. 5, p.
28 393, Outubro 2017.
- 29 LIEDTKE, Kim Rouven et al. Cold physical plasma selectively elicits apoptosis in
30 murine pancreatic cancer cells in vitro and in ovo. **Anticancer research**, v. 38, n. 10,
31 p. 5655-5663, 2018.
- 32 LIU, Dongwu; CHEN, Zhiwei. The effect of curcumin on breast cancer cells. **Journal**
33 **of breast cancer**, v. 16, n. 2, p. 133-137, 2013.
- 34 LIU, Ruixin et al. The Akt-specific inhibitor MK2206 selectively inhibits thyroid cancer
35 cells harboring mutations that can activate the PI3K/Akt pathway. **The Journal of**
36 **Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 4, p. E577-E585, 2011.

- 1 LLOYD, Ricardo V. et al. (Ed.). **WHO classification of tumours of endocrine**
2 **organs**. International agency for research on cancer (IARC), 2017.
- 3 LUPOLI, G. A. et al. Prognostic significance of thyroglobulin antibody epitopes in
4 differentiated thyroid cancer. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**,
5 v. 100, n. 1, p. 100-108, 2015.
- 6 MA, Jie et al. Contribution of hydrogen peroxide to non-thermal atmospheric pressure
7 plasma induced A549 lung cancer cell damage. **Plasma Processes and Polymers**,
8 v. 14, n. 7, p. 1600162, 2017.
- 9 MALETTA, Francesca et al. Poorly Differentiated Carcinoma and Anaplastic
10 Carcinoma of the Thyroid. In: **Thyroid FNA Cytology**. Springer, Singapore, 2019. p.
11 371-384.
- 12 MARTINDALE, Jennifer L.; HOLBROOK, Nikki J. Cellular response to oxidative stress:
13 signaling for suicide and survival. **Journal of cellular physiology**, v. 192, n. 1, p. 1-
14 15, 2002.
- 15 MARTIN-ZANCA, D. et al. Molecular characterization of the human trk oncogene.
16 In: **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**. Cold Spring Harbor
17 Laboratory Press, 1986. p. 983-992.
- 18 MASON, Maria G. et al. Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive
19 (heme) and noncompetitive (copper) binding to cytochrome c oxidase. **Proceedings**
20 **of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 3, p. 708-713, 2006.
- 21 MEIRELES, Ana Margarida et al. Molecular and genotypic characterization of human
22 thyroid follicular cell carcinoma–derived cell lines. **Thyroid**, v. 17, n. 8, p. 707-715,
23 2007
- 24 MERLINO, Robert L.; GOREE, John A. Dusty plasmas in the laboratory, industry, and
25 space. **Physics Today**., v. 57, n. 7, p. 32-39, 2004.
- 26 METELMANN, Hans-Robert et al. Clinical experience with cold plasma in the treatment
27 of locally advanced head and neck cancer. **Clinical Plasma Medicine**, v. 9, p. 6-13,
28 2018.
- 29 MIRZAEI, Hamed et al. Curcumin: A new candidate for melanoma
30 therapy?. **International journal of cancer**, v. 139, n. 8, p. 1683-1695, 2016.
- 31 MOHEBATI, A.; SHAHA, A. R. Anatomy of thyroid and parathyroid glands and
32 neurovascular relations. **Clinical Anatomy**, v. 25, n. 1, p. 19-31, 2012.
- 33 MOLINARO, Eleonora et al. Anaplastic thyroid carcinoma: from clinicopathology to
34 genetics and advanced therapies. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 11, p.
35 644, 2017.

- 1 MONO, T. et al. Changes in free radical scavengers and lipid peroxide in thyroid glands
2 of various thyroid disorders. **Hormone and metabolic research**, v. 29, n. 07, p. 351-
3 354, 1997.
- 4 MOSLEN, Mary Treinen. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and
5 phagocytosis. In: **Free radicals in diagnostic medicine**. Springer, Boston, MA, 1994.
6 p. 17-27.
- 7 MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application
8 to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n.
9 1-2, p. 55-63, 1983.
- 10 NA, D. G. et al. Core Needle Biopsy of the Thyroid: 2016 Consensus Statement and
11 Recommendations from Korean Society of Thyroid Radiology. **Korean Journal of**
12 **Radiology**, v.18, p. 217-237, 2017.
- 13 NANDKUMAR, Nikhil. Plasma—the fourth state of matter. **Int J Sci Technol Res**, v.
14 3, n. 9, p.49-52, 2014.
- 15 NATH, Meryl C.; ERICKSON, Lori A. Aggressive variants of papillary thyroid
16 carcinoma: hobnail, tall cell, columnar, and solid. **Advances in anatomic pathology**,
17 v. 25, n. 3, p. 172-179, 2018.
- 18 NIKIFOROV, Yuri E. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. **Endocrine**
19 **pathology**, v. 13, n. 1, p. 3-16, 2002.
- 20 NOGUEIRA, Veronique; HAY, Nissim. Molecular pathways: reactive oxygen species
21 homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. **Clinical Cancer**
22 **Research**, v. 19, n. 16, p. 4309-4314, Agosto 2013.
- 23 OBRADOR, Elena et al. Oxidative stress and antioxidants in the pathophysiology of
24 malignant melanoma. **Biological chemistry**, v. 400, n. 5, p. 589-612, 2019.
- 25 OHYE, Hidemi; SUGAWARA, Masahiro. Dual oxidase, hydrogen peroxide and thyroid
26 diseases. **Experimental biology and medicine**, v. 235, n. 4, p. 424-433, 2010.
- 27 PAPARODIS, Rodis et al. Hashimoto's thyroiditis pathology and risk for thyroid
28 cancer. **Thyroid**, v. 24, n. 7, p. 1107-1114, Julho 2014
- 29 PASQUAL-MELO, Gabriella et al. Targeting malignant melanoma with physical
30 plasmas. **Clinical Plasma Medicine**, v. 10, p. 1-8, 2018.
- 31 PELLEGRITI, Gabriella et al. Increased mortality in patients with differentiated thyroid
32 cancer associated with Graves' disease. **The Journal of Clinical Endocrinology &**
33 **Metabolism**, v. 98, n. 3, p. 1014-1021, 2013.
- 34 PEREIRA, S. et al. Study of a cold atmospheric pressure plasma jet device for indirect
35 treatment of squamous cell carcinoma. **Clinical Plasma Medicine**, v. 13, p. 9-14,

- 1 2019.-1026, 2019.
- 2 PODEROSO, Juan José; HELFENBERGER, Katia; PODEROSO, Cecilia. The effect
3 of nitric oxide on mitochondrial respiration. **Nitric Oxide**, 2019.
- 4 PRANDA, Marina A. et al. Sensitivity of tumor versus normal cell migration and
5 morphology to cold atmospheric plasma-treated media in varying culture conditions.
6 **Plasma Processes and Polymers**, v. 17, n. 2, p. 1900103, 2020.
- 7 PRIVAT-MALDONADO, Angela et al. ROS from physical plasmas: Redox chemistry
8 for biomedical therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.
- 9 PUZZIELLO, Alessandro et al. Benign thyroid nodules with RAS mutation grow
10 faster. **Clinical endocrinology**, v. 84, n. 5, p. 736-740, 2016.
- 11 RADI, Rafael. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in
12 molecular medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n.
13 23, p. 5839-5848, 2018.
- 14 RANADIVE, Sushant M. et al. Comparison of the vasodilatory effects of sodium
15 nitroprusside vs. nitroglycerin. **Journal of Applied Physiology**, v. 123, n. 2, p. 402-
16 406, 2017.
- 17 RAY, Aniruddha et al. Real-time monitoring of intracellular chemical changes in
18 response to plasma irradiation. **Plasma Medicine**, v. 7, n. 1, 2017.
- 19 RECEK, Nina et al. Effect of cold plasma on glial cell morphology studied by atomic
20 force microscopy. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0119111, 2015.
- 21 REPETTO, Marisa et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica**
22 **Chimica Acta**, v. 255, n. 2, p. 107-117, 1996.
- 23 REUTER, Stephan; VON WOEDTKE, Thomas; WELTMANN, Klaus-Dieter. The
24 KINPen—a review on physics and chemistry of the atmospheric pressure plasma jet
25 and its applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 51, n. 23, p. 233001,
26 2018.
- 27 RIBEIRO, Franclim Ricardo et al. Conventional and molecular cytogenetics of human
28 non-medullary thyroid carcinoma: characterization of eight cell line models and review
29 of the literature on clinical samples. **BMC cancer**, v. 8, n. 1, p. 371, 2008.
- 30 ROBERT, Eric et al. Perspectives of endoscopic plasma applications. **Clinical Plasma**
31 **Medicine**, v. 1, n. 2, p. 8-16, 2013.
- 32 ROMEI, Cristina; CIAMPI, Raffaele; ELISEI, Rossella. A comprehensive overview of
33 the role of the RET proto-oncogene in thyroid carcinoma. **Nature Reviews**
34 **Endocrinology**, v. 12, n. 4, p. 192, 2016.
- 35 ROWE III, Warren J. et al. Cold Atmospheric Plasma Selectively Induces Apoptosis In

- 1 Renal Adenocarcinoma. **Clinical Plasma Medicine**, v. 9, p. 29-30, 2018.
- 2 RYAN, Aoife M. et al. Effects of weight loss and sarcopenia on response to
3 chemotherapy, quality of life, and survival. **Nutrition**, v. 67, p. 110539, 2019.
- 4 SAADATI, Fariba et al. Comparison of direct and indirect cold atmospheric-pressure
5 plasma methods in the B 16 F 10 melanoma cancer cells treatment. **Scientific reports**,
6 v. 8, n. 1, p. 1-15, 2018.
- 7 SAHPAZIDOU, Despina et al. Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from
8 grape stems against breast, colon, renal and thyroid cancer cells. **Toxicology letters**,
9 v. 230, n. 2, p. 218-224, 2014.
- 10 SAISELET, Manuel et al. Thyroid cancer cell lines: an overview. **Frontiers in**
11 **endocrinology**, v. 3, p. 133, 2012.
- 12 SAPUPPO, Giulia et al. Time to separate persistent from recurrent differentiated
13 thyroid cancer: different conditions with different outcomes. **The Journal of Clinical**
14 **Endocrinology & Metabolism**, v. 104, n. 2, p. 258-265, 2019.
- 15 SCHIEBER, Michael; CHANDEL, Navdeep S. ROS function in redox signaling and
16 oxidative stress. **Current biology**, v. 24, n. 10, p. R453-R462, 2014.
- 17 SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics,
18 2019. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7-34, 2019.
- 19 SIES, Helmut. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in
20 physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox biology**, v. 11, p. 613-619,
21 2017.
- 22 STASIOŁEK, Mariusz et al. The molecular effect of diagnostic absorbed doses from
23 ¹³¹I on papillary thyroid cancer cells in vitro. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 993, 2017.
- 24 STEPNIAK, Jan; LEWINSKI, Andrzej; KARBOWNIK-LEWINSKA, Malgorzata. Sexual
25 dimorphism of NADPH oxidase/H₂O₂ system in rat thyroid cells; effect of exogenous
26 17β-estradiol. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 12, p. 4063,
27 2018.
- 28 SZANTO, Ildiko; PUSZTASZERI, Marc; MAVROMATI, Maria. H₂O₂ metabolism in
29 normal thyroid cells and in thyroid tumorigenesis: Focus on NADPH
30 oxidases. **Antioxidants**, v. 8, n. 5, p. 126, 2019.
- 31 TAN, Cheng et al. Curcumin inhibits hypoxia-induced migration in K1 papillary thyroid
32 cancer cells. **Experimental biology and medicine**, v. 240, n. 7, p. 925-935, 2015.
- 33 TANAKA, H.; Mizuno, M.; Ishikawa, K.; Takeda, K.; Kondo, H.; Sekine, M.; Hashizume,
34 H.; Nakamura, K.; Kajiyama, H.; Okazaki, Y.; et al. Similarities and differences in the

- 1 cellular responses between plasma-activated medium-treated glioblastomas and
2 plasma-activated Ringer's lactate solution-treated glioblastomas. **Clin. Plasma. Med.**
3 9, 42–43, 2018.
- 4 TANAKA, Hiromasa et al. Plasma medical science for cancer therapy: toward cancer
5 therapy using nonthermal atmospheric pressure plasma. **IEEE Transactions on**
6 **plasma science**, v. 42, n. 12, p. 3760-3764, 2014.
- 7 TANAKA, Hiromasa et al. Plasma with high electron density and plasma-activated
8 medium for cancer treatment. **Clinical Plasma Medicine**, v. 3, n. 2, p. 72-76, 2015.
- 9 TANG, Kam-Tsun; LEE, Chen-Hsen. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma:
10 pathogenic role and clinical implications. **Journal of the chinese medical**
11 **association**, v. 73, n. 3, p. 113-128, 2010.
- 12 TELL, Gianluca et al. Control of phosphatase and tensin homolog (PTEN) gene
13 expression in normal and neoplastic thyroid cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 10, p.
14 4660-4666, 2004
- 15 TELL, Gianluca et al. Control of phosphatase and tensin homolog (PTEN) gene
16 expression in normal and neoplastic thyroid cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 10, p.
17 4660-4666, 2004
- 18 THOM, Stephen R. et al. Oxidative stress mediated by nitrogen at elevated pressure
19 inhibits non-small cell lung cancer growth. **Experimental lung research**, v. 43, n. 4-5,
20 p. 175-180, 2017.
- 21 TIAN, Hui et al. Estrogen potentiates reactive oxygen species (ROS) tolerance to
22 initiate carcinogenesis and promote cancer malignant transformation. **Tumor Biology**,
23 v. 37, n. 1, p. 141-150, 2016.
- 24 TOLNAI, Susan. A method for viable cell count. **TCA Manual/Tissue Culture**
25 **Association**, v. 1, n. 1, p. 37-38, 1975.
- 26 TOYOKUNI, Shinya. Oxidative stress as an iceberg in carcinogenesis and cancer
27 biology. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 595, p. 46-49, 2016.
- 28 TRONCI, Laura et al. Crosstalk between metabolic alterations and altered redox
29 balance in PTC-derived cell lines. **Metabolites**, v. 9, n. 2, p. 23, 2019.
- 30 TUTTLE, R. Michael et al. Thyroid carcinoma, version 2.2014. **Journal of the National**
31 **Comprehensive Cancer Network**, v. 12, n. 12, p. 1671-1680, 2014.
- 32 UHLIAROVA, Barbora; HAJTMAN, Andrej. Hashimoto's thyroiditis—an independent
33 risk factor for papillary carcinoma. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**,
34 Setembro 2017.
- 35 VALDEZ, Laura Batriz et al. Mitochondrial peroxynitrite generation is mainly driven by
36 11 superoxide steady-state concentration rather than by nitric oxide steady-state 12

- 1 concentration. **Internation Journal of Molecular Biology**, v.3; n.2 ; p.58-63, 2018.
- 2 VALENTE, Miguel F.; CAPELA-COSTA, João. Carcinoma anaplásico da tiróide:
3 tendências atuais e perspetivas futuras. **Rev. Port. Cir.**, Lisboa , n. 41, p. 29-
4 39, jun. 2017
- 5 VALKO, Marian et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions
6 and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v.
7 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- 8 VALVERDE, Mahara et al. Hydrogen Peroxide-Induced DNA Damage and Repair
9 through the Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem**
10 **cells international**, v. 2018, 2018.
- 11 VARGA, J., Bátor, J., Nádasi, G. et al. Partial Protection of PC12 Cells from Cellular
12 Stress by Low-Dose Sodium Nitroprusside Pre-treatment. **Cell Mol Neurobiol** 36,
13 1161–1168, 2016.
- 14 VIANNA, D.M. et al. The histological rarity of thyroid câncer. **Braz J**
15 **Otorhinolaryngol.**; v.78, n.4, p.48-51. 2012
- 16 VON WOEDTKE, Thomas et al. Plasma medicine: a field of applied redox biology. in
17 vivo, v. 33, n. 4, p. 1011
- 18 WANG, Mian et al. Cold atmospheric plasma for selectively ablating metastatic breast
19 cancer cells. **PloS one**, v. 8, n. 9, 2013.
- 20 WEISS, Martin et al. Cold atmospheric plasma for potential in vivo applications: Raman
21 microspectrometry determined effects on cervical cancer cells. European **Journal of**
22 **Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 234, p. e162-e163, 2019
- 23 WEISS, Martin et al. Dose-Dependent Tissue-Level Characterization of a Medical
24 Atmospheric Pressure Argon Plasma Jet. **ACS applied materials & interfaces**, v. 11,
25 n. 22, p. 19841-19853, 2019.
- 26 WEYEMI, Urbain et al. Intracellular expression of reactive oxygen species-generating
27 NADPH oxidase NOX4 in normal and cancer thyroid tissues. **Endocrine-related**
28 **cancer**, v. 17, n. 1, p. 27, 2010.
- 29 WILTON, S. D. et al. Assignment of the human α -tropomyosin gene TPM3 to 1q22→
30 q23 by fluorescence in situ hybridisation. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 68,
31 n. 1-2, p. 122-124, 1995.
- 32 WYLLIE, F. S. et al. Evasion of p53-mediated growth control occurs by three alternative
33 mechanisms in transformed thyroid epithelial cells. **Oncogene**, v. 10, n. 1, p. 49-59,
34 1995
- 35 XING, Mingzhao. Oxidative stress: a new risk factor for thyroid cancer. **Endocrine-**
36 **related cancer**, v. 19, n. 1, p. C7, 2012.

- 1 YAGER, James D. Chapter 3: endogenous estrogens as carcinogens through
2 metabolic activation. **JNCI Monographs**, v. 2000, n. 27, p. 67-73, 2000.
- 3 YAKUSHINA, Valentina D.; LERNER, Larisa V.; LAVROV, Alexander V. Gene fusions
4 in thyroid cancer. **Thyroid**, v. 28, n. 2, p. 158-167, 2018.
- 5 YANG, Haotian et al. The role of cellular reactive oxygen species in cancer
6 chemotherapy. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, p.
7 266, 2018.
- 8 YANG, Xiaolin et al. ZNF703 is Overexpressed in Papillary Thyroid Carcinoma Tissues
9 and Mediates K1 Cell Proliferation. **Pathology & Oncology Research**, p. 1-10, 2017.
- 10 YOON, Yongdae et al. Cold Atmospheric Plasma Induces HMGB1 Expression in
11 Cancer Cells. **Anticancer research**, v. 39, n. 5, p. 2405-2413, 2019.
- 12 YU, Yang et al. Clinical relationship between IgG4-positive Hashimoto's thyroiditis and
13 papillary thyroid carcinoma. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**,
14 v. 101, n. 4, p. 1516-1524, 2016.
- 15 ZENG, Bin et al. Thyroid hormone protects cardiomyocytes from H₂O₂-induced
16 oxidative stress via the PI3K-AKT signaling pathway. **Experimental cell research**, v.
17 380, n. 2, p. 205-215, 2019.
- 18 ZENG, Rong et al. Positive effect of ROR γ t on the prognosis of thyroid papillary
19 carcinoma patients combined with Hashimoto's thyroiditis. **American journal of**
20 **translational research**, v. 10, n. 10, p. 3011, 2018.
- 21 ZHANG, Y.; MARTIN, S. G. Redox proteins and radiotherapy. **Clinical oncology**, v.
22 26, n. 5, p. 289-300, 2014.
- 23 ZLOBIN, Andrej; BLOODWORTH, Jeffrey C.; OSIPO, Clodia. Mitogen-Activated
24 Protein Kinase (MAPK) Signaling. In: **Predictive Biomarkers in Oncology**. Springer,
25 Cham, 2019. p. 213-221.
- 26 ZOU, Zhengzhi et al. Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for
27 cancer therapy. **Apoptosis**, v. 22, n. 11, p. 1321-1335, 2017.