



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**MARIELLE LANG MAKIYAMA**

**Efeitos do fitoquímico cafeína na linhagem celular TPC-1 de carcinoma de tireoide**

**CHAPECÓ**

**2023**

**MARIELLE LANG MAKIYAMA**

**EFEITOS DO FITOQUÍMICO CAFEÍNA NA LINHAGEM CELULAR TPC-1 DE  
CARCINOMA DE TIREOIDE**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Moreno e coorientação da Profa. Dra. Margarete Dulce Bagatini.

**CHAPECÓ**

**2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**

Av. Fernando Machado, 108 E

Centro, Chapecó, SC - Brasil

Caixa postal 181

CEP 89802-112

**Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Makiyama, Marielle Lang  
EFEITOS DO FITOQUÍMICO CAFEÍNA NA LINHAGEM CELULAR  
TPC-1 DE CARCINOMA DE TIREOIDE / Marielle Lang Makiyama.  
-- 2023.  
71 f.:il.  
  
:  
  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da  
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biomédicas, Chapecó, SC, 2023.  
  
1. Câncer de tireoide. 2. Sistema purinérgico. 3.  
Stress oxidativo. I. Universidade Federal da Fronteira  
Sul. II. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**MARIELLE LANG MAKIYAMA****EFEITOS DO FITOQUÍMICO CAFEÍNA NA LINHAGEM CELULAR TPC-1 DE  
CARCINOMA DE TIREOIDE**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas da  
Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS para obtenção do título de Mestre em Ciências  
Biomédicas defendido em banca examinadora em 06/07/2023.

Aprovado em: 10/07/2023

BANCA EXAMINADORA



---

Prof. Dr. Marcelo Moreno - UFFS  
Presidente da banca/orientado

---

Profa. Dra. Margarete Dulce Bagatini  
Presidente da banca/coorientadora

---

Profa. Dra. Jucimara Baldissarelli  
Membro titular externo

---

Profa. Dra. Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel  
Membro titular interno

---

Profa. Dra. Gabriela Gonçalves de Oliveira  
Membro suplente

Chapecó/SC, julho de 2023.

A vocês, família, que são o sentido da vida.

## AGRADECIMENTOS

O ano era 2021 e ainda vivíamos o pesadelo da pandemia. O esgotamento físico, mental e emocional clamava por outra coisa que não fossem os sons da UTI, monitores, ventiladores e os soluços inconsoláveis no telefone com os familiares dos pacientes que lutavam pela vida... Estudar outra coisa que não fosse COVID me resgatou daquela rotina de desespero, tristeza e morte que infelizmente deixou marcas eternas. Entretanto, tenho plena convicção de que, se eu não tivesse feito a minha parte, a culpa e a decepção comigo mesma seriam infinitas vezes mais aterradoras - somos ou não somos todos um pouco loucos aqui?

A entrevista para o processo seletivo do mestrado foi justamente em um dia de plantão. Ela não podia ser remarcada e nem havia qualquer colega que pudesse me substituir de última hora pois o desgaste consumia toda a equipe. Então lá fui eu, por trás de um face shield, escondida sob uma balaclava e uma máscara N95, apresentar um projeto que na ocasião me pareceu tão irreal, tão fora daquele contexto de sofrimento e dor... Agradeço muito a banca que teve a paciência de aceitar a entrevista naquelas condições e acreditar que era eu mesma quem estava lá, mesmo que vendo apenas meus olhos e ouvindo minha voz. Mas a vida é trágica e maravilhosa ao mesmo tempo. Vários motivos levaram ao fim daquela era sombria de doença. Algumas razões atribuo à ciência e muitas outras justifico com a fé, que jamais nos abandonou.

Assim, foi possível camuflar os traumas vivenciados com uma prática muito diferente. Estudar a admirável endocrinologia combinada com o desafiador cultivo celular foi uma empreitada e tanto e graças a ajuda de pessoas como a Daiane (sem você seria impraticável) foi possível aprender a rotina do laboratório e fugir dos problemas que ficavam porta afora. Outros personagens foram vitais nesta caminhada: meus filhos felinos e meu marido estiveram constantemente me acompanhando nesse processo e suportaram com paciência as minhas ausências, meu orientador e minha coorientadora guiaram meus passos e corrigiram minhas falhas e de maneira mais do que especial tive a ajuda e o incentivo incondicional de minha mãe, Maria Teresa, que desde minha infância me deu o exemplo de estudo constante e nunca medi esforços para estar presente em todas as minhas conquistas. A todos (inclusive meus colegas de trabalho e absolutamente todos os pacientes que estiveram sob minha responsabilidade - lembro disso com olhos marejados) sou extremamente grata e lhes dedico essa dissertação.

“Nunca descobriremos o que vem depois da escolha, se não tomarmos uma decisão. Por isso, entenda os seus medos, mas jamais deixe que eles sufoquem os seus sonhos.”

CARROLL, L. Alice no País da Maravilhas, 1865.

## RESUMO

**Introdução:** A neoplasia de tireoide vem apresentando incidência elevada nos últimos anos, porém, a mortalidade não acompanhou essa tendência, visto que a maioria dos casos se deve a carcinomas diferenciados de comportamento indolente. Quando não há resposta à terapêutica tradicional, as possibilidades de tratamento ficam extremamente limitadas, atualmente constituindo-se no uso de inibidores de tirosina-quinase que atuam de maneira apenas paliativa postergando a proliferação neoplásica, além de acarretar efeitos colaterais limitantes de qualidade de vida. A busca por outras possibilidades de tratamento nesse cenário trouxe evidências sobre o uso de fitoquímicos e sua ação sobre a modulação da sinalização purinérgica, estresse oxidativo e carcinogênese, hipotetizando possíveis vias de tratamento. Já são descritas as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes dessas substâncias em outras neoplasias, porém no câncer de tireoide essas evidências ainda são escassas. **Objetivo:** avaliar a ação antitumoral e anti-inflamatória do fitoquímico cafeína em células de câncer papilífero de tireoide da linhagem TPC-1 e em células controle não tumorais. **Metodologia:** As células foram tratadas com cafeína nas concentrações 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 4 mM e 8 mM por 24h e avaliados os seguintes parâmetros: viabilidade celular pelo ensaio MTT e pela microscopia com fluorescência, teste de migração celular, avaliação da atividade das ectonucleotidases do sistema purinérgico e marcadores do estresse oxidativo. **Resultados:** A cafeína causou redução da viabilidade celular e redução na migração celular, relacionada a aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, com redução da capacidade de formação de defesas antioxidantes tumorais. Foi encontrado também redução na atividade da enzima ecto-5'-nucleotidase, além de possível inibição de atividade de receptores de adenosina, porque mesmo elevada o tumor não apresentou progressão. **Conclusão:** Portanto, através da análise *in vitro*, observou-se que a cafeína pode ser uma substância efetiva no tratamento adjuvante do carcinoma diferenciado de tireoide refratário ao reduzir viabilidade e proliferação celular, através de mecanismos como o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, aumento de óxido nítrico e influência no sistema purinérgico, porém estudos *in vivo* seriam necessários para prosseguir com essa hipótese.

**Palavras-chave:** carcinoma diferenciado de tireoide, cafeína, sistema purinérgico, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

**Introduction:** Thyroid neoplasia has shown a high incidence in recent years, however, mortality has not followed this trend, since most cases are due to differentiated carcinomas with indolent behavior. When there is no response to traditional therapy, treatment possibilities are extremely limited, currently consisting of the use of tyrosine kinase inhibitors that act only palliatively, postponing neoplastic proliferation, in addition to causing side effects that limit quality of life. The search for other treatment possibilities in this scenario brought evidence about the use of phytochemicals and their action on the modulation of purinergic signaling, oxidative stress and carcinogenesis, hypothesizing possible treatment pathways. The anti-inflammatory and antioxidant properties of these substances in other neoplasms have already been described, but in thyroid cancer this evidence is still scarce. **Objective:** to evaluate the antitumor and anti-inflammatory action of the phytochemical caffeine in TPC-1 papillary thyroid cancer cells and in non-tumor control cells. **Methodology:** Cells were treated with caffeine at concentrations of 0.5 mM; 1 mM; 2 mM; 4 mM and 8 mM for 24 hours and the following parameters were evaluated: cell viability by MTT assay and fluorescence microscopy, cell migration test, evaluation of purinergic system ectonucleotidases activity and oxidative stress markers. **Results:** Caffeine caused a reduction in cell viability and a reduction in cell migration, related to an increase in the production of reactive oxygen and nitric oxide species, with a reduction in the ability to form tumor antioxidant defenses. A reduction in the activity of the ecto-5'-nucleotidase enzyme was also found, in addition to possible inhibition of the activity of adenosine receptors, because even when the tumor was elevated, it did not show progression. **Conclusion:** Therefore, through in vitro analysis, it was observed that caffeine can be an effective substance in the adjuvant treatment of refractory differentiated thyroid carcinoma by reducing cell viability and proliferation, through mechanisms such as increased production of reactive oxygen species, increased nitric oxide and influence on the purinergic system, but in vivo studies would be necessary to proceed with this hypothesis.

**Keywords:** differentiated thyroid carcinoma, caffeine, purinergic system, oxidative stress.

## LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Quadro 1 - Classificação de Bethesda .....	20
Quadro 2 - Classificação TNM .....	22
Quadro 3 - Estratificação de risco dinâmico pós (...) .....	23
Figura 1 - Aspecto ultrassonográfico de uma lesão sólido-cística (...) .....	19
Figura 2 - PAAF guiada por ultrassonografia, onde é possível (...) .....	19
Figura 3 - Sinalização molecular no controle da proliferação (...) .....	21
Figura 4 - Aspecto macroscópico de uma tireoide com (...) .....	22
Figura 5 - Classificação da cafeína como fitoquímico .....	25
Figura 6 - Estrutura bioquímica das xantinas .....	26
Figura 7 - Estrutura bioquímica da cafeína .....	26
Figura 8 - Ilustração com sumário das moléculas principais que (...) .....	30
Figura 9 - Principais mecanismos celulares envolvidos no estresse (...) .....	33
Figura 10 - MTT - Células TPC-1 (A) e PBMCS (B) expostas (...).....	41
Figura 11 - Microscopia com fluorescência das células (...) .....	42
Figura 12 - Avaliação microscópica do teste de migração (...) .....	42
Figura 13 - Quantificação do óxido nítrico (NOx) nas células (...) .....	43
Figura 14 - Medida indireta de tióis proteicos (A) e não proteicos (...) .....	43
Figura 15 - Avaliação indireta da atividade da enzima (...) .....	44
Figura 16 - Resumo dos mecanismos de ação da cafeína nas células TPC-1 .....	44

**LISTA DE SIGLAS**

ADA - adenosina deaminase  
ADO - adenosina  
ADP - adenosina difosfato  
Akt - Proteína quinase B  
AMP - adenosina monofosfato  
ATP - adenosina trifosfato  
BRAF - gene da serina/treonina quinase do tipo B  
cAMP - *cyclic adenosine 3,5-monophosphate*  
CAT - catalase  
CD - carcinomas diferenciados  
CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono  
CPD - carcinomas pouco diferenciados  
DNA - ácido desoxirribonucleico  
E-5'-NT - ecto-5'-nucleotidase  
E-NPP - ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase  
E-NTPDase - *ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase*  
ROS - espécies reativas de oxigênio  
GPx - glutaciona peroxidase  
GR - glutaciona redutase  
GSH - glutaciona reduzida  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio  
IRA - Iodo radioativo  
INCA - Instituto Nacional de Câncer  
MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno  
MDA - malondialdeído  
MEK - quinase de proteína quinase regulada por sinal extracelular  
MTT - (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio)  
NPSH - tióis não proteicos  
OA - laranja acridina  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - ânion superóxido

OH<sup>-</sup> - radicais hidroxila

ON - óxido nítrico

PAAF - Punção Aspirativa por Agulha Fina

PBMCS - células mononucleares do sangue periférico

PSH - tióis totais

RAS / RAF / MEK / ERK - *Mitogen-activated protein kinase/ kinase*

RET - *rearranged during transfection*

RET/PTC - *Rearranged During Transfection papillary thyroid cancer*

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SH - grupos sulfidríla

SOD - superóxido dismutase

T3 - tri-iodotironina

T4 - tiroxina

TMRE - tetrametilrodamina

TNM - tumor (T), linfonodo (N), metástase (M)

TRH - hormônio liberador de tireotrofina

TSH - hormônio tireoestimulante

UDP - difosfato de uridina

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1	OBJETIVOS .....	16
1.1.1	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>16</b>
1.1.1	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
2.1	CARCINOMA DE TIREOIDE .....	17
2.2	FITOQUÍMICO CAFEÍNA .....	25
2.3	AÇÃO DA CAFEÍNA NA GLÂNDULA TIREOIDE .....	27
2.4	SISTEMA PURINÉRGICO .....	28
2.5	SISTEMA PURINÉRGICO, TIREOIDE E CAFEÍNA.....	31
2.6	ESTRESSE OXIDATIVO .....	32
2.7	ESTRESSE OXIDATIVO, TIREOIDE E CAFEÍNA .....	34
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA / MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
3.1	LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA .....	36
3.2	PRODUTOS QUÍMICOS E REAGENTES .....	36
3.3	CULTURA CELULAR.....	36
3.4	CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCS) .....	36
3.5	CAFEÍNA .....	37
3.6	ENSAIOS REALIZADOS .....	37
3.6.1	<b>Ensaio de viabilidade celular pelo MTT .....</b>	<b>38</b>
3.6.2	<b>Ensaio de viabilidade celular pela microscopia com fluorescência .....</b>	<b>38</b>
3.6.3	<b>Teste de migração de celular .....</b>	<b>38</b>
3.6.4	<b>Marcadores do estresse oxidativo .....</b>	<b>39</b>
3.6.5	<b>Sistema purinérgico - avaliação da atividade das enzimas que hidrolisam nucleotídeos e nucleosídeo de adenina .....</b>	<b>39</b>
3.7	ANÁLISE DOS DADOS .....	39
3.8	FINANCIAMENTO .....	40
3.9	ASPECTOS ÉTICOS .....	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>49</b>

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO A - Publicação relacionada ao tema da dissertação.....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO B - Termo de Consentimento Livre Esclarecido .....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de tireoide é uma neoplasia com crescente registro de incidência, possivelmente relacionado ao acesso a exames de imagem como a ultrassonografia, ou a algum fator de risco ainda não evidenciado (ROSÁRIO et al., 2013; RUSS et al., 2017; US PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE et al., 2017; GHARIB, 2016; HAUGEN et al., 2016; PACINI et al., 2018). Apesar disso, a mortalidade por esse tipo de câncer segue estável, pois a maioria dos tipos de neoplasias de tireoide é composta por células diferenciadas, o que resulta em bom prognóstico porque habitualmente os casos são tratados e curados somente com exérese cirúrgica. Nos pacientes que apresentam a doença avançada, com metástase ou volume tumoral elevado, pode ser necessário a adjuvância com iodo radioativo (IRA) sistêmico. Dentre os subtipos de câncer de tireoide, o papilífero é o mais frequentemente diagnosticado (TUTTLE; HAUGEN; PERRIER, 2017).

Entretanto, em raros casos, observa-se refratariedade a essas medidas tradicionais tornando a neoplasia de tireoide uma doença sem cura e com tratamento apenas paliativo (PACINI et al., 2018; HAUGEN et al., 2016). Neste cenário, buscam-se alternativas terapêuticas que possam modificar o prognóstico e a qualidade de vida desses pacientes. Os fitoquímicos são substâncias encontradas na natureza e que já demonstraram em estudos *in vitro* propriedades anti-inflamatórias, e nos últimos anos vem sendo alvo de estudos relacionados a possível atividade antineoplásica (GONÇALVES; DE FREITAS; FERREIRA, 2017; ABOTALEB, M. et al., 2018).

A variedade de fitoquímicos existentes abre um leque de possibilidades em estudos com objetivo de encontrar alternativas a tratamentos sistêmicos para neoplasias malignas. Já são descritas as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes dos fitoquímicos em outras neoplasias, porém no campo da neoplasia de tireoide essas evidências são escassas e muitas substâncias ainda não foram estudadas para este fim.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo geral**

Avaliar a ação antitumoral da cafeína, em diferentes concentrações, na linhagem de carcinoma papilífero de tireoide TPC-1 e em células controle - células mononucleares do sangue periférico (PBMCS).

### **1.1.2 Objetivos específicos**

Avaliar, nas células TPC-1 tratadas com cafeína:

- A viabilidade celular pelos métodos MTT e microscopia com fluorescência;
- Verificar a migração celular pelo teste da ferida;
- Analisar a atividade das ectoenzimas do sistema purinérgico;
- Determinar os níveis dos marcadores de estresse oxidativo;
- Discutir o papel da sinalização purinérgica e do estresse oxidativo.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Carcinoma de tireoide

No Brasil, o câncer de tireoide é a neoplasia mais comum da região da cabeça e pescoço e afeta três vezes mais as mulheres do que os homens. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), para o ano de 2023 estima-se que o câncer de tireoide seja o terceiro tumor mais frequente em mulheres no Brasil (sem considerar o câncer de pele não-melanoma). As estimativas de novos diagnósticos de câncer de tireoide para o ano de 2023 são de 8.820 casos a cada 100 mil habitantes. Quanto à mortalidade no Brasil, no ano de 2020 a taxa bruta de mortalidade por câncer de tireoide foi de 0,4/100.000 habitantes em homens e mulheres (INCA, 2023). No mundo, a incidência de câncer de tireoide é de 3,1/100.000 habitantes nos homens e 10,1/100.000 habitantes nas mulheres, sendo a mortalidade 0,43/100.000 habitantes (WHO, 2020). As neoplasias de tireoide derivam de duas populações celulares: as células foliculares e as células C, sendo classificados em carcinomas diferenciados (CD), carcinomas pouco diferenciados (CPD) e indiferenciados. Os CD são os mais frequentes e se subdividem em papilífero (entre 50% e 80% dos casos), folicular (entre 15% e 20% dos casos) e de células de *Hürthle*. Os CPD (cerca de 10% dos casos) e os indiferenciados (também cerca de 10% dos casos) são menos comuns (GONÇALVES; DE FREITAS; FERREIRA, 2017). A linhagem celular TPC-1 de carcinoma papilífero diferenciado de tireoide é o mais bem definido por suas propriedades genéticas *in vitro* e *in vivo*, sendo muito utilizado em pesquisas nesse campo (PERNA et al., 2018).

Na maioria dos casos a neoplasia de tireoide trata-se de uma doença assintomática, sendo a avaliação diagnóstica iniciada a partir da identificação de nodulação na glândula tireoide. Segundo a Sociedade Brasileira de Endocrinologia aproximadamente 4-7% das mulheres e 1% dos homens apresentam nódulos palpáveis na tireoide ao exame físico, porém a prevalência de nódulos encontrados na população em geral em exames de ultrassonografia realizados por outros motivos é de até 68%. A grande maioria desses nódulos são benignos mas, caso sejam malignos, 95% deles são CD (ROSÁRIO et al., 2013).

Propõe-se que a incidência de neoplasias malignas de tireoide vem aumentando no Brasil devido a maior realização de exames ultrassonográficos identificando lesões assintomáticas. Entretanto, esse aumento na incidência não foi acompanhado de mudanças nos fatores de risco

conhecidos e tampouco gerou impacto na mortalidade, o que fez várias sociedades no mundo especializadas em estudos da tireoide questionarem o método de *screening*, já que a maioria das neoplasias nessa glândula possuem comportamento indolente (ROSÁRIO et al., 2013; RUSS et al., 2017; US PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE et al., 2017; GHARIB, 2016; HAUGEN et al., 2016; PACINI et al., 2018). Portanto, o rastreamento para neoplasias malignas de tireoide ficou restrito a pacientes que possuam fatores de risco e que apresentem nodulações palpáveis ao exame físico (INCA, 2019; ROSÁRIO et al., 2013; RUSS et al., 2017; US PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE et al., 2017; GHARIB, 2016; HAUGEN et al., 2016).

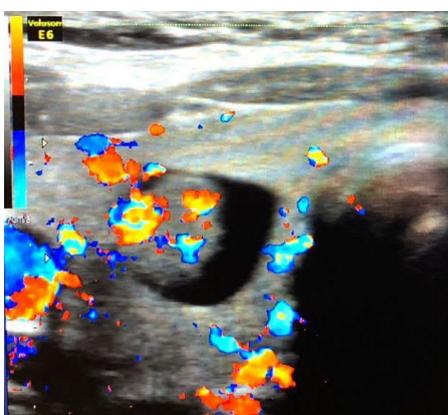
O hormônio tireoestimulante (TSH) é o principal regulador do crescimento e da função da tireoide. A presença de receptores para o estrógeno nas células neoplásicas da tireoide e a maior frequência em mulheres sugere também a participação dos hormônios sexuais femininos na gênese dessa neoplasia (CAVALHEIRO, 2022). Na carcinogênese hormonal, diferente da induzida por vírus ou agentes químicos, a proliferação celular não necessita de um agente iniciador específico. A participação dos hormônios na carcinogênese se restringe à proliferação das células já transformadas por outros carcinógenos. Os oncogenes, os genes supressores tumorais e os genes do reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) estão envolvidos na carcinogênese hormonal. Além disso, a carcinogênese tireoideana envolve conhecidos fatores ambientais (história de irradiação em região cervical e residir em localidades com dietas pobres em iodo) e genéticos (história familiar - *SRGAP1*, *TTF-1/NKX2.1*, *FOXE1*, *HABP2*, *SRRM2* e *MAP2K5*) (HOSKIN et al., 1994; KUMAR, 2013; RIBEIRO, 2018).

A carcinogênese caracteriza-se por mutações genéticas herdadas (germinativas) ou adquiridas (somáticas) influenciada por diversos agentes externos. Inicia-se com a exposição das células aos carcinógenos com consequente mutação e formação de clones celulares atípicos, finalmente perpetua-se pela multiplicação desses clones celulares (sendo que nessa fase a supressão do contato com os carcinógenos pode interromper o processo). Os principais alvos da alteração genética são os proto-oncogenes, os genes supressores tumorais e os genes que controlam a morte celular programada ou apoptose (CAVALHEIRO, 2022).

Além dos aspectos genéticos, ocorre uma importante relação com as respostas inflamatórias produzidas pelo dano ou necrose celular, sinalizadas pelo sistema purinérgico. No microambiente tumoral a expressão das ectoenzimas e a produção das biomoléculas são modificadas no intuito de favorecer a proliferação celular. Somando-se a essas modificações, a elevada produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o estresse oxidativo são reconhecidos como mecanismos presentes na carcinogênese, contribuindo para a manutenção e proliferação de

células neoplásicas, gerando peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas (HOSKIN et al., 1994; KUMAR, 2013; CAVALHEIRO, 2022).

Uma vez que seja identificado um nódulo na tireoide, se faz necessária uma análise quanto às características ultrassonográficas a fim de avaliar se há ou não necessidade de Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF). Através do exame citopatológico do material coletado pela PAAF é possível determinar os subtipos celulares presentes naquela amostra e orientar a conduta médica. Segundo o último *guideline* da Associação Americana de tireoide, os resultados da PAAF são submetidos à classificação de Bethesda (Figuras 1 e 2, Quadro 1) (HAUGEN et al., 2016).



**Figura 1** - Aspecto ultrassonográfico de uma lesão sólido-cística em lobo direito da tireoide, com indicação de estudo citopatológico via PAAF. Áreas em cores com equivalência de neovascularização em área adjacente à lesão e no interior da porção sólida. Fotografia arquivo pessoal do Prof. Dr. Marcelo Moreno.



**Figura 2** - PAAF guiada por ultrassonografia, onde é possível notar estrutura linear hiperecogênica (agulha) em contato com área sólida suspeita para malignidade, de uma lesão sólido-cística de lobo direito da tireoide. Fotografia arquivo pessoal do Prof. Dr. Marcelo Moreno.

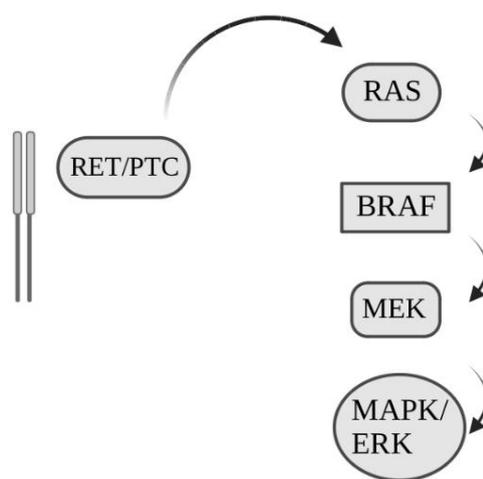
**Quadro 1** - Classificação de Bethesda - Associação Americana de Tireoide.

<b>Classificação</b>	<b>Significado clínico</b>	<b>Conduta sugerida</b>
Bethesda I	Não diagnóstico	nova coleta de PAAF
Bethesda II	Achados benignos	Seguimento clínico
Bethesda III	Achados inconclusivos	Nova coleta de PAAF, avaliação molecular, seguimento clínico ou exérese cirúrgica para avaliação de anatomopatológico
Bethesda IV	Achados suspeitos para malignidade	Nova coleta de PAAF, avaliação molecular, seguimento clínico ou exérese cirúrgica para avaliação de anatomopatológico
Bethesda V	Achados malignos	Terapêutica definitiva com exérese cirúrgica

Adaptado de HAUGEN et al., 2016.

No caso de citologia duvidosa (Bethesda III ou IV), algumas mutações genéticas já foram descritas no carcinoma de tireoide e a presença do exame genético na amostra celular é uma ferramenta diagnóstica complementar. Uma delas é associada ao gene da serina/treonina quinase do tipo B (*BRAF*), que codifica uma serina/treonina quinase do tipo B, realiza a transdução da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e tem como principais substratos as quinases de proteína quinase regulada por sinal extracelular (MEK) 1 e 2. A mutação desse gene na posição *BRAFV600E* é a mais frequente encontrada no CD, onde ocorre troca de uma valina por um glutamato com ação oncogênica através da mediação constitutiva da via *mitogen-activated protein kinase/ kinase* (RAS/RAF/MEK/ERK). Outro gene definido é o *RET* (do inglês *rearranged during transfection*), que codifica uma proteína de membrana tirosina quinase que não é fisiologicamente expressa nas células da tireoide, sendo essa alteração proveniente de um rearranjo cromossomal formado pela fusão de um domínio tirosina quinase intracelular na porção 30 do gene *RET* com a terminação 50 de um gene heterólogo, levando a ativação de uma forma

truncada da proteína, conhecida como *rearranged during transfection papillary thyroid cancer (RET/PTC)*. Tanto a mutação *BRAF* quanto a *RET/PTC* resultam na ativação da MAPK, mesmo sendo associadas a fenótipos diferentes (Figura 3). As ativações nestas vias estimulam a proliferação celular e, portanto, a gênese neoplásica. A presença destas mutações em células provenientes de citoaspirados, associada a suspeita de malignidade, reforça prosseguimento para ressecção cirúrgica (GONÇALVES; DE FREITAS; FERREIRA, 2017).



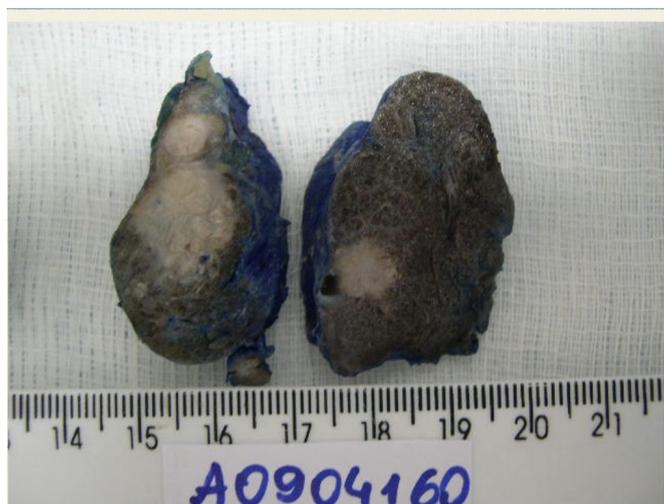
**Figura 3** - Sinalização molecular na proliferação celular em neoplasias tireoideanas.

Figura demonstrando a via de sinalização molecular envolvida com os genes *RET/PTC* e *BRAF*. Elaborado pela autora utilizando o BioRender.

Para as lesões submetidas a ressecção cirúrgica, realiza-se estadiamento após análise anatomopatológica considerando as características do tumor ressecado (tamanho, extensão) e a presença de metástases linfonodais e/ou sistêmicas para definir o estágio patológico da doença, conforme as diretrizes da *American Joint Committee on Cancer*, essencial para definir as próximas condutas (TUTTLE; HAUGEN; PERRIER, 2017).

Os CD são considerados neoplasias malignas de bom prognóstico, com uma taxa de sobrevida de 93–95%. Devido ao comportamento biológico indolente, alguns casos selecionados de CD são tratados apenas com vigilância ativa. Entretanto, a maioria é submetida a ressecção tumoral com objetivo de buscar a cura e reduzir o risco de persistência ou recorrência da doença e morbidades associadas, além de permitir estadiamento e estratificação de risco acurados para minimizar terapêuticas desnecessárias. Geralmente, em pacientes com risco de recorrência baixo a intermediário possuem neoplasias T1 a T2, N1a a N1b e M0-X [(de acordo com a classificação TNM - Tumor (T), Linfonodo (N) e Metástase (M)]. Os pacientes com neoplasias de risco intermediário a alto risco de recidivas, ou seja, com doença classificada em T3 ou T4, qualquer N

e/ou M, é necessária a realização de tratamento adjuvante com IRA (Figura 4 e Quadro 2) (PACINI et al., 2018; HAUGEN et al., 2016).



**Figura 4** - Aspecto macroscópico de uma tireoide com carcinoma papilífero multifocal (áreas claras). Nesse caso, a classificação "T" é definida pelo nódulo maior (T2). Fotografia arquivo pessoal do Prof. Dr. Marcelo Moreno.

**Quadro 2** - Classificação Tumor (T), Linfonodo (N) e Metástase (M), de acordo com Union for International Cancer Control (UICC) e pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC), para neoplasias malignas de tireoide.

Idade ao diagnóstico inferior a 55 anos			
Estágio I	Qualquer T	Qualquer N	M0
Estágio II	Qualquer T	Qualquer N	M1 - presença de metástase a distância
Idade ao diagnóstico igual ou superior a 55 anos			
Estágio I	T1 - tumor com 2 cm ou menos na maior dimensão limitado à tireoide	N0 - sem evidência de acometimento linfonodal / NX - linfonodos não puderam ser avaliados	M0
Estágio II	T2 - tumor maior do que 2 cm mas com até 4 cm em maior dimensão limitado à tireoide	N0 / NX	M0
	T1	N1 - metástase	M0

		para linfonodos regionais	
	T2	N1	M0
Estágio III	T3a - tumor > 4 cm limitado à tireoide / T3b - extensão extratireoidiana macroscópica que invadem apenas os músculos esterno-hioideo, esternotireoideo, tireo-hioideo ou omo-hioideo, de um tumor de qualquer tamanho	Qualquer N	M0
Estágio IV	T4a - extensão extratireoidiana macroscópica invadindo tecidos moles subcutâneos, laringe, traquéia, esôfago ou nervo laríngeo recorrente de um tumor de qualquer tamanho	Qualquer N	M0
	T4b - extensão extratireoidiana macroscópica invadindo a fáscia pré-vertebral ou envolvendo artéria carótida ou vasos mediastinais de um tumor de qualquer tamanho	Qualquer N	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

Adaptado de PACINI et al., 2018; HAUGEN et al., 2016.

Posteriormente, os pacientes são acompanhados com estratificação de risco dinâmico após o tratamento inicial para avaliar o risco de recorrência e a forma como o seguimento deve ser realizado. A cada avaliação é realizada uma nova estratificação de risco de recorrência, definindo a frequência de seguimento e o grau de supressão de TSH (a terapêutica adjuvante de supressão do TSH tem como objetivo evitar a estimulação hipofisária de possíveis remanescentes), conforme as informações do Quadro 3 (PACINI et al., 2018; HAUGEN et al., 2016).

**Quadro 3** - Estratificação de risco dinâmico pós terapêutica inicial no carcinoma de tireoide.

Estratificação de risco	Detalhamento
Pacientes após tireoidectomia total	
Resposta excelente	Imagem e laboratoriais negativos
Resposta bioquímica incompleta	Tireoglobulina detectável ou anti-tireoglobulina positiva

Resposta estrutural incompleta	Imagem com evidência de ressecção incompleta
Pacientes após tireoidectomia subtotal	
Resposta excelente	Imagem e laboratoriais negativos
Resposta bioquímica incompleta	Tireoglobulina ou anti-tireoglobulina em ascensão
Resposta estrutural incompleta	Imagem com evidência de ressecção incompleta
Resposta indeterminada	Achados inespecíficos na imagem e/ou tendência da tireoglobulina não acessível

Adaptado de PACINI et al., 2018; HAUGEN et al., 2016.

Os fatores de risco para comportamento agressivo e recorrência da neoplasia são irradiação cervical prévia, extensão extra tireoidiana na ultrassonografia, localização posterior ou subcapsular, tumor multifocal ou bilateral, coexistência com doença de Graves, suspeita de envolvimento linfonodal, citologias agressivas e presença de variante patogênica do gene *BRAF* (PACINI et al., 2018).

Em torno de 5% de todos os pacientes com CD apresentam metástases a distância no diagnóstico. Destes, 30% obtêm cura com uso de IRA e os demais apresentam refratariedade a esta terapêutica (doença metastática não captante de iodo ou metástase que mesmo sensível a iodo apresenta aumento de dimensões com uso de até 600 mCi de IRA) e necessitarão de outras terapias, sendo a sobrevivência nesses casos significativamente menor. A terapia sistêmica com inibidores multiquinase é a única opção nessa situação atualmente, apesar de não ser uma terapêutica curativa e possuir importantes eventos adversos. O uso desses inibidores pode ser considerado na doença localmente avançada ou metastática que seja resistente à IRA e que não possa ser abordada localmente, com progressão rápida e sintomatologia significativa ou presença de lesões ameaçadoras à vida. Os objetivos nesse caso são reduzir a taxa de crescimento tumoral e o impacto da doença para permitir sobrevida livre de progressão e controlar sintomas locais. A quimioterapia tradicional é considerada apenas em casos refratários ou com contraindicações e essa terapêutica (PACINI et al., 2018; HAUGEN et al., 2016).

Alguns pacientes com CD podem piorar o prognóstico durante o seguimento clínico. O principal mecanismo para essa modificação no comportamento do CD é a desdiferenciação celular, que pode ocorrer em até 5% dos casos. É consequência de uma transição epitelial-mesenquimal, na qual múltiplas transformações bioquímicas e morfológicas

possibilitam células epiteliais polarizadas a assumir um fenótipo mesenquimal, aumentando a proliferação, migração e habilidade de invasão, além de resistência a apoptose. Além desse mecanismo, ocorre redução ou perda da expressão de alguns marcadores de diferenciação de tireócitos, como o simportador de iodeto de sódio e a tireoglobulina. Clinicamente, a desdiferenciação é a responsável pela perda da capacidade de captação de iodo pelas células, podendo limitar o uso de IRA. Alguns compostos podem retardar ou interromper o processo de desdiferenciação, além de atuar na modulação da sinalização purinérgica, em receptores celulares específicos e na modulação da produção de ROS, sendo possíveis ferramentas na terapia do carcinoma de tireoide. Nesse contexto, os fitoquímicos são possíveis candidatos através de suas propriedades antioxidantes (GONÇALVES; DE FREITAS; FERREIRA, 2017; MAKIYAMA et al., 2023).

## 2.2 Fitoquímico cafeína

Os fitoquímicos são elementos químicos de origem vegetal, encontrados em frutas, verduras, leguminosas, grãos e outros tecidos vegetais que possuem atividade biológica. Se apresentam em composição e quantidade extremamente variáveis nos alimentos e podem ser classificados quanto à estrutura química conforme a Figura 5 (BAENA, 2015; PANG et al., 2021; ABOTALEB et al., 2018).

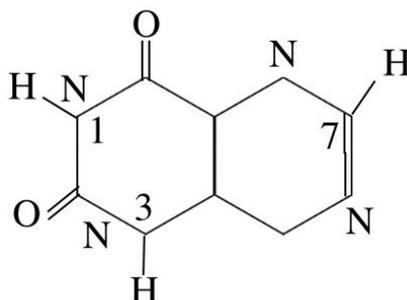


**Figura 5** - Classificação da cafeína como fitoquímico.

Modificado de LIU, 2013.

As metilxantinas são originadas de bases purínicas consideradas alcalóides devido sua atividade biológica e presença do nitrogênio heterocíclico (Figura 6) (MATOS, 2014). São derivados metilados da 2,6-dioxipurina ou xantina. Possuem uma estrutura básica onde os hidrogênios nas posições 1, 3 e 7 são trocados por substituintes metílicos, sendo as mais

abundantes a cafeína (1,3,7- trimetilxantina) e as isoméricas teofilina (1,3-dimetilxantina) e teobromina (3,7-dimetilxantina) (ARAGÃO et al., 2009).

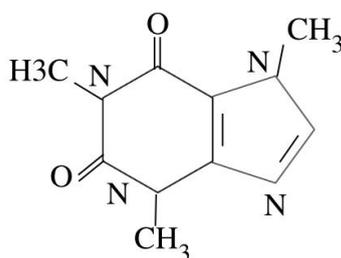


**Figura 6** - Estrutura bioquímica das xantinas.

Adaptado de PECKOLT, 1943.

As principais metilxantinas são encontradas em várias bebidas como café e chás e vem sendo exaustivamente estudadas devido às suas propriedades estimulantes do sistema nervoso central e antioxidantes (MATOS, 2014). Possivelmente, as xantinas são os estimulantes mais antigos conhecidos sendo que, neste contexto, a cafeína é um dos mais potentes (BRENELLI, 2003).

Nesse contexto, o café é uma das bebidas mais populares no mundo. Existem mais de 70 espécies de *Coffea L.*, que possuem vários componentes bioativos. Dentre eles, a cafeína ( $C_8H_{10}N_4O_2$ ; 1, 3, 7-trimetilxantina) cuja estrutura bioquímica está descrita na Figura 7 (QIU et al., 2019; LICZBINSKI; BUKOWSKA, 2022; ISMAIL et al., 2021).



**Figura 7** - Estrutura bioquímica da cafeína.

Adaptado de PECKOLT, 1943.

A composição do café e concentração de seus bioativos sofre influência de inúmeros fatores como o método de produção, preparação e até armazenamento. O tipo de grão, o cultivo, as condições climáticas e o processamento podem ser responsáveis por alterar as propriedades

dessa substância. A torrefação pode degradar aproximadamente 1-2% da cafeína. Um copo de 25 mL de café expresso contém aproximadamente 2,4 mg/mL de cafeína, enquanto a mesma quantidade sendo preparada de forma filtrada entrega apenas 1,4 mg/mL (ISMAIL et al., 2021; QIU et al., 2019; SHIN; HWANG; CHOI, 2019; GAASCHT; DICATO; DIEDERICH, 2015; LICZBINSKI; BUKOWSKA, 2022).

As propriedades medicinais do café são atribuídas a uma variedade de seus componentes. O consumo de cafeína (400mg/dia) mostrou-se seguro e apresenta propriedades antioxidantes, sendo utilizada na formulação de vários medicamentos analgésicos e anti-inflamatórios além da redução de risco de várias doenças, inclusive das neoplasias (GROSSO et al., 2017; ZAMORA-ROS et al., 2019; HAN; KIM, 2017; GAASCHT; DICATO; DIEDERICH, 2015; ISMAIL et al., 2021; OSARIEME; MODUPE; OLUCHUKWU, 2019; ABREU, 2014). Depois de ingerido por via oral, o café é rapidamente absorvido no intestino com insignificante efeito de primeira passagem. Posteriormente é metabolizado no fígado através do citocromo P450 1A2 que leva à biossíntese da cafeína. Esta é catalisada por três metiltransferases (ácido salicílico, ácido benzóico e teobromina metiltransferase), sendo excretada na urina na forma de seus principais metabólitos: 1-metilxantina, ácido 1-metilúrico, 5-acetamino-6-formilamino-3-metiluracil e 1,7-dimetilurico (ISMAIL et al., 2021; QIU et al., 2019). Estudos epidemiológicos recentes sugerem que o consumo de café diminui o risco de alguns tipos de cânceres, como câncer de cólon, fígado, mama, endométrio e hepatocelular (ABREU, 2014).

### **2.3 Ação da cafeína na glândula tireoide**

Na literatura existem apenas descrição de estudos em animais relacionando a glândula tireoide com a cafeína, demonstrando redução dos níveis de tri-iodotironina (T3) e da proporção entre T3 e Tiroxina (T4) em ratos, devido a possível inibição de conversão periférica de T4 em T3, além de redução na secreção de TSH (KAMELY; KARIMI; RAHIMI, 2016; SPINDEL et al., 1980). Clozel e seu grupo encontraram redução no T4 livre de ratos recém-nascidos, por possível aumento de conversão periférica em T3 ou inibição direta na síntese de T4. A secreção de TSH poderia ser influenciada pela exposição crônica à cafeína, reduzindo sua capacidade de responder ao *feedback* do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) hipotalâmico. Entretanto, os ratos nascem com eixo hipotálamo hipófise imaturo, o que pode diferenciar de fetos humanos

que já nascem com responsividade maior ao TRH fetal (CLOZEL et al., 1983). As evidências em seres humanos são mais complexas devido a vários vieses, porém é sugerida uma influência transitória no TRH. O consumo de cafeína por adultos saudáveis que normalmente bebem de 2-3 xícaras de café não foi capaz de causar mudanças nos níveis séricos de TSH e T3 após 4 horas da exposição. (OLIVEIRA et al., 2018).

## 2.4 Sistema purinérgico

O sistema purinérgico é constituído por moléculas sinalizadoras, enzimas e receptores e participa de uma série de efeitos biológicos como a estimulação (ou inibição) da morte celular, proliferação, migração, diferenciação, secreção de fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, sendo localizado em praticamente todas as células do organismo (CARDOSO; MANFREDI; MACIEL, 2021; MANICA, 2019; CAVALHEIRO, 2022).

Este sistema compõe-se de três grupos: as biomoléculas, que são nucleotídeos formados por uma base nitrogenada, um grupo fosfato e uma ribose ou desoxirribose (principalmente adenosina trifosfato - ATP, adenosina difosfato - ADP e adenosina monofosfato - AMP) e os nucleosídeos que diferem dos primeiros por não possuírem o grupo fosfato adenosina (ADO); os receptores purinérgicos que dividem-se em dois grupos, os receptores de ADO (P1), com quatro subtipos e os receptores P2, subdivididos na família P2X (ionotrópicos ligados a canais na membrana plasmática) e P2Y (metabotrópicos acoplados à proteína G); finalmente, existem as enzimas, que são responsáveis por hidrolisar as biomoléculas e compreendem as ectonucleotidasas (ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase – (E-NPP), E-NTPDases (do inglês *ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase* - e seus subtipos, como a E-NTPDase1/CD39), ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT/CD73) e fosfatases alcalinas, além da adenosina deaminase (ADA) (MARAFON, 2022).

As E-NTPDases e as E-NPPs catalisam a hidrólise do ATP e ADP formando AMP, que através da enzima E-5'-NT será hidrolisada em ADO e finalmente degradada pela ADA gerando inosina que é um metabólito inativo. Este é convertido em hipoxantina, oxidado a xantina e metabolizado em ácido úrico (NOAL, 2012).

Dentre as biomoléculas, o ATP é uma das principais e atua como molécula energética na fosforilação oxidativa no meio intracelular, promovendo a liberação de energia quando degradado em ADP e AMP. Após a liberação, o ATP é degradado pelas ectonucleotidasas. No

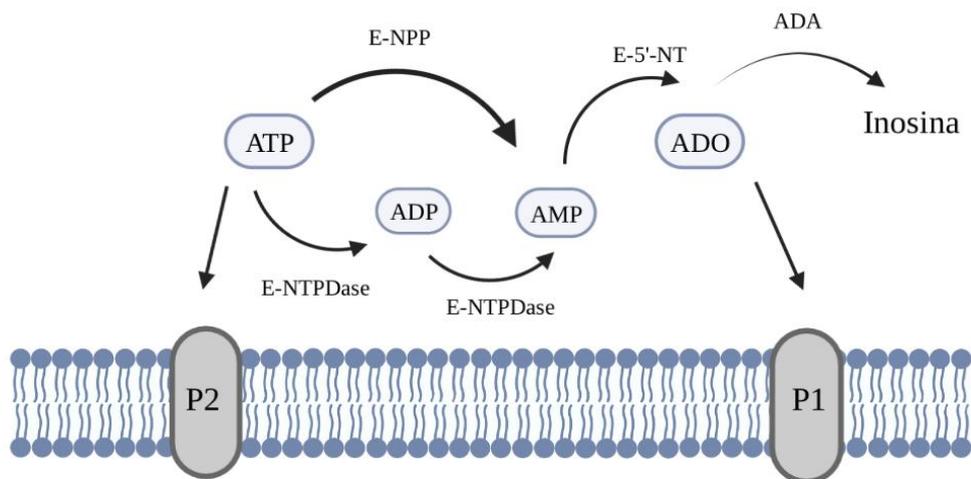
meio extracelular, o ATP tem uma meia vida curta e age como sinalizador. Sua ação irá depender da concentração, localidade e receptor acoplado, podendo apresentar atividades diferenciadas conforme o meio. Quando em baixas concentrações e ligado a receptores do tipo P2Y, o ATP promove efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores. Entretanto, quando essa biomolécula se apresenta em maior quantidade promove efeitos pró-inflamatórios e induz dano celular (MARAFON, 2022; BAGATINI et al., 2018). O ADP no meio extracelular atua como um mediador primário da ativação plaquetária, contribuindo para a homeostasia e formação de trombos, através do seu efeito agregador após danos teciduais. O AMP é um metabólito intermediário da hidrólise do ATP que exerce a função de sinalizador em situações de desequilíbrio metabólico, servindo como substrato para a formação da ADO (CAVALHEIRO, 2022).

A ADO é um nucleosídeo sinalizador de dano celular, produzido tanto intra como extracelularmente por degradação enzimática, tendo ação citoprotetora por mediar ações anti-inflamatórias e imunossupressoras. Após ligação a seus receptores específicos, promove o aumento ou diminuição dos níveis de AMPc e consequentemente direcionando a via da proteína cinase ativada por mitógeno MAPK, fosfatidilinositol 3-cinase ou fosfolipase C (MARAFON, 2022; BAGATINI et al., 2018). Os receptores de ADO promovem a ativação da MAPK, levando à sobrevivência, crescimento celular e diferenciação além de modular a atividade da adenilato ciclase que promove a regulação da concentração intracelular de AMPc (MARAFON, 2022; CAVALHEIRO, 2022).

Os receptores P2Y reconhecem ATP e vários outros nucleotídeos, incluindo ADP, trifosfato de uridina, difosfato de uridina (UDP) e UDP-glicose e modulam a sinalização pela regulação dos níveis intracelulares de AMPc, desencadeando assim seus mecanismos de transdução de sinal. Os receptores P2X tem como agonista principal o ATP e o subtipo P2X7 exerce um papel diferenciado ao induzir a formação de poros de condução levando a apoptose. A expressão dos purinoreceptores P2Y e P2X em células imunes e inflamatórias promove a modulação de respostas-chave, como quimiotaxia e liberação de citocinas (MARAFON, 2022; MÂNICA, 2019; BAGATINI et al., 2018; CAVALHEIRO, 2022).

As ectoenzimas purinérgicas regulam a concentração extracelular de ATP e ADO, portanto, as moléculas de nucleotídeos, após desempenhar suas funções orgânicas, são degradadas de modo a manter seus níveis extracelulares em concentrações fisiológicas. A atuação destas ectoenzimas compreende a hidrólise dos nucleotídeos extracelulares em seus respectivos nucleosídeos, para tanto, as ectonucleotidases estão ancoradas à membrana celular,

com o sítio ativo voltado ao ambiente extracelular, podendo estar presente também em forma solúvel no meio intersticial. A E-NPP catalisa a hidrólise de ATP em AMP, as E-NTPDases hidrolisam tanto ATP em ADP e ambas em AMP. A E-5'-NT promove a hidrólise do AMP em ADO e a ectoenzima ADA tem como função promover a desaminação da ADO em inosina e a deficiência dessa enzima ocasiona o acúmulo de subprodutos tóxicos da degradação de purinas (Figura 8) (MARAFON, 2022; BAGATINI et al., 2018).



**Figura 8 - Ilustração com sumário das moléculas principais que compõem o sistema purinérgico.**

Elaborado pela autora com o uso do BioRender.

Fisiologicamente as biomoléculas purinérgicas são encontradas no meio extracelular em baixas concentrações e esse equilíbrio é um fator crucial na homeostase imune. Em algumas condições, como em resposta ao dano celular nos sítios inflamatórios ou ao estresse oxidativo, a quantidade das biomoléculas pode ser modificada e comprometer de diversas maneiras a resposta do organismo de acordo com sua concentração, taxa de degradação e expressão de receptores (CARDOSO; MANFREDI; MACIEL, 2021).

## 2.5 Sistema purinérgico, tireoide e cafeína

A análise imuno-histoquímica da tireoide demonstrou que há a expressão de diversos receptores do sistema purinérgico nas células foliculares e endoteliais da família P2X e P2Y. Nas disfunções glandulares, o equilíbrio de nucleotídeos extracelulares e ADO é afetado: no

hipotireoidismo a E-NPP, E-5'-NT e alguns subtipos de E-NTPDases apresentam atividade elevada, aumentando níveis de ADO e a hidrólise do AMP a ADO. Já no hipertireoidismo, níveis de ATP, ADP e AMP estão aumentados devido a redução da atividade dessas enzimas, diminuindo a hidrólise dessas biomoléculas (CARDOSO; MANFREDI; MACIEL, 2021; BJELOBABA; JANJIC; STOJILKOVIC, 2015; BALDISSARELI, 2017).

Além da influência nas tireoidopatias, o sistema purinérgico atua como uma via de sinalização importante na progressão de células tumorais, pois nesta condição existe um desbalanço na concentração das biomoléculas e modificação na expressão dos receptores. Nos casos de neoplasia tireoidiana, estudos mostram que a atividade da E-NTPDase se encontra reduzida, levando a aumento de concentração extracelular de ATP. Sugere-se que essa redução da hidrólise de ATP poderia representar uma tentativa de autoproteção exercida pelas células, pois o ATP também pode exercer efeitos antitumorais. Também se observou redução da hidrólise de ADP pela E-NTPDase, o que poderia relacionar essa biomolécula a eventos tromboembólicos frequentemente associados a neoplasias. A hidrólise do AMP pela E-5'-NT sofre um aumento significativo nas plaquetas dos pacientes com neoplasia, levando a geração de ADO, sendo um dos passos cruciais para a progressão tumoral. O aumento de ADO está associado à neovascularização tumoral, invasividade e metástase e com menor tempo de sobrevivência dos pacientes. A ectoenzima ADA seria responsável por hidrolisar a ADO a moléculas inativas, porém na condição de neoplasia a atividade da ADA também se encontra reduzida, perpetuando o excesso de ADO extracelular (CAVALHEIRO, 2022; MALDONADO et al., 2012; ZANINI et al., 2012; BURNSTOCK, 2014).

Além disso, as células de carcinoma papilífero de tireoide expressam o receptor P2X7 que se relaciona com fatores de mau prognóstico, além de diversos subtipos de receptores P2Y. Ligando-se neste receptor o ATP promove aumento intracelular de sódio e cálcio além de ativação de vias sinalizadoras da fosfatidilinositol 3 quinase, AKT, fator induzido por hipóxia  $1\alpha$  e fator nuclear kappa B, induzindo a proliferação de células neoplásicas. A ativação desse receptor também promove efluxo de potássio, modulando a atividade do inflamassoma. A ligação do ATP aos receptores P2Y gera estímulo à diferenciação celular. A ativação do P2Y2 permite a migração de células cancerígenas do sangue para o espaço extravascular, promovendo metástases. O ATP também estimula a liberação de metaloproteinases da matriz que promovem degradação da matriz extracelular e invasão de células tumorais (MALDONADO et al., 2012; ABREU, 2014; MARAFON, 2022; CARDOSO; MANFREDI; MACIEL, 2021).

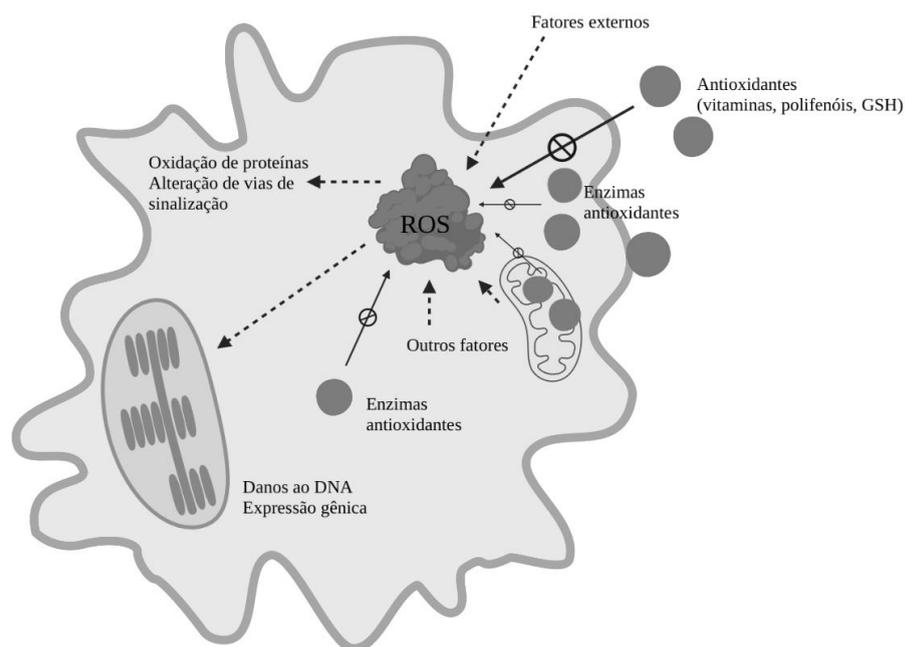
Devido à semelhança estrutural entre a cafeína e a ADO, a cafeína tem a capacidade de se ligar e antagonizar não seletivamente os receptores purinérgicos P1, impedindo a ação da ADO, supostamente reduzindo a angiogênese que é um processo fundamental para o crescimento do tumor e metástases. Também tem sido demonstrada sua participação na redução do crescimento de tumores via apoptose através da ligação aos receptores P1 expressos nas células tumorais (ABREU, 2014).

## 2. 6 Estresse oxidativo

A oxidação das moléculas gera ROS, instáveis de e meia vida curta, muito reativas devido ao fato de possuírem um ou mais elétrons externos desemparelhados, incluem o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e radicais hidroxila ( $OH^-$ ). Em quantidades acima das fisiológicas e em combinação com supressão dos agentes antioxidantes geram o estresse oxidativo. Essa condição é nociva a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, alterando suas funcionalidades gerando oxidação de carboidrato e ácidos, reticulação de proteínas do DNA, alterações na estrutura das bases nitrogenadas, oxidação das proteínas e oxidação de tióis ocasionando a perda da atividade das proteínas, inibição da atividade enzimática, desativação de receptores e peroxidação lipídica, ocasionando impactos a estrutura das membranas com perda da integridade destas, além da formação de aldeídos reativos e da migração descontrolada de compostos bioativos. Além disso, ocorre aumento da expressão de oncogenes que podem contribuir para a carcinogênese. O principal alvo da peroxidação por ROS são os ácidos graxos poli-insaturados nos lipídios da membrana, levando à formação de peróxidos lipídicos como o malondialdeído (MDA) (CAVALHEIRO, 2022; MARAFON, 2022; MÂNICA, 2019).

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das ROS. Os antioxidantes são representados pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) localizadas no citoplasma, mitocôndria e na matriz extracelular, que catalisam a dismutação do  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  e  $O_2$ ; a catalase (CAT), que atua na decomposição de  $H_2O_2$  a  $O_2$  e  $H_2O$ ; a glutatona peroxidase (GPx), que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutatona como co-fator; a glutatona redutase (GR); a peroxirredoxina e finalmente a tioredoxina. Além das enzimas citadas, outros compostos atuam na eliminação das ROS, que compreendem os antioxidantes não enzimáticos e os antioxidantes exógenos, como a vitamina C, vitamina E, os carotenoides, os polifenóis e uma diversidade de

minerais. Entretanto, nesse grupo destacam-se os compostos contendo grupos sulfidríla (SH) chamados tióis, cuja capacidade de evitar a oxidação deve-se, geralmente, ao átomo de enxofre que pode facilmente acomodar a perda de elétron. A glutatona reduzida (GSH) é o tiol não-proteico mais abundante presente nas células animais e dentre as funções celulares se destacam a capacidade de transformar as vitaminas C e E oxidadas em suas formas originais, sua participação na síntese e no reparo da molécula de DNA, sua utilização pelo fígado na desintoxicação de compostos tóxicos e seu papel protetor frente às proteínas. A GSH participa na decomposição do  $H_2O_2$ , potencialmente tóxico, que é convertido em água na reação catalisada pela GPx. A glutatona oxidada resultante é reciclada à forma reduzida pela GR e dinucleotídeo de nicotinamida e adenina. Dessa forma, este processo de reciclagem e consequente manutenção de níveis adequados de GSH pode prevenir o dano celular causado pelo estresse oxidativo (Figura 9) (MÂNICA, 2019; CAVALHEIRO, 2022; MARAFON, 2022).



**Figura 9 - Principais mecanismos celulares envolvidos no estresse oxidativo.**

Elaborado pela autora com o uso do BioRender.

## 2.7 Estresse oxidativo, tireoide e cafeína

Nas doenças tireoidianas o estresse oxidativo pode induzir disfunção endotelial e aumentar a reatividade plaquetária através de efeitos diretos sobre as plaquetas, como aumento

da peroxidação lipídica e depleção de sistemas de defesa antioxidante. Em conjunto, esses mecanismos podem contribuir para o aumento do potencial trombótico evidenciado no hipotireoidismo. Além disso, sugere-se que o aumento da produção de ROS poderia ser um dos responsáveis pelos níveis de ADO diminuídos no hipertireoidismo (CARDOSO; MANFREDI; MACIEL, 2021).

O desenvolvimento do câncer corresponde a ação de múltiplos eventos, nos quais as ROS encontram-se envolvidas em todas as etapas e seu efeito é diretamente proporcional ao tipo e à reatividade dos radicais envolvidos. Inicialmente ocorrem as mutações do DNA resultantes da desaminação das bases nitrogenadas e oxidação da guanina que promove a quebra das fitas, apresentando um efeito oncogênico por meio de replicação, transcrição e tradução alteradas, podendo promover alterações nos principais genes supressores tumorais e mutações em genes codificadores que regulam o processo do estresse oxidativo, perpetuando o mesmo. Níveis elevados de ROS resultam em peroxidação de lipídios de membranas, que contêm ácidos graxos insaturados, muitos deles poli-insaturados e, portanto, suscetíveis à oxidação por estas substâncias, que além de causarem peroxidação lipídica, causam oxidação de proteínas, perda ou enfraquecimento da estrutura e função da membrana celular, além de geração de produtos de aldeído como a acroleína, crotonaldeído, MDA e 4-hidroxi-2-nonenal. Além disso, as ROS também promovem a liberação de fatores angiogênicos, como o VEGF, atuando também na progressão do câncer (MARAFON, 2022; CAVALHEIRO, 2022). O estresse oxidativo também está envolvido no processo de carcinogênese por outros mecanismos: metabolismo energético alterado pela condição geral do paciente ou por efeitos colaterais de medicamentos utilizados nessas condições, como caquexia, náuseas e vômitos, os quais impedem uma nutrição normal e, portanto, um suprimento normal de nutrientes como vitaminas antioxidantes, que levam a um desequilíbrio entre antioxidantes e oxidantes e ativação crônica inespecífica do sistema imune com uma produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, o que, por sua vez, podem aumentar a produção de ROS (CAVALHEIRO, 2022).

Excessos na produção de ROS estão associados a mecanismos de resistência à terapêuticas tradicionais, sendo que a desregulação desse metabolismo redox também pode ser responsável por resposta inadequada aos tratamentos e também pelos efeitos colaterais que mais afetam a qualidade de vida dos pacientes portadores de neoplasias (MIRANDA-GALVIS et al., 2021). Evidências científicas indicam que compostos antioxidantes podem auxiliar o prognóstico de tumores, principalmente aqueles provenientes de frutas e vegetais, que possuem elevado teor de compostos bioativos categorizados em fitoquímicos (como por exemplo a cafeína),

micronutrientes (vitaminas e minerais) e fibras. Esses compostos possuem propriedades anti-inflamatórias, são reguladores imunológicos e atuam como antioxidantes, reduzindo a produção de ROS que favorecem o microambiente tumoral e conseqüentemente protegendo contra o estresse oxidativo. A cafeína mostrou efetiva inibição da peroxidação lipídica *in vitro* induzida por ROS em microsossomos de fígado de rato, sendo seu potencial antioxidante semelhante ao da glutatona e superior ao do ácido ascórbico (MIRANDA-GALVIS et al., 2021; MARAFON, 2022; CAVALHEIRO, 2022).

Além disso, a exposição a cafeína em células neoplásicas demonstrou aumento endógeno na produção de óxido nítrico (ON), sendo esta uma das possíveis causas de indução de morte celular. O ON é uma molécula sinalizadora gerada por diversas vias, podendo interferir em processos homeostáticos e patológicos. Pode apresentar efeitos pró tumorais em concentrações baixas, porém o aumento da sua concentração, seja por liberação de granulócitos vigilantes, pela própria célula tumoral ou mesmo por tratamentos experimentais está relatada como promotora de apoptose (YARLAGADDA et al., 2017).

### **3 METODOLOGIA / MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de desenvolvimento da pesquisa**

Os ensaios foram desenvolvidos nos Laboratórios de Cultivo Celular, Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Chapecó, SC.

#### **3.2 Produtos químicos e reagentes**

Os produtos químicos e reagentes utilizados para este estudo são de alto grau analítico adquiridos da Sigma-Aldrich (SigmaAldrich, St. Louis, Estados Unidos da América) e Merck (Darmstadt, Alemanha). Os plásticos e reagentes utilizados para os procedimentos de cultura de células foram obtidos na Gibco™ Thermo Fisher Scientific (Grand Island, Nova Iorque, Estados Unidos da América) e Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, Estados Unidos da América). Todos os ensaios espectrofotométricos foram lidos usando um leitor de 96 microplacas SpectraMax® i3 Multimode Plate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, Estados Unidos da América).

#### **3.3 Cultura celular**

A cultura de células provenientes de carcinoma papilífero de tireoide, linhagem celular TPC-1, foi obtida no banco de células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em frascos com meio *Roswell Paryk Mamorial Institute* (RPMI)-1640 modificado para conter 2 mM de L-glutamina, 10 mM de ácido hidroxietil piperazineetanesulfônico, 1 mM de piruvato de sódio, 4500 mg/L de glicose com soro fetal bovino até uma concentração final de 10%. Após o preparo, as células foram mantidas em uma incubadora umidificada a 37 °C com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), passaram por avaliação quanto à presença de contaminação diariamente e o meio de cultura foi trocado a cada dois dias.

#### **3.4 Células mononucleares do sangue periférico (PBMCS)**

As PBMCS foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade dos compostos em células não tumorais. Foi coletado sangue periférico por punção venosa de um indivíduo saudável, utilizando

tubos de coleta de sangue BD Vacutainer® BD Biosciences (San Diego, Estados Unidos da América) com anticoagulante K2-EDTA (1,8 mg/mL). Para o isolamento de PBMCS, 20 mL de amostras de sangue foram transferidos e separados em tubos de 15 mL contendo meio de gradiente de densidade celular Histopaque®-1077 (1,077 g/mL) Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos da América) (2:1). Para coleta da interfase, os tubos foram centrifugados por 30 min a 1800 rpm e as PBMCS foram coletadas e transferidas para um novo tubo, lavados com solução fisiológica (0.9%) e centrifugadas por 10 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e em seguida foram adicionados 5 mL de tampão hemolítico, a fim de remover resquícios de hemácias. As células foram centrifugadas novamente por 10 min a 1500 rpm, o sobrenadante descartado e as mesmas lavadas com solução fisiológica (0.9%). Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em RPMI 1640 Gibco™ Thermo Fisher Scientific (Grand Island, Estados Unidos da América) contendo 10% de SFB suplementado com penicilina/estreptomicina e anfotericina B e cultivadas em placas com 96 poços na densidade celular de  $1 \times 10^6$ . As células foram mantidas em estufa de atmosfera modificada a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> usando uma incubadora de CO<sub>2</sub>.

### **3.5 Cafeína**

A cafeína foi adquirida comercialmente na Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Estados Unidos da América) e dissolvida em meio de cultura RMPI para obter as concentrações de 0,5 mM; 1,0 mM; 2,0 mM; 4,0 mM e 8,0 mM, conforme descrito por Deplanque (2004), modificado através de estudos pilotos realizados e com estudo anterior em células SK-MEL-28. Os testes submeteram as células TPC-1 a 24 horas de exposição à cafeína.

### **3.6 Ensaios laboratoriais realizados**

A seguir serão descritos os métodos de avaliação de resposta aos tratamentos empregados nas células do modelo TPC -1, considerando viabilidade celular, migração celular, sistema purinérgico, resposta inflamatória e estresse oxidativo. O controle com as PBMCS foi realizado apenas no ensaio do MTT.

### 3.6.1 Ensaio de viabilidade celular pelo MTT

A viabilidade celular foi avaliada em oxiplicata por método colorimétrico através do ensaio MTT (3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio). O reagente MTT foi adicionado a uma placa de 96 poços contendo a amostra tratada, que foi incubada por 2 horas a 37 °C. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 200 µL de dimetilsulfóxido. A absorbância foi lida em um espectrofotômetro a 570 nm (MOSMANN, 1983).

### 3.6.2 Ensaio de viabilidade celular pela microscopia com fluorescência

As células TPC 1 foram semeadas em uma densidade de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/poço, em placas com 96 poços, lavadas duas vezes com tampão fosfato salino e coradas com laranja acridina (OA) para avaliar as mudanças morfológicas como descrito por McGahon (MCGAHON et al., 1995). As células viáveis captam o corante nos padrões de ácidos nucleicos de dupla fita ou fita única. Quando o corante infiltra o DNA celular, ele emite uma fluorescência na cor verde após excitação a 480-490 nm. Para o tetrametilrodamina (TMRE) as células receberam o mesmo preparo e foram incubadas por 30 minutos com 100 µl de uma solução contendo TMRE (20 nM), uma tintura catiônica que se acumula em mitocôndrias ativas e emite uma coloração vermelha quando excitada a 550 nm. As leituras foram feitas utilizando um microscópio de fluorescência com magnificação de 10x e ajustado para brilho, contraste e sombra linearmente utilizando o software Fotos (Windows®). Posteriormente foi realizada a mensuração da intensidade de fluorescência com o uso do software ImageJ.

### 3.6.3 Teste de migração de celular

O teste de migração celular foi realizado como descrito por Justus (JUSTUS et al., 2014) para avaliar a migração celular das células neoplásicas. Uma camada única de células TPC-1 foi cultivada em uma densidade de  $1 \times 10^6$  células/poço em placas com 6 poços. O teste foi realizado em oxiplicatas. Após confluência total, uma fenda foi criada com uma ponta estéril de 200 µl e realizado um registro inicial com microscopia óptica magnificada a 4x. Após 24h de tratamento com cafeína em diferentes concentrações, o sobrenadante foi removido, as células foram lavadas com solução salina e uma nova imagem foi obtida. Para realizar a análise estatística, cinco pontos

diferentes na ferida foram mensurados utilizando o software ImageJ.

### **3.6.4 Marcadores do estresse oxidativo**

As análises de estresse oxidativo foram realizadas no sobrenadante (2 ml) das culturas de células TPC-1. Para quantificar a atividade antioxidante, foi determinada a quantidade de tióis totais (PSH) e tióis não protéicos (NPSH) através do método de Boyne e Ellman (1972) com modificações. A análise de ON foi realizada em triplicata conforme os protocolos de Choi (2012) e Noh et al. (2015). A quantificação de ROS foi realizada em duplicata de acordo com o método de Ali, Lebel e Bondy (1992).

### **3.6.5 Sistema purinérgico - avaliação da atividade das enzimas que hidrolisam nucleotídeos e nucleosídeo de adenina**

A atividade das enzimas E-NTPDase e E-5'-Nucleotidase foi realizada na linhagem TPC-1 com metodologia adaptada segundo Pilla et al. (1996) modificada por Lunkes et al. (2003). A atividade da ADA foi determinada nas amostras citadas segundo método descrito por Giusti e Galanti (1984). Todos os testes foram realizados em triplicatas.

### **3.7 Análise dos dados**

Os dados foram avaliados através da análise de variância ANOVA. Quando houve diferença, os grupos foram comparados entre si com correção de Student-Newman-Keuls para variáveis paramétricas e correção de Dunn para variáveis não paramétricas. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão, para variáveis paramétricas, e sob a forma de mediana e faixa de variação para variáveis não paramétricas. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças em que a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade for menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

### **3.8 Financiamento**

O projeto de pesquisa foi custeado em parte pelo edital de pesquisa GR/UFFS/89/2022, além de materiais provenientes de verbas de outros editais de pesquisa já aprovados pelos

pesquisadores envolvidos, que também foram utilizados, além de complementação com fundos próprios do pesquisador.

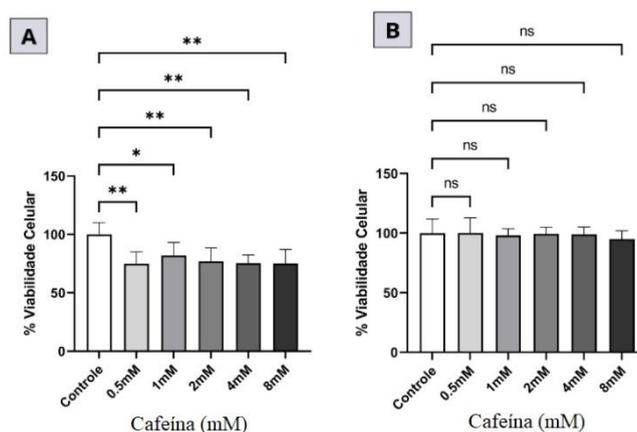
Os equipamentos necessários para o desenvolvimento das técnicas de cultivo celular, bioquímica e moleculares aqui descritas estão disponíveis nos laboratórios de pesquisa da UFFS.

### **3.9 Aspectos éticos**

A pesquisa foi submetida para análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS, Campus Chapecó, SC, Brasil) e aprovada através do CAAE 03057018.6.0000.5564 e o doador de sangue assinou Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participar do estudo.

## 4 RESULTADOS

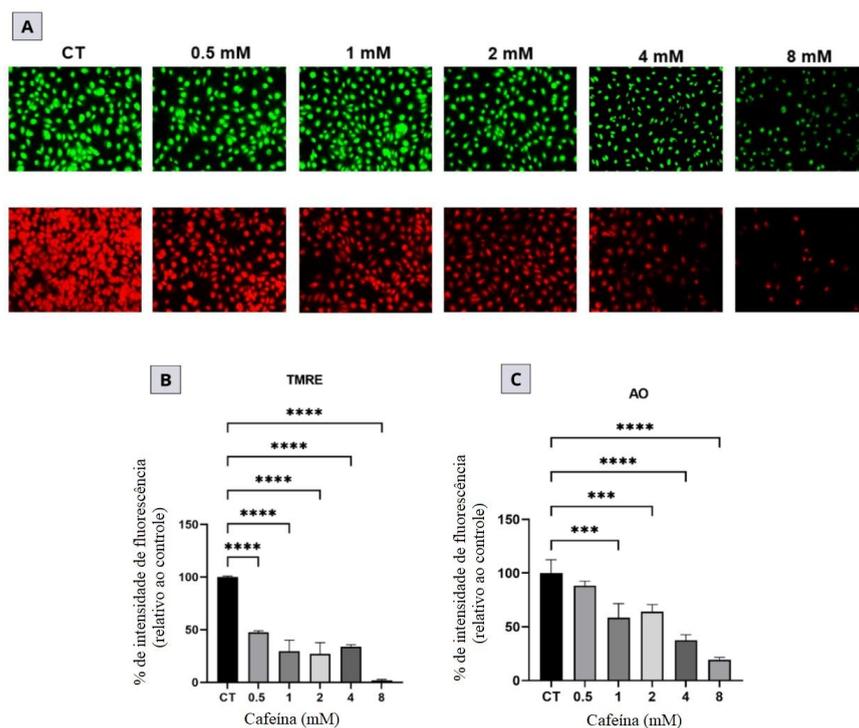
Quanto à avaliação de viabilidade celular pelo teste do MTT, observou-se que as células TPC-1 apresentaram redução estatisticamente significativa na viabilidade celular ao se comparar a média de absorbância após exposição com o valor da média do controle ( $P=0,0016$  para 0,5 mM;  $P=0,0271$  para 1 mM;  $P=0,0046$  para 2 mM;  $P=0,0018$  para 4mM e  $P=0,0023$  para 8 mM) (Figura 10A). Ao se expor as células PMBCS ao mesmo tratamento, não foi observado diferença no percentual de viabilidade celular em relação ao controle (Figura 10B), o que demonstra que a cafeína em todas as concentrações estudadas reduziu a viabilidade celular nas células TPC-1 e não teve impacto na viabilidade celular de células não tumorais.



**Figura 10 - MTT - Células TPC-1 (A) e PMBCS (B) expostas à cafeína.**

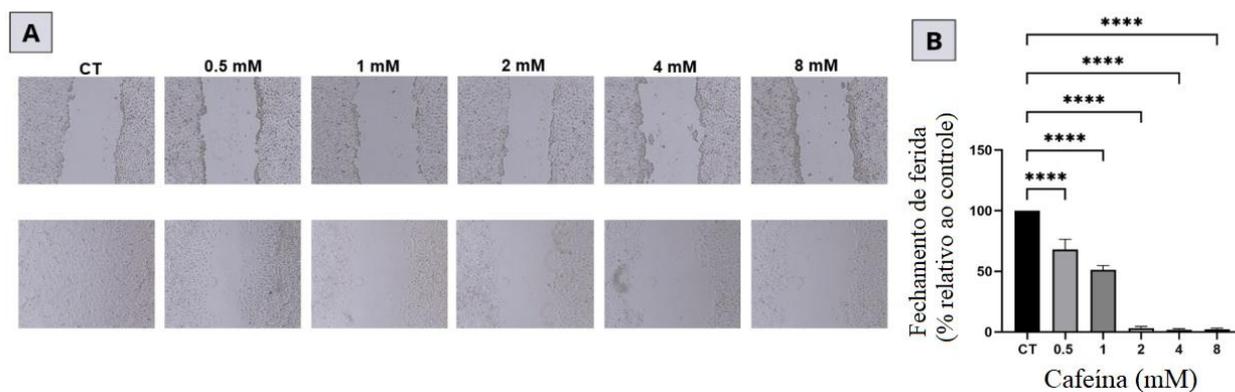
\*( $P=0,0271$ ); \*\*( $P=0,0016/0,0046/0,0018/0,0023$ ); \*NS - Não significativo. Dados apresentados como média e desvio padrão.

A avaliação da viabilidade celular usando o método de microscopia com fluorescência demonstrou que a cafeína é capaz de reduzir a proliferação celular das células TPC-1 após exposição. A Figura 11A apresenta o aspecto das células como observado pela microscopia após aplicação dos fluoróforos, a primeira linha utilizando OA (coloração nuclear) e a segunda linha com TRME (coloração mitocondrial) e os resultados numéricos após aferição da intensidade da fluorescência gerada (Figura 11B). Na análise da coloração nuclear, houve redução significativa a partir da exposição a 1 mM ( $P=0,0003$  para 1 mM;  $P=0,0008$  para 2 mM e  $P<0,0001$  para 4 e 8 mM) e na coloração mitocondrial todas as concentrações apresentaram diferenças significantes ( $P<0,0001$ ).



**Figura 11** - Microscopia com fluorescência das células TPC-1 após tratamento com cafeína (A); Análise da fluorescência utilizando a coloração TRME (B) e a coloração OA (C). \*\*\*( $P < 0,0008$ ); \*\*\*\*( $P < 0,0001$ ). Dados apresentados como média e desvio padrão.

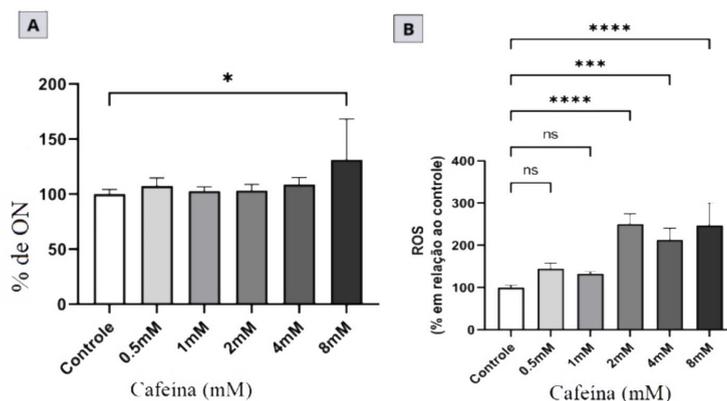
No teste de migração celular foi possível observar que as células TPC-1 não foram capazes de proliferar após exposição à cafeína, em todas as concentrações estudadas, de maneira significativamente estatística ( $P < 0,0001$ ). A Figura 12A demonstra a análise microscópica do teste, sendo que a primeira linha representa o tempo inicial e a segunda linha a reavaliação após 24h de tratamento. Já na Figura 12B é possível observar a comparação numérica entre a migração celular no controle e nas células expostas.



**Figura 12** - Avaliação microscópica do teste de migração celular (A) e comparação do percentual de fechamento de ferida em micrômetros entre controle e células TPC-1 expostas à cafeína (B).

\*\*\*\*( $P < 0,0001$ ). Dados apresentados como média e desvio padrão.

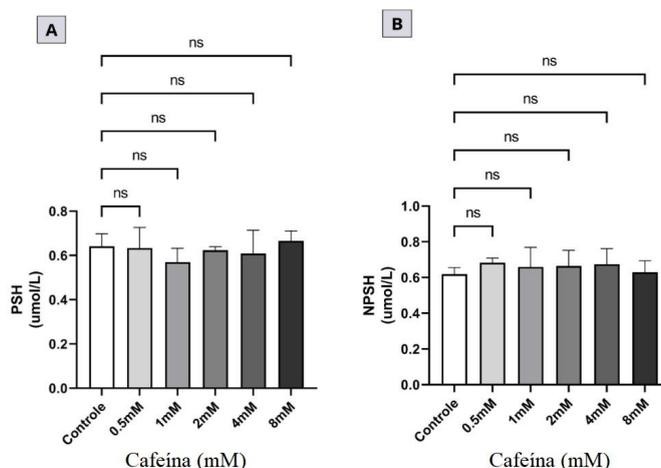
Quanto à avaliação de estresse oxidativo, as células TPC-1 expostas apresentaram aumento na quantidade de ON em relação ao controle de maneira significativa apenas na exposição a 8mM ( $P=0,015$ ) (Figura 13A). Além disso, observou-se que a partir da concentração de 2mM houve aumento significativamente estatístico no acúmulo de ROS ( $P<0,000$  para 2 mM;  $P=0,0003$  para 4 mM e  $P<0,0001$  para 8 mM) (Figura 13B).



**Figura 13** - Quantificação do ON (A) e quantificação de ROS (B) nas células TPC-1 após exposição com cafeína.

\*( $P=0,015$ ); \*\*\*( $P=0,0003$ ); \*\*\*\*( $P<0,0001$ ). \*NS - não significativo. Dados apresentados como média e desvio padrão.

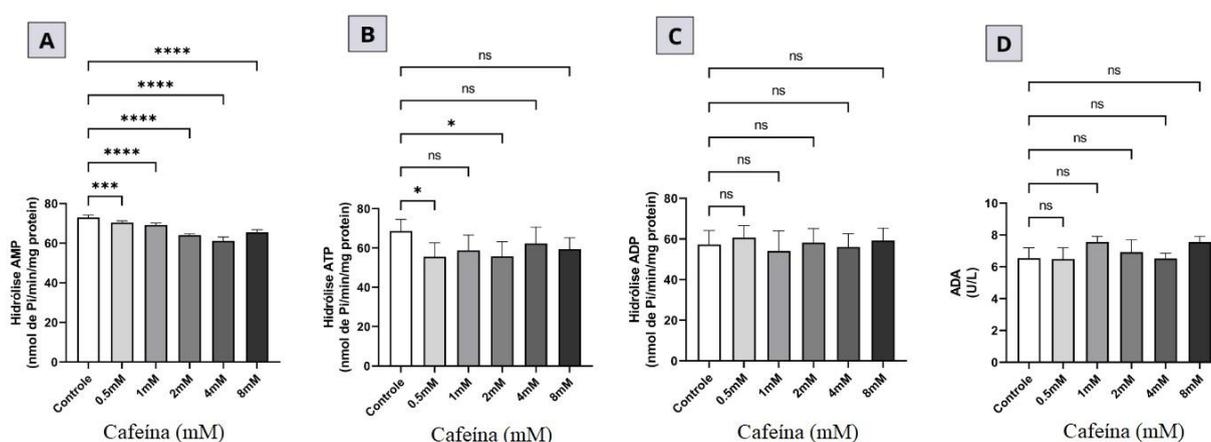
Ainda na avaliação do estresse oxidativo nas células TPC-1, observou-se que após o tratamento não houve variação significativamente estatística na medida indireta das defesas antioxidantes PSH e NPSH (Figura 14).



**Figura 14** - Medida indireta de tióis proteicos (A) e não proteicos (B) em células TPC-1 expostas a cafeína.

\*NS - não significativo. Dados apresentados como média e desvio padrão.

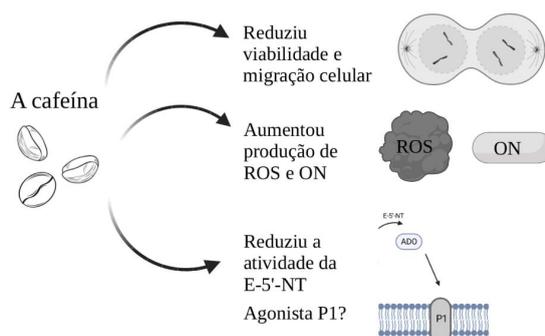
No sistema purinérgico, a avaliação da atividade da enzima E-5'-NT foi obtida através da mensuração da hidrólise de AMP. Em todas as concentrações estudadas houve redução significativamente estatística na atividade enzimática ( $P=0,0005$  para 0,5 mM;  $P<0,0001$  para 1mM, 2 mM, 4 mM e 8 mM) (Figura 15A). A atividade da enzima E-NTPDase foi avaliada através da hidrólise da ATP e da ADP (Figura 15 B/C). Nas células TPC-1 expostas às concentrações de 0,5 ( $P=0,015$ ) e 2mM ( $P=0,016$ ) apresentaram redução significativa de hidrólise de ATP, sugerindo uma redução na atividade enzimática nessas concentrações (Figura 15B). Por fim, também foi realizada a mensuração da atividade da ADA através da quantificação da hidrólise de ADO. Em nenhuma concentração estudada houve diferença significativamente estatística (Figura 15D).



**Figura 15** - Avaliação indireta da atividade das enzimas E-5'-Nucleotidase(A), E-NTPDase (B/C) e ADA (D).

\*( $P=0,015/0,016$ ); \*\*\*( $P=0,0005$ ); \*\*\*\*( $P<0,0001$ ). \*NS - não significativo. Dados apresentados como média e desvio padrão.

Os achados encontrados após a realização de todos os testes estão resumidos na Figura 16.



**Figura 16** - Resumo dos mecanismos de ação da cafeína nas células TPC-1.

Elaborado pela autora com o uso do BioRender.

## 5 DISCUSSÃO

A cafeína apresentou diversas maneiras de impactar as células TPC-1. No ensaio do MTT, demonstrou redução significativa de viabilidade celular nas células TPC-1 expostas em todas as concentrações estudadas. Outros estudos que também utilizaram cafeína, porém em linhagens celulares diferentes, encontraram resultados semelhantes: Jiang e colaboradores trataram células de glioblastoma com cafeína em concentrações de 1 a 20 mM por 24h e encontraram redução de viabilidade celular em todas as concentrações (JIANG et al., 2015). Em células de câncer de mama MCF-7 também houve redução de viabilidade celular com cafeína em doses iguais e maiores a 2,5 mM (MACHADO et al., 2020). Na linhagem celular U87MG (glioma humano) doses de 0,05 mM a 5 mM trouxeram os mesmos resultados (KU et al., 2011). Outro estudo usando células MCF7 tratadas com cafeína em cápsulas nanossomais em concentrações de 0.05, 0.1, 0.2, e 0.25 mg/mL por 24h e 48h também encontraram redução de viabilidade celular de maneira dose-dependente (AHRABI; TABAIE; MOGHADAM, 2021). Células HN5 (carcinoma de língua) e KYSE-30 (carcinoma de esôfago) tiveram a viabilidade reduzida proporcionalmente com doses maiores de cafeína, em tratamentos de 3 dias e 7 dias com doses de 5 mmol, 20 mmol, 50 mmol e 70 mmol (TONKABONI et al., 2021). Nas células WEHI-164 (fibrossarcoma murino), A-375 (melanoma humano), MCF-7 e HeLa (câncer de colo de útero) a cafeína usada em concentrações de 5 mM a 20 mM reduziu a sobrevivências das células de 10% a 40%, após 48h de exposição (BELIZARIO; TILLY; SHERWOOD, 1993). Finalmente, células HeLa tratadas com a mesma substância por 24h, 48h e 72h também tiveram reduzida proliferação celular de maneira dose e tempo dependente (LU et al., 2014).

Apesar de reduzir a viabilidade celular em células TPC-1, no presente estudo a cafeína preservou a viabilidade das PBMCS. Outro grupo avaliou células hepáticas saudáveis após tratamento com cafeína em 0,6 uM, 6 uM, 60 uM e até 600 uM e não encontrou redução na viabilidade celular (LEÃO et al., 2021), o que sugere que células não neoplásicas são poupadas dos efeitos induzidos pela cafeína.

Também foi avaliada a viabilidade celular através da análise de microscopia com fluorescência, sendo que na coloração TRME todas as concentrações de cafeína utilizadas reduziram a viabilidade das células e na coloração OA o mesmo resultado foi encontrado, porém nas concentrações acima de 1 mM. Células H1299 (câncer de pulmão) apresentaram morte celular a exposição com cafeína em 10 mM e 20 mM por 24h, na microscopia com fluorescência evidenciando redução do tamanho das células, deformidades mitocondriais e fragmentação

nuclear (HALAS, 2014). Em células de osteossarcoma (HOS), fibrossarcoma (HT1080) e osteossarcoma murino (LM8) tratados com 0,5 mM cafeína por 24h a microscopia após coloração com TRME também demonstrou redução significativa de viabilidade celular em todas as linhagens estudadas (ABE, 2019).

No teste de migração celular, após a indução da ferida na placa, todas as concentrações de cafeína utilizadas foram capazes de evitar a proliferação celular. No mesmo teste, células de carcinoma hepatocelular (HepG2 e Huh7) tratadas com cafeína em concentrações de 100 uM, 200 uM, 400 uM e 600 uM reduziram proliferação celular de forma dose-dependente (DONG et al., 2015). Células de câncer de próstata PC-3 e DU145 também expostas por 24 h a um preparo específico de cafeína demonstraram menor proliferação celular quando comparado aos controles (POUNIS, 2017). Apesar de linhagens celulares diferentes, pode-se assumir que a cafeína tem um potencial em redução de proliferação celular dose-dependente em células neoplásicas.

As células TPC-1 expostas à cafeína apresentaram aumento de produção de ON na maior dose estudada (8 mM) e aumento nos ROS a partir da concentração de 2 mM. Não foi evidenciado aumento de defesas antioxidantes. Seria esperado um aumento especificamente de GSH após exposição à cafeína, o que não ocorreu no presente estudo. Tal fato pode ser explicado pelo fato de que, ao contrário de outras neoplasias, os níveis de GSH no câncer de tireoide não são elevados, o que determina uma fragilidade contra o dano tecidual causado pelo estresse oxidativo. O aumento dos níveis de ROS e a ausência de uma concomitante elevação dos níveis desses sistemas de defesa antioxidante reflete um ambiente pró-oxidante, o que possivelmente contribuiu para a redução da proliferação e viabilidade celular observados (CAVALHEIRO, 2022, STEFANELLO et al, 2019). Com relação a cafeína, células MCF-7 e MDA-MB-231 (câncer de mama) expostas a 1 mM, 2,5 mM, 5 mM e 10 mM dessa substância por 24h tiveram aumento de produção de ROS e apoptose celular. As MCF-7 aumentaram suas defesas antioxidantes, porém mesmo assim apresentaram lesão ao DNA por oxidação, o que não ocorreu nas células MDA-MB-231, possivelmente porque a cafeína induz a produção de ROS de maneiras diferentes entre as linhagens, o que também poderia explicar o achado nas células TPC-1 (MACHADO, 2020). Em células de hepatocarcinoma, os níveis de ROS aumentaram após exposição com 1 mM de cafeína combinada com um quimioterápico, o que não ocorreu com o uso do quimioterápico isolado (WANG et al, 2019). Células B16F10 (melanoma metastático murino) expostas a doses crescentes de cafeína (0.0375 uM a 2.4 uM) apresentaram aumento na produção de ON. Essa substância, em concentrações médias a baixas, estimula a formação tumoral promovendo expansão de células tumorais, aumento de viabilidade, da capacidade proliferativa e

metastática, porém em concentrações mais elevadas está relacionado a morte direta por apoptose e estímulo das células imunes, o que possivelmente aconteceu com as TPC-1 (SILVA et al., 2021).

No sistema purinérgico, as células tireoideanas normais (Nthy-1) em comparação a linhagens de carcinoma papilífero de tireoide (TPC-1 e K1) demonstraram maior habilidade de hidrolisar ATP e maior expressão de E-NTPDases (BERTONI et al., 2018). No presente estudo, a atividade da enzima E-5'-NT teve redução significativamente estatística em todas as doses estudadas. As enzimas E-NTPDase e ADA não sofreram modificações significativas e sustentadas em suas atividades. Resultado contraditório foi encontrado no estudo de Bertoni, onde além de acúmulo de ATP, as células tumorais expressaram mais E-5'-NT, gerando também aumento de ADO disponível no meio extracelular (BERTONI et al., 2018). Este aumento na atividade da E-5'-NT foi associado ao maior risco de metástase linfonodal (BERTONI, 2019). Outro grupo encontrou o mesmo aumento de atividade dessa ectoenzima em portadores de carcinoma papilífero de tireoide de várias variantes celulares, supondo que inibir a E-5'-NT poderia bloquear a proliferação e migração celulares do tumor induzidas pela ADO (JEONG et al., 2020; LE; LU; XUE, 2023). Entretanto, com as doses de cafeína estudadas, foi encontrada uma redução na atividade da E-5'-NT, o que leva a redução na disponibilidade de ADO extracelular e portanto contribuindo para a redução da viabilidade das células tumorais. Em outras condições (células normais de sistema nervoso central em ratos) a cafeína também inibiu a atividade da E-5'-NT, além de aumentar hidrólise de ATP e ADP (STEFANELLO et al., 2019).

Também foi descrita redução da atividade da E-NTPDase nas plaquetas, sugerindo um aumento da concentração extracelular de ATP. Esse aumento de ATP poderia estimular a resposta antitumoral do hospedeiro ao recrutar células apresentadoras de antígenos e promover a maturação de células dendríticas (CAVALHEIRO, 2022). Porém, esse ATP extracelular em excesso estimula uma via tumorigênica ao aumentar a fosforilação de ERK, ativar o fator de transcrição da proteína ativadora-1 e a expressão da ciclina D1 (LE; LU; XUE, 2023; PINES, 2006). Além de estimular receptores P2 induzindo proliferação celular e mobilização de células imunes com liberação de citocinas pró-tumorais locais (BERTONI et al., 2018). Combinado a isso, a ADO gerada pela E-5'-NT tumoral prejudica as respostas imunes antitumorais celulares em múltiplos níveis, incluindo ativação de células T, favorecimento de expansão clonal de células T tumor-específicas com funções efetoras auxiliares e citotóxicas, além de importante ação angiogênica (BERTONI et al., 2018; ZEISER et al., 2016; CAVALHEIRO, 2022).

Além disso, a cafeína é capaz de antagonizar receptores de ADO, podendo contribuir

para a apoptose das células tumorais (STEFANELLO et al., 2019). Em células de sarcoma em um modelo de metástase pulmonar, a cafeína aumentou os efeitos antitumorais de linfócitos T CD8 após antagonizar um dos receptores da ADO, o receptor A2 (OHTA et al., 2006). Células de câncer de cólon (HT29) tratadas com cafeína (1 uM10 uM) por 4 horas apresentaram redução significativa de acúmulo de proteínas sintetizadas pela ADO após sua ligação em subtipos de receptores P1 (A3 e A2B), supostamente por inibir a sinalização extracelular do ERK1/2, p38 e AKT, o que seria responsável por reduzir a progressão tumoral (MERIGHI et al., 2007). A inibição da E-5'-NT isolada não foi capaz de promover morte de células neoplásicas, mesmo podendo aumentar o tempo de sobrevivência do hospedeiro e inibir o crescimento tumoral. Provavelmente isso ocorre pelo número insuficiente de células T antitumorais efetivas no microambiente tumoral, que são influenciadas por outros mecanismos imunossupressores (JIN et al., 2010). Portanto, a atividade de alguns receptores P1, como o A2AR, protegeria os tecidos tumorais da ação antitumoral dos linfócitos T e a cafeína mostrou-se um antagonista deste receptor, levando a inibição do crescimento tumoral, metastatização e neovascularização através das células T, podendo também explicar a coexistência paradoxal de células T antitumorais e células tumorais no mesmo microambiente ("paradoxo Hellstrom") (OHTA et al., 2006).

Após observação da ação da cafeína em linhagem celular TPC-1, pode-se hipotetizar uma possível substância adjuvante no tratamento do CD de tireoide refratário aos tratamentos habituais. Entretanto, a administração de cafeína na dose estudada apresenta um desafio, pois para consumir essa substância na mesma quantidade seriam necessárias cerca de 65 xícaras de 25 mL de café expresso ou 110 xícaras de 25 mL de café filtrado, considerando-se grãos padrão, com o mesmo método de cultivo e armazenamento. Mesmo não sendo uma dose tóxica, a grande quantidade de café que deveria ser ingerida poderia causar efeitos excitatórios em sistema nervoso central, além de possivelmente não atingir o tecido tireoidiano em dose efetiva, sendo perdido em parte durante a absorção pelo trato gastrointestinal e metabolização hepática ISMAIL et al., 2021; QIU et al., 2019; SHIN; HWANG; CHOI, 2019; GAASCHT; DICATO; DIEDERICH, 2015; LICZBINSKI; BUKOWSKA, 2022; GROSSO et al., 2017; ZAMORA-ROS et al., 2019; HAN; KIM, 2017; OSARIEME; MODUPE; OLUCHUKWU, 2019; ABREU, 2014). Um estudo já testou formas de liberação localizada de medicamentos, encapsulando a cafeína em doses maiores e usando nanopartículas niosomais com um método de hidratação por camada fina, encontrando resultados promissores, o que pode representar o próximo passo no estudo do uso terapêutico da cafeína (AHRABI; TABAIE; MOGHADAM, 2021).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após, análise e discussão dos resultados encontrados e relacionando com dados encontrados na literatura atual, foi possível concluir que a cafeína, ao ser utilizada como tratamento em células TPC-1, foi capaz de reduzir a viabilidade e a migração celular, preservando as células não neoplásicas em uma das análises realizadas. Além disso, provocou um aumento na produção de ROS e ON, com redução da capacidade de formação de defesas antioxidantes neoplásicas. Finalmente, foi identificada uma importante redução na atividade da enzima E-5'-NT, reduzindo a disponibilidade de ADO extracelular, além da possível inibição da ação de receptores de ADO. Portanto, sugere-se que a cafeína possa ser uma substância efetiva no tratamento adjuvante do carcinoma de tireoide diferenciado refratário aos tratamentos habituais, porém estudos *in vivo* seriam necessários para prosseguir com essa hipótese.

## REFERÊNCIAS

- ABE, K. et al. Caffeine citrate enhanced cisplatin antitumor effects in osteosarcoma and fibrosarcoma in vitro and in vivo. **BMC Cancer**. 2019; 19: 689.
- ABOTALEB, M. et al. Flavonoids in Cancer and Apoptosis. **Cancers**. 2018; 11(1): 28.
- ABREU, B. R. R. **Papel dos receptores P1 e da cafeína na proliferação de carcinoma de células escamosas de esôfago**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- ALI, S.F.; LEBEL, C.P.; BONDY, S.C. Reactive Oxygen Species Formation as a Biomarker of Methylmercury and Trimethyltin Neurotoxicity. **Neurotoxicology**. 1992; 13: 637-648.
- AGGARWAL, V. et al. Molecular mechanisms of action of hesperidin in cancer: Recent trends and advancements. **Experimental Biology and Medicine**. 2020; 245(5): 486–497.
- AHN, J. C.; BISWAS, R.; CHUNG, P. S. Combination with genistein enhances the efficacy of photodynamic therapy against human anaplastic thyroid cancer cells. **Lasers in Surgery and Medicine**. 2012; 44(10): 840–849.
- AHRABI, N. Z.; TABAIE, M. S., MOGHADAM, M. J. Study of Cytotoxic Effects of Caffeine-Loaded Niosomes on Human Breast Cancer Cells MCF-7. **Journal of Sabzevar University of Medical Sciences**, 2021; 28(4):663-674.
- ARAGÃO, N. M. et al. Efeito da acidez e de modificadores orgânicos na determinação de metilxantinas: um experimento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando otimização uni e multivariada. **Quim. Nova**. 2009; 32 (9): 2482-2486.
- BAGATINI, M. D. et al. Purinergic signaling pathways in endocrine system. **Auton Neurosci**. 2015; 191: 102-16.
- BALDISSARELI, J. **Envolvimento dos sintomas purinérgico, colinérgico, estresse oxidativo nos distúrbios da tireóide: possível efeito da quercetina**. Tese (doutorado do em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Maria, 2017.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev. Nutr**. 2010; 23(4): 629-643.
- BELIZARIO, J.; TILLY, J.; SHERWOOD, S. Caffeine potentiates the lethality of tumour necrosis factor in cancer cells. **British Journal of Cancer**. 1993; 67(6), 1229–1235.
- BERTONI, A. P. S. et al. Extracellular ATP is Differentially Metabolized on Papillary Thyroid Carcinoma Cells Surface in Comparison to Normal Cells. **Cancer Microenviron**. 2018; (1): 61-70.
- BERTONI, A. P. S. et al. Activity of ecto-5'-nucleotidase (NT5E/CD73) is increased in papillary thyroid carcinoma and its expression is associated with metastatic lymph nodes. **Mol Cell Endocrinol**. 2019; 479: 54-60.

BODE, A.M.; DONG, Z. The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. **Cancer Lett.** 2007; 247(1): 26-39.

BOYNE, A. F.; ELLMAN G. L. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. **Analytical Biochemistry.** 1972; 46(2): 639-653.

BRENELLI, E.C.S. A extração de cafeína em bebidas estimulantes - uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. **Quim. Nova.** 2003; 26(1): 136-138.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in endocrine organs. **Purinergic Signal.** 2014; 10(1): 189-231.

CARDOSO, A. M.; MANFREDI, L. H.; MACIEL, S. F. V. O. Sinalização purinérgica: implicações fisiopatológicas [online]. Chapecó: **Editora UFFS**, 2021, 399 p. ISBN: 978-65-86545-47-0.

CARVALHO, F. B. The Impact of Purinergic System Enzymes on Noncommunicable, Neurological, and Degenerative Diseases. **J Immunol Res.** 2018; 4892473.

CAVALHEIRO, P. B. **Câncer de tireoide: avaliação da atividade de anzimas do sistema purinérgico, butirilcolisterase e perfil oxidativo.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

CHANDRA, A. K.; DE, N. Goitrogenic/antithyroidal potential of green tea extract in relation to catechin in rats. **Food Chem Toxicol.** 2010; 48(8-9): 2304-2311.

CHOI J. Oxidative stress, endogenous antioxidants, alcohol, and hepatitis C: pathogenic interactions and therapeutic considerations. **Free Radic Biol Med.** 2012; 52(7): 1135-50.

CLOZEL, M. et al. Effect of caffeine on thyroid and pituitary function in newborn rats. **Pediatr Res.** 1983;17(7):592-5

CUBILLOS-ROJAS, M. et al. The E3 Ubiquitin Protein Ligase HERC2 Modulates the Activity of Tumor Protein p53 by Regulating Its Oligomerization. **The Journal of Biological Chemistry.** 2014, 289(21): 14782-14795.

DA SILVA, M. S. et al. Nuclear DNA Replication in Trypanosomatids: There Are No Easy Methods for Solving Difficult Problems. **Trends in Parasitology.** 2017; 33(11): 858-874.

DE AMICIS, F. et al. Epigallocatechin gallate inhibits growth and epithelial-to-mesenchymal transition in human thyroid carcinoma cell lines. **Journal of Cellular Physiology.** 2013; 228(10): 2054-2062.

DEPLANQUE, G. et al. Conflicting effects of caffeine on apoptosis and clonogenic survival of human K1 thyroid carcinoma cell lines with different p53 status after exposure to cisplatin or UVc irradiation. **Biochem Biophys Res Commun.** 2004; 314(4):1100-6.

DIPAK, K.D. Naturally occurring flavonoids: Structure, chemistry, and high-performance liquid chromatography methods for separation and characterization. **Meth enz.** 1994; 234: 410-420.

- DONG, S. et al. Low concentrations of caffeine inhibits the progression of the hepatocellular carcinoma via Akt signalling pathway. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**. 2015; 15: 483-491.
- FERREIRA DE OLIVEIRA, J. M. P.; SANTOS, C.; FERNANDES, E. Therapeutic potential of hesperidin and its aglycone hesperetin: Cell cycle regulation and apoptosis induction in cancer models. **Phytomedicine**. 2020; 73: 152887.
- FERRERA, T. S. et al. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erva-mate sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 2016; 18(2): 588–596.
- GAASCHT, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Coffee provides a natural multitarget pharmacopeia against the hallmarks of cancer. **Genes Nutr**. 2015;10(6):51.
- GAITAN, E. et al. Antithyroid and goitrogenic effects of millet: role of C-glycosylflavones. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 1989; 68(4); 707–714.
- GAITAN, E. Flavonoids and the thyroid. **Nutrition**. 1996; 12(2): 127–129.
- GARG, A. et al. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. **Phytother Res** 2001; 15:655–69.
- GHARIB, H. American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Associazione Medici Endocrinologi Medical Guidelines for Clinical Practice for the Diagnosis and Management of Thyroid Nodules. **Endocr. Pract.** 2016; 22(5): 622-39.
- GIUSTI G., GALANTI B. Colorimetric method. Editor Bergmeyer HU. Methods of enzymatic analysis. 1a edição. Weinheim, Alemanha. **Verlag Chemie**; 1984 pgs 315-23.
- GONÇALVES, C. F. L. et al. Flavonoid rutin increases thyroid iodide uptake in rats. **PloS One**. 2013; 8(9): e73908.
- GONÇALVES, C. F. L. et al. The flavonoid quercetin reduces cell migration and increases NIS and E-cadherin mRNA in the human thyroid cancer cell line BCPAP. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 2021; 529: 111266.
- GONÇALVES, C. F. L.; DE FREITAS, M. L.; FERREIRA, A. C. F. Flavonoids, Thyroid Iodide Uptake and Thyroid Cancer—A Review. **International Journal of Molecular Sciences**. 2017; 18(6): 1247.
- GROSSO, G. et al. Coffee, Caffeine, and Health Outcomes: An Umbrella Review. **Annu Rev Nutr**. 2017;37: 131-156.
- HALAS M. et al. Caffeine induces cytoskeletal changes and cell death in H1299 cells. **Centr Eur J Biol**. 2014; 9(8): 727-738.
- HAN, M.A., KIM, J.H. Coffee Consumption and the Risk of Thyroid Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Int J Environ Res Public Health**. 2017; 14(2): 129.

HAUGEN, B. R. et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. **Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association**. 2016; 26(1): 1–133.

HOSKIN, D. W.; REYNOLDS, T.; BLAY, J. Adenosine as a possible inhibitor of killer T-cell activation in the microenvironment of solid tumours. **International Journal of Cancer**. 1994; 59(6): 854–855.

ISMAIL, T. et al. Coffee in cancer chemoprevention: an updated review. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**. 2021;17(1): 69-85.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva** – Rio de Janeiro: INCA, 2023.

JEONG, Y. M. et al. CD73 Overexpression Promotes Progression and Recurrence of Papillary Thyroid Carcinoma. **Cancers (Basel)**. 2020; 12(10): 3042.

JIANG, J. et al. The in vitro effects of caffeine on viability, cycle profiles, proliferation and apoptosis of glioblastomas. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**. 2015; 19: 3201–3207.

JIN D. et al. CD73 on Tumor Cells Impairs Antitumor T-Cell Responses: A Novel Mechanism of Tumor-Induced Immune Suppression. **Cancer Res**. 2010; 70(6): 2245–2255.

JOSHI, D. C; BAKOWSKA, J. C. Determination of Mitochondrial Membrane Potential and Reactive Oxygen Species in Live Rat Cortical Neurons. **JoVE**. 2011: 2704.

JUSTUS, C. R. et al. In vitro Cell Migration and Invasion Assays. **JoVE**. 2014: 51046.

KANG, H. J. et al. Antiproliferation and Redifferentiation in Thyroid Cancer Cell Lines by Polyphenol Phytochemicals. **Journal of Korean Medical Science**. 2011; 26(7): 893.

KAMELY M., KARIMI T. M. A., RAHIMI S. Blood biochemistry, thyroid hormones, and performance in broilers with ascites caused by caffeine. **Poult Sci**. 2016; 95(11): 2673–2678.

KIM, S. H. et al. Apigenin induces c-Myc-mediated apoptosis in FRO anaplastic thyroid carcinoma cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 2013; 369(1–2): 130–139.

KONOPKA, K. et al. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**. 1996; 1312(3): 186–196.

KU, B. M. et al. Caffeine Inhibits Cell Proliferation and Regulates PKA/GSK3 $\beta$  Pathways in U87MG Human Glioma Cells. **Mol Cells**. 201; 31(3): 275–279.

KUMAR, V. Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go? **Purinergic Signal**. 2013;9(2):145-65.

LE, Y.; LU, D.; XUE, M. Purinergic signaling in thyroid disease. **Purinergic Signal**. 2023; (1): 221-227.

LEÃO, T. K. et al. Synephrine and caffeine combination promotes cytotoxicity, DNA damage and transcriptional modulation of apoptosis-related genes in human HepG2 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 2021; 503375: 868–869.

LIANG, Y. et al. Fisetin Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis via JAK/STAT3 Signaling Pathways in Human Thyroid TPC 1 Cancer Cells. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. 2020; 25(2): 197–205.

LICZBINSKI, P; BUKOWSKA, B. Tea and coffee polyphenols and their biological properties based on the latest in vitro investigations. **Ind Crops Prod**. 2022; 175:114265.

LIM, Y. C.; CHA, Y. Y. Epigallocatechin-3-gallate induces growth inhibition and apoptosis of human anaplastic thyroid carcinoma cells through suppression of EGFR/ERK pathway and cyclin B1/CDK1 complex. **Journal of Surgical Oncology**. 2011; 104(7): 776–780.

LIU, R.H. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. **Adv Nutr**. 2013;4(3): 384S-92S.

LIU, Z. et al. Antiproliferative effects of Src inhibition on medullary thyroid cancer. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2004; 89(7): 3503–3509.

LU G. Y. et al. Caffeine induces tumor cytotoxicity via the regulation of alternative splicing in subsets of cancer-associated genes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 2014; 47: 83–92.

LUNKES, D. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thromb. Res**. 2003; 2183: 1-6.

MACHADO, K. L. et al. Oxidative stress in caffeine action on the proliferation and death of human breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231. **Nutrition and cancer**. 2020; 73: 1378-1388

MACK, W. J, et al. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer: cigarette smoking and consumption of alcohol, coffee, and tea. **Cancer Causes Control**. 2003;14(8): 773-85.

MAKIYAMA M.L. et al. Antineoplastic properties of polyphenols in TPC-1 human papillary thyroid carcinoma cell line: a systematic review. **Arch Endocrinol Metab**. 2023, 67(6): 1-10.

MALDONADO, P. A. et al. Role of the purinergic system in patients with cervical intraepithelial neoplasia and uterine cancer. **Biomed Pharmacother**. 2012; 66(1): 6-11.

MÂNICA, A. **ATP como modulador do sistema purinérgico e inflamação e status redox em pacientes com melanoma**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2019.

MARAFON, F. **Avaliação do perfil oxidativo-inflamatório e de componentes do sistema**

- purinérgico em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.
- MATOS, L.P.C. **Compostos fitoquímicos e atividade antioxidante de casca de café.** Trabalho de conclusão de curso em tecnologia de alimentos, UTFPR, 2014.
- MAZUMDAR, M. et al. Targeting RET to induce medullary thyroid cancer cell apoptosis: an antagonistic interplay between PI3K/Akt and p38MAPK/caspase-8 pathways. **Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death.** 2013; 18(5): 589–604.
- MCCARRISON, R. The goitrogenic action of soya-bean and ground-nut. **Indian Journal of Medical Research.** 1933; 21: 179–181.
- MCGAHON, A. J. et al. **The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro in Methods in Cell Biology**, edited by L. M. Schwartz and B. A. Osborne. Academic Press, 1995.
- MEISAPROW, P. et al. Caffeine Induces G0/G1 Cell Cycle Arrest and Inhibits Migration through Integrin  $\alpha$ v,  $\beta$ 3, and FAK/Akt/c-Myc Signaling Pathway. **Molecules.** 2021; 26(24): 7659.
- MERIGHI, S. et al. Caffeine inhibits adenosine-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , vascular endothelial growth factor, and interleukin-8 expression in hypoxic human colon cancer cells. **Mol Pharmacol.** 2007; 72(2): 395-406.
- MIRANDA-GALVIS, M. et al. Impacts of environmental factors on head and neck cancer pathogenesis and progression. **Cells.** 2021; 10(389): 1-16.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods.** 1983; 65(1–2): 55–63.
- MUTLU, A. E. et al. The role of HSP90 in Quercetin-induced apoptosis in human papillary thyroid (B-CPAP) cancer cells. **Free Radical Biology & Medicine.** 2014; 75(1): S43.
- NERI, J. L. S. A. **Ingestão dietética e índice inflamatório dietético associado ao estadiamento tumoral em pacientes com neoplasia da tireoide no estado do Rio Grande do Norte.** Dissertação (Mestrado em Nutrição) - UFRN, 2021.
- NOAL, C. B. **Atividade de enzimas que degradam nucleotídeos e nucleotídeo de adenina em plaquetas de pacientes com tireoidite de hashimoto em tratamento com levotiroxina sódica.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.
- NOH, J. et al. Amplification of oxidative stress by a dual stimuli-responsive hybrid drug enhances cancer cell death. **Nat Commun.** 2015; 6: 6907.
- OLIVEIRA, K. J. et al. Thyroid Function Disruptors: from nature to chemicals. **J Mol Endocrinol.** 2018: JME-18-0081.

OHTA, A. et al. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2006; 103(35) :13132-7.

OSARIEME, E. D.; MODUPE, D. T.; OLUCHUKWU, O. P. The Anticancer Activity Of Caffeine - A Review. **Archives of Clinical and Biomedical Research**. 2019; 3: 326-342.

PACINI, F. et al. Italian consensus on diagnosis and treatment of differentiated thyroid cancer: joint statements of six Italian societies. **Journal of Endocrinological Investigation**. 2018; 41(7): 849–876.

PANG, X. et al. Autophagy: Mechanisms and Therapeutic Potential of Flavonoids in Cancer. **Biomolecules**. 2021; 11(2): 135.

PATEL, P. N. et al. Hesperetin Activates the Notch1 Signaling Cascade, Causes Apoptosis, and Induces Cellular Differentiation in Anaplastic Thyroid Cancer. **Annals of surgical oncology**. 2014; 21(4): 497–504.

PECKOLT, G. Herva mate. **Rev. Flora Med**. 1943; 10(10): 493-533.

PERNA, A. et al. Effects of different extracts of curcumin on TPC1 papillary thyroid cancer cell line. **BMC Complement Altern Med**. 2018; 18(1):63.

PISTOLLATO, F. et al. Effects of phytochemicals on thyroid function and their possible role in thyroid disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 2019; 1443 (1); 3–19.

PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets**. 1996; 7: 225-230.

PINES, A. et al. Nucleotide receptors stimulation by extracellular ATP controls Hsp90 expression through APE1/Ref-1 in thyroid cancer cells: a novel tumorigenic pathway. **J Cell Physiol**. 2006; 209(1): 44-55.

PHAN, T. et al. Antiproliferative Effect of Chrysin on Anaplastic Thyroid Cancer. **The Journal of surgical research**. 2011; 170(1): 84–88.

POUNIS, G. et al. Reduction by coffee consumption of prostate cancer risk: evidence from the Moli-sani cohort and cellular models. **International Journal of Cancer**. 2017; 141(1): 72-82.

QIN, J. et al. Down-regulation of cyclin E expression by caffeine promotes cancer cell entry into the S-phase of the cell cycle. **Anticancer Res**. 2004; 24(5): 2991-5.

QIU, M. H. et al. The Sources and Mechanisms of Bioactive Ingredients in Coffee. **Food & Function**. 2019; 10(6).

RAFFA, D. et al. Recent discoveries of anticancer flavonoids. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 2017; 142: 213–228.

RIBEIRO, D. C. M. **Identificação de mutações germinativas em pacientes com câncer papilífero familiar de tireoide através de análise de exoma**. Tese (Doutorado em Medicina Molecular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

ROOHBAKHSH, A. et al. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. **Life Sciences**. 2015; 124: 64–74.

ROSÁRIO, P. W. et al. Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: update on the Brazilian consensus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. 2013; 57(4): 240–264.

RUSS, G. et al. European Thyroid Association Guidelines for Ultrasound Malignancy Risk Stratification of Thyroid Nodules in Adults: The EU-TIRADS. **European Thyroid Journal**. 2017; 6(5): 225–237.

SCHRÖDER-VAN DER ELST, J. P. et al. Differential effects of natural flavonoids on growth and iodide content in a human Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter-transfected follicular thyroid carcinoma cell line. **European Journal of Endocrinology**. 2004; 150(4): 557–564.

SHIN, H.J.; HWANG, K.A.; CHOI, K.C. Antitumor Effect of Various Phytochemicals on Diverse Types of Thyroid Cancers. **Nutrients**. 2019; 11(1): 125.

SILVA, J.L.G. et al. Efeito antitumoral da cafeína como antagonista do receptor A2A em células de melanoma B16F10. **Congresso internacional em saúde**. 2021; 8.

SON, H.Y., et al. Synergistic interaction between excess caffeine and deficient iodine on the promotion of thyroid carcinogenesis in rats pretreated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. **Cancer Sci**. 2003; 94(4): 334-7.

SON, H. Y, et al. Specificity of co-promoting effects of caffeine on thyroid carcinogenesis in rats pretreated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. **Toxicol Pathol**. 2004; 32(3): 338-44.

SPINDEL, E. et al. Effects of caffeine on anterior pituitary and thyroid function in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**. 1980; 214(1): 58-62.

STEFANELLO, N. et al. Coffee, caffeine, chlorogenic acid, and the purinergic system. **Food and Chemical Toxicology**. 2019; 123: 298-313.

TONKABONI, A. et al. Evaluation of Inhibitory Effects of Caffeine on Human Carcinoma Cells. **Nutr Cancer**. 2021;73(10):1998-2002.

TUTTLE, D. R. M.; HAUGEN, D. B. R.; PERRIER, D. N. The Updated AJCC/TNM Staging System for Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer (8th edition): What changed and why? **Thyroid**. 2017, 27(6):751-56.

US PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE et al. Screening for Thyroid Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. **JAMA**. 2017; 317(18):1882.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**. 1995; 184(1): 39–51.

WANG, Z. et al. Caffeine enhances the anti-tumor effect of 5-fluorouracil via increasing the

production of reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma. **Medical Oncology**. 2019; 36(97)

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Global Cancer Observatory**. 2020. Disponível em <<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/32-Thyroid-fact-sheet.pdf>>. Acesso em 20/07/23.

YARLAGADDA K. et al. The role of nitric oxide in melanoma. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer**. 2017; 1868(2):500-509.

YU, X. M. et al. Chrysin activates Notch1 signaling and suppresses tumor growth of anaplastic thyroid carcinoma in vitro and in vivo. **Cancer**. 2013; 119(4): 774–781.

ZAMORA-ROS, R. et al. Coffee and tea drinking in relation to the risk of differentiated thyroid carcinoma: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. **Eur J Nutr**. 2019; 58(8): 3303-3312.

ZANINI, D. et al. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. **Biomed Pharmacother**. 2012; 66(1): 40-5.

ZEISER, R. et al. Unlocking the Potential of Purinergic Signaling in Transplantation. **Am J Transplant**. 2016; (10): 2781-2794.

ZHANG, L. et al. Apigenin induces autophagic cell death in human papillary thyroid carcinoma BCPAP cells. **Food & Function**. 2015; 6(11): 3464–3472.

ZHOU, J.; XIA, L.; ZHANG, Y. Naringin inhibits thyroid cancer cell proliferation and induces cell apoptosis through repressing PI3K/AKT pathway. **Pathology - Research and Practice**. 2019; 215(12): 152707.

## ANEXO A - Publicação relacionada ao tema da dissertação

Nesta seção será apresentada a publicação proveniente desta dissertação. O manuscrito intitulado como “Antineoplastic properties of polyphenols in TPC-1 human papillary thyroid carcinoma cell line: a systematic review” foi publicado na revista “Archives of Endocrinology and Metabolism”, no mês de junho de 2023. DOI: 10.20945/2359-3997000000645.

review

# Antineoplastic properties of polyphenols in TPC-1 human papillary thyroid carcinoma cell line: a systematic review

Marielle Lang Makiyama<sup>1</sup>  
<https://orcid.org/0000-0003-1655-2304>

Maria Júlia Pigatti Degli Esposti<sup>2</sup>  
<https://orcid.org/0000-0002-4857-8894>

Maria Luíza Raitz Siqueira<sup>2</sup>  
<https://orcid.org/0000-0003-2532-6931>

Margarete Dulce Bagatini<sup>3</sup>  
<https://orcid.org/0000-0001-9263-4980>

Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel<sup>3</sup>  
<https://orcid.org/0000-0002-5746-7109>

Marcelo Moreno<sup>3</sup>  
<https://orcid.org/0000-0003-0244-9138>

<sup>1</sup> Ciências Biomédicas,  
 Universidade Federal da Fronteira  
 Sul, Chapecó, SC, Brasil

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina,  
 Universidade Federal da Fronteira  
 Sul, Chapecó, SC, Brasil

<sup>3</sup> Programa de Pós-graduação  
 em Ciências Biomédicas,  
 Universidade Federal da Fronteira  
 Sul, Chapecó, SC, Brasil

## ABSTRACT

Thyroid cancer usually responds to surgical and ablative therapy, but when it's refractory the alternative lies in tyrosine kinase inhibitors that, in addition to harmful side effects, acts only in a palliative way. The concern for other therapeutic possibilities brought evidence on flavonoids, hypothesizing a possible strategy. This review aimed to organize a compilation of *in vitro* studies using polyphenol substances in TPC-1 (human papillary thyroid carcinoma cell line) summarizing its results and describing the metabolic pathways involved. Articles were selected on PubMed, Google Scholar, LILACS, BVS and SciELO, using keywords “thyroid cancer”, “flavonoids” and “TPC-1”, until June 2022. 185 studies were selected. After identification and exclusion of duplicates and exclusion criteria applied, 11 original articles were evaluated. Of these, the findings of flavonoids added to TPC-1 were: inhibition of cell growth and viability, promotion of cell cycle arrest and induction of apoptosis. Polyphenolic compounds have antineoplastic properties by different mechanisms as shown *in vitro*, but the concentrations needed are above usual dietary consumption and the findings are limited to experimental cellular studies. Despite that, these results should be useful to guide further analysis aiming to reveal the real safety and efficacy of polyphenols in this scenario.

## Keywords

TPC-1; polyphenols; thyroid cancer; papillary thyroid cancer

**Correspondence to:**  
 Marielle Lang Makiyama  
 Avenida Fernando Machado, 615D  
 89803-003 – Chapecó, SC, Brasil  
[endocrinologistamarielle@yahoo.com](mailto:endocrinologistamarielle@yahoo.com)

Received on Jan/6/2023  
 Accepted on Feb/25/2023

DOI: 10.20945/2359-3997000000645

## INTRODUCTION

Thyroid cancer has had an increasing incidence in recent years, possibly due to the facility in performing cervical ultrasound examinations. However, mortality from this cause remained stable, since most thyroid neoplasms are differentiated carcinomas with an indolent behavior (1). The treatment of this condition consists mostly of surgical excision and, in some cases, complementation with radioactive iodine ablation. When patients have no response to this therapeutic regimen, the treatment possibilities are extremely limited, currently consisting in the use of tyrosine kinase

inhibitors. This class of drugs, in addition to the harmful side effects worsening the quality of life of its users, acts in a palliative way, only delaying neoplastic proliferation and increasing survival (2,3). The search for other treatment possibilities in this limited scenario brought evidence on the use of polyphenol phytochemicals with antioxidant and antineoplastic actions, hypothesizing a possible therapeutic route. Cellular mechanisms, such as modifications in cell cycle, have already been described in several neoplastic cell lines using flavonoids (4), but in the field of thyroid cancer this evidence is still very scarce, consisting in studies using different flavonoid

Copyright © 2023. All rights reserved.

substances and different cell lineages. The Two-Pore Channel-1 (TPC-1) cell line was chosen in this review because it is one of the most prevalent cell lines in thyroid cancer, in which both *RET/PTC1* (rearranged during transfection/papillary thyroid carcinoma type 1) rearrangement and *BRAF V600E* (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase) mutations are present (most common genetic alterations detected in this kind of neoplasm) (4). The objective of this review was to organize a systematic review of data already evidenced by *in vitro* studies using TPC-1 cell line, providing a summary of the main results obtained and describing the metabolic pathways encountered, to enable future *in vivo* studies and clinical trials for contributing to develop new therapeutic strategies for patients which are refractory to conventional treatment.

## MATERIALS AND METHODS

A systematic review of the literature was carried out, designed, structured and registered based on the items of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) tool, and registered in the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) database (CRD42022340699).

### Search strategy and selection criteria

The search was applied to the MEDLINE databases via PubMed, Scientific Electronic Library Online (SciELO), Latin American and Caribbean Health Sciences Literature (LILACS), Virtual Health Library (BVS) and Google Scholar. The descriptors were “thyroid cancer” or “thyroid cancer – papillary”, “TPC-1” and “flavonoids” or “polyphenols”. All original articles that evaluated influences exerted by flavonoids on the TPC-1 cell line using *in vitro* models, published in Portuguese, English or Spanish, were included in the study.

No time limit was used for the publications included, as it is a recent topic in literature. Review articles, clinical studies, studies that did not evaluate the effect of flavonoids specifically in TPC-1 cell line, and, gray literature (letters to the editor, opinion articles, abstracts of scientific events), were excluded.

### Data collection and information quality assessment

After the initial search for descriptors in databases, the first analysis was performed to exclude duplicate studies. The remaining article contents were verified by title

and abstract. This analysis determined the relevance of publications, and those that did not fit the selection criteria were also excluded.

The remaining articles were fully analyzed for the elaboration of this systematic review. After the complete reading of the texts, if any study still did not fit the selection criteria, it was also excluded, specifying the reason for the exclusion.

The manuscripts selected to compose this review had their data extracted into a spreadsheet (Microsoft® Excel version 16.42) based on the following domains: author names, year of publication, type of study, flavonoids used, concentrations of compounds, time of exposure to the compounds, cellular pathways evaluated and the effect of the polyphenols tested on cell lines.

The data obtained were presented through a table, as well as descriptive exposition and discussion of the results.

## RESULTS

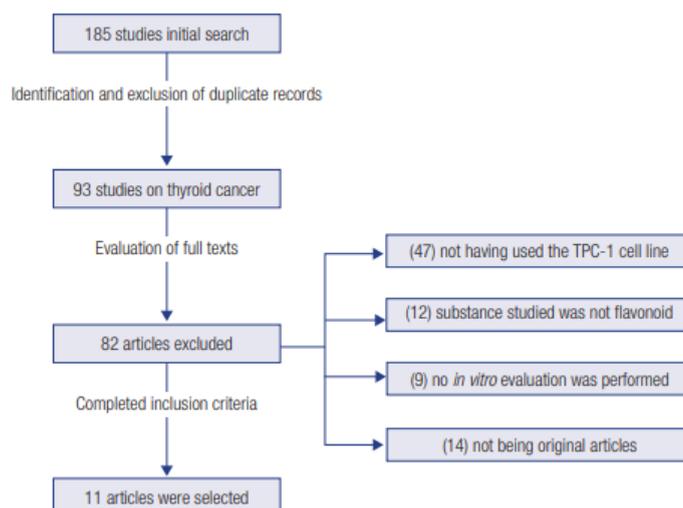
The search resulted in 185 studies published from 1989 to 2022. After the identification and exclusion of duplicate records between the databases and the review studies, in addition to the exclusion of articles that did not use the thyroid cancer cell line criterion, 93 potential articles were evaluated by the titles and abstracts (Figure 1). After that, 82 articles were excluded by the following criteria: those that did not specifically use the TPC-1 cell line criterion ( $n = 47$ ); the substance of interest was not a flavonoid ( $n = 12$ ); no *in vitro* evaluation was performed ( $n = 9$ ); articles that were not original ( $n = 14$ ). Thus, the descriptive synthesis of this review consisted of 11 original articles, all with a pre-clinical design using the TPC-1 cell line criterion and different polyphenols (Figure 1).

The anticarcinogenic mechanisms of the flavonoid substances included in the studies selected were inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and cell cycle modifications, evidenced by methods such as: measurement of apoptotic proteins (caspases), cell cycle regulators (cyclin D1, c-Myc and  $\beta$ -catenin proteins, *P21* and *P53* genes), activators or inhibitors of apoptosis (bax – bcl2 associated X, pro-caspase 3, bcl-2 – B-cell lymphoma 2, mcl-1 – induced myeloid leukemia cell differentiation, nuclear transcription factor – nrf2, survivin, poly(ADP-ribose) polymerase-PARP), inflammatory cytokines (tumor necrosis factor – TNF $\alpha$ ), inductors of cell growth (vascular endothelial

growth factor – VEGF and epidermal growth factor receptor – EGFR) and signaling pathways (mitogen activated protein kinase – MAPK/RAS-RAF-MEK extracellular signal-regulated kinases – ERK cascade

and janus kinase – JAK/signal transducer and activator of transcription – STAT-3 pathway) (5-15).

The main results from the selected articles are demonstrated in Table 1 and Figure 2.



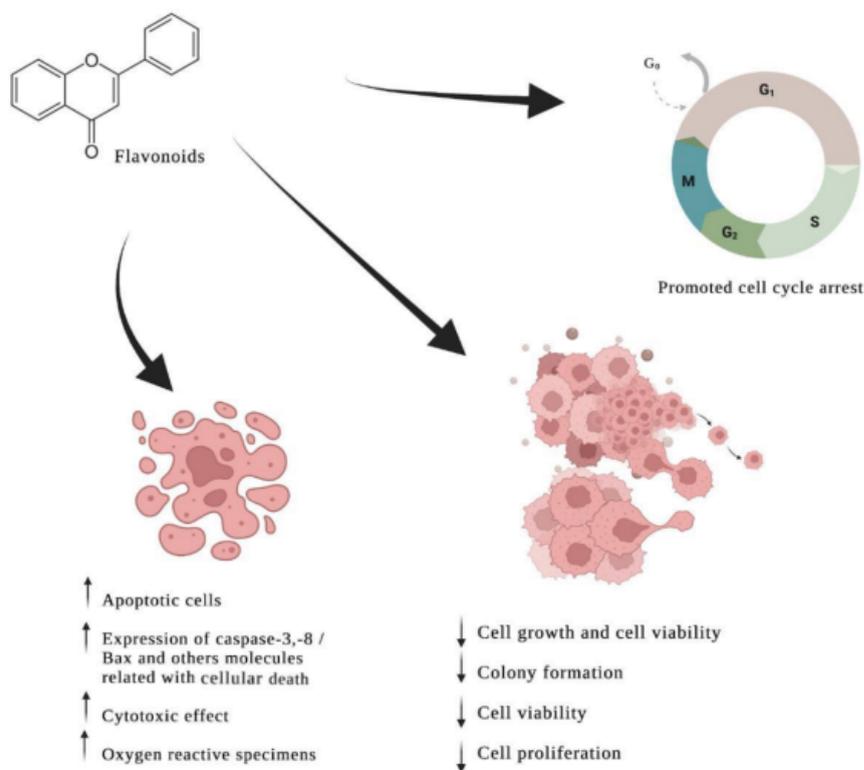
**Figure 1.** Flowchart for article selection.

**Table 1.** Main results about the mechanisms underlying the TPC-1 cell line and the use of flavonoids

References	Flavonoid molecule(s) and concentrations	Analysis methods	Main results
Kang and cols., 2011	Genistein – 72 h exposition with 10-50-100 $\mu\text{M}/\text{mL}$	MTT assay	Inhibition of cell growth in a dose dependent mode
	Resveratrol – up to 120 h exposition with 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$	MTT assay	Inhibition of cell growth
	Quercetin – 72 h exposition with 10-50-100 $\mu\text{M}/\text{mL}$	MTT assay	Inhibition of cell growth in a dose dependent mode
Bian and cols., 2020	Resveratrol – 48 h exposition with up to 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$	MTT assay	Decrease of cell viability in a dose dependent mode
		Flow cytometry	Cell cycle arrest and increase of apoptotic cells
		Colony formation	Colony formation decrease
		Western blotting	Increase of caspase-3,-8 and bax expression, and decrease of bcl-xl and mcl-1 expression
Perna and cols., 2018	Curcumin – 48 h exposition with 25 $\mu\text{M}/\text{mL}$	Immunoblotting	Degradated nrf2 and reduced VEGF expression
		Immunoblotting	Up regulation of TNF $\alpha$ in 2 of the 3 complexes tested
		MTT assay	Reduced cell viability
		Western blotting	Down regulation of cell cycle regulators (cyclin D1, $\beta$ -catenin, p21, p53) and activators or inhibitors of apoptosis (pro-caspase3, bcl-2)
Esposito and cols., 2019	Curcumin – 48 h exposition with 25 $\mu\text{M}/\text{mL}$	MTT assay	Cell viability reduction
		Immunofluorescence	Damage of the cell nucleus
		Western blotting	Down regulation of cell cycle regulators (cyclin D1, $\beta$ -catenin, P21, P53) and activators or inhibitors of apoptosis (pro-caspase3, bcl-2)
Zhou and cols., 2019	Naringin – 6, 12 or 25 $\mu\text{M}/\text{mL}$ , dose- and time-dependently	MTT assay	Cell proliferation inhibition
		Flow cytometry	Cell apoptosis induction
		Western blotting	Enhancement of Caspase3 and bax expression, and reduction of cyclin D1, c-Myc, survivin, and bcl-2 expression; suppression of PI3K/AKT pathway activation

References	Flavonoid molecule(s) and concentrations	Analysis methods	Main results	
Orlandella and cols., 2022	Extract from <i>Annurca Flesh Apple</i> (AFPE) – 24 h exposition with up to 250 $\mu\text{M}/\text{mL}$	Flow cytometry	Reduction of cell viability and promotion of cell cycle arrest	
	Extract from AFPE – 20 h exposition with 500 $\mu\text{M}/\text{mL}$	DCFDA/H2DCFDA-cellular ROS assay kit	Reduction of cell death induced by oxidative stress	
Wu and cols., 2019	Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) – 24 h exposition with doses from 10-200 $\mu\text{M}/\text{mL}$	EdU and MTS assays	Inhibition of cell proliferation and cell viability in a dose dependent mode	
		Flow cytometry	Cell cycle arrest	
	Up to 25 $\mu\text{M}/\text{mL}$ of EGCG	TUNEL staining and western blotting	Increase of the apoptotic index in a dose dependent mode	
	Up to 50-200 $\mu\text{M}/\text{mL}$ EGCG	Western blotting	Increase of the bax/bcl-2 ratio and the expression levels of cleaved caspase-3 and cleaved PARP	
50-200 $\mu\text{M}/\text{mL}$ EGCG		Western blotting	Gradually decrease of p-EGFR, RAS, p-RAF, p-MEK1/2, and p-ERK1/2	
	Yin and cols., 2017	<i>Prunella vulgaris</i> (PV) – Rutin, hyperoside and other flavonoids isolated and identified from PV: luteolin, homoorietin, cinaroside, quercetin and kaempferol. Concentrations of 0, 5, 10, 20 and 30 % for 12, 24 and 36 h	CCK-8 assay	Cell proliferation inhibition
		IC50 PV for 24 h	Hoechst 33342 staining	Alteration of cellular morphology and cell nuclei
			DNA extraction and fragmentation assay	Induction of cell apoptosis
		RT-qPCR	Decrease bcl-2 expression and increase bax and caspases-3 expression	
Liang and cols., 2020	Fisetin from 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ to 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$ for 24 h	MTT assay	Promotion of a cytotoxic effect in a dose dependent mode	
	15 $\mu\text{M}/\text{mL}$ for 24 h	Morphological examination in fluorescence microscope	Induction of cell apoptosis without compromising cellular membrane	
	20 $\mu\text{M}/\text{mL}$ for 24 h	Morphological examination in fluorescence microscope	Elevated quantity of late apoptotic cells - strong effect on the nucleus morphology related to apoptosis	
		DCFH-DA dye	ROS enhancement	
		Spectrofluorimetry	Reduction of the mitochondrial membrane potential	
	15-20 $\mu\text{M}/\text{mL}$ for 24 h	Flow cytometry	Alteration of cell cycle progression in a dose dependent mode	
		Western blotting	Down regulation of the cyclin D1 expression; up regulation of STAT3 and decreased expression of JAK-1	
	ELISA	Elevated protein expression of cleaved caspase-3, and -9 in a dose dependent mode		
Oh and cols., 2013	Silibinin – 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ for 24 h	Quick cell proliferation assay kit II	Decrease in cell viability	
Carvalho and cols., 2018	Xanthohumol – 10-100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ for 48 h	Sulforhodamine B assay	Decrease in cell viability in a dose dependent mode	
	100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ for 48 h	TUNEL assay	High cell death rate and high percentage of fragmented DNA	
	Concentrations up to 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$ for 48 h	Western blotting	Increase in caspase-3 and caspase-7 expression	
	10 $\mu\text{M}/\text{mL}$ for 72 h	Flow cytometry	Cell cycle arrest	
	0.05-0.1-100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ for 72 h	Fenton reaction initiated deoxyribose degradation cell-free assay	Radical levels increase at higher concentrations (pro-oxidant effect)	

Acronyms: MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide); bax (bcl2 associated X), bcl-xl (B-cell lymphoma); mcl-1 (induced myeloid leukemia cell differentiation); nr12 (nuclear transcription factor -2); VEGF (vascular endothelial growth factor); TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ); ROS (Reactive Oxygen Species); PI3K/AKT (phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B); AFPE (*Annurca Flesh Apple*); DCFDA/H2DCFDA – Cellular ROS (2',7'-dichlorofluorescein diacetate and reactive oxygen species); EGCG (Epigallocatechin-3-gallate); EdU; (5-ethynyl-2'-deoxyuridine); MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]; TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling); PARP [poly(ADP-ribose) polymerase]; EGFR (epidermal growth factor receptor); RAS (rat sarcoma); RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma); MEK (mitogen-activated protein kinase kinase); ERK (extracellular signal-regulated kinase); PV (*Prunella vulgaris*); CCK-8 assay (cell counting kit-8); DNA (deoxyribonucleic acid); STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3); JAK-1 (janus kinase-1); RT-qPCR (Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction).



**Figure 2.** Summary of polyphenols mechanisms of influence on TPC-1 cell line.

Created by the authors using Biorender.

## DISCUSSION

### Thyroid cancer

Thyroid cancer is considered the most common endocrine neoplasm in the world. According to the Global Cancer Observatory, its incidence in 2020 was 6.6 per million individuals, being the fifth most common malignancy diagnosed in women. Papillary thyroid carcinoma represents about 90% of all thyroid cancers (1). Studies report that this increasing incidence may be related to greater medical vigilance and improved diagnosis, mainly associated with the introduction of new technologies and more availability of ultrasound examinations. Besides that, other factors such as obesity, iodine intake, environmental exposure to chemicals, use of fertility drugs (such as clomiphene citrate and progesterone) and insulin resistance syndrome may also have potential contributions (16,17). According to Borges and cols. (2020), this neoplasm is predominant in fertile women.

Thyroid cancer is divided into subtypes according to the degrees of cell differentiation and their histological

and pathological features, which have strong influence in disease progression and treatment strategies. Among the thyroid cancer subtypes, the well-differentiated carcinomas are the most frequent, such as papillary and follicular thyroid cancer. The other tumors correspond to medullary and anaplastic carcinomas that tend to be more aggressive and less responsive to treatment (18). The average age of diagnosis for well-differentiated carcinomas is between 45 and 55, and, among the main symptoms, thyroid cancer is usually characterized by the presence of nodules, swelling and asymmetry of the neck, but, in most cases, may be completely asymptomatic (19).

Several aspects can increase the risk of developing this pathology, including a history of radiation exposure, a family history of thyroid cancer in a first-degree relative and some genetic conditions, such as multiple endocrine neoplasia syndrome. The main treatment for thyroid cancer is surgery (total or partial thyroidectomy), and other postoperative interventions may be needed according to tumor characteristics, such as radioactive iodine therapy (3).

In 2017, the US Preventive Services Task Force published a review against screening thyroid nodules in an asymptomatic general adult population, for it ended up causing greater harm compared to the expected benefits, mainly due to unnecessary surgery and postoperative complications (2).

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common histological subtype, accounting for 90% of cases. It develops in follicular cells and has a benign behavior (20). Most cases involving this carcinoma present a positive evolution when treated correctly, with low mortality rates. However, in refractory cases, five-year survival is  $<50\%$  and has an estimated incidence of 4-5 cases per million, resulting in impaired quality of life and possible unfavorable outcomes (21,22). These cases usually involve PTC variants, which have more aggressive clinicopathological features and are associated with higher mortality due to their high metastatic rate, such as the micropapillary variant (23), solid variant (24) and tall cell variant (25).

In recent years, protein tyrosine kinase inhibitors have emerged as an alternative for treatment in refractory cases of PTC. They target intracellular tyrosine kinase (TK), a protein that catalyzes protein substrates and modulates enzymatic activity, positively interfering in various mechanisms of tumor growth and spread, such as angiogenesis, lymphangiogenesis and proliferation of cancer cells. Different TK inhibitors, such as Subnitib<sup>®</sup>, Sorafenib<sup>®</sup> and Vandetanib<sup>®</sup>, act on several TKs, inhibiting target cells in a non-selective manner. For this reason, severe side effects may occur due to toxicity associated with the difficulty in selecting specific targets and to the use of high doses needed because of the possibility of developing drug resistance (26,27).

## Flavonoids

Flavonoid is the nomenclature used to define a class of polyphenolic substances of plant origin (28).

The basic chemical structure of this group, which is the most representative class of phyto phenolic compounds, is composed of two aromatic rings linked by three carbons, which can convert to an oxygenated heterocyclic structure (C6-C3-C6). They are found in a wide variety of foods, such as fruits, vegetables, wine, chocolate and tea (Table 2) (29).

In this context, there are divergences in the literature below regarding the dosage of these compounds in daily diet, since this value is influenced by factors such as: age and sex of the population, method of analysis for absorption in each individual and even annual season and soil characteristics, since they cause differences in the quality of flavonoid substances. Some studies have shown considerable differences in the amount of flavonoid intake per day, which values can vary from 23.0 mg to 1.0 g or 1.1 g (30,31).

It is also worth highlighting the classification of these substances, since structural differences at the molecular level can promote different biological effects (32). Regarding the therapeutic potential of this polyphenolic class, studies indicate its importance in several scenarios, both for treatment and prevention of diseases. In that context, its potential effect on cardiovascular diseases, cancer, gastric and duodenal ulcers, vascular fragilities and as antibacterial and anti-allergic treatments were described (33).

Among the biological effects mentioned – one of great value, especially regarding cancer therapy – is the antineoplastic potential of flavonoids due to their antiproliferative activity. In this sense, many studies reveal the inhibition of cell transformation and proliferation with the administration of flavonoid substances. A North American study describes the influence of some different classes of polyphenols as inhibitors of neoplastic transformation, highlighting the diverse action mechanisms of these compounds used individually or combined (34). Furthermore,

**Table 2.** Flavonoids with substance examples and their food sources

Subclass	Substances	Source
Flavanols	Epigallocatechin, catechin, epicatechin	Food (astringency, bitterness, sourness, viscosity, aroma and color features)
Flavonols	Quercetin, kaempferol, myricetin, rutin	Cherries, grapes, apricots, red wine, chocolate and tea
Anthocyanidins	Pelargonidin, cyanidin, malvidin	Vegetables (colors blue, purple and red)
Flavones	Luteolin, apigenin, chrysin	Fruit and vegetables
Isoflavones	Genistein, daidzein	Leguminous plants
Flavonones	Naringenin, hesperidin, eriodictyol	Citrus

Adapted from: Cosme and cols., 2020 (31); De Souza Dos Santos and cols., 2011 (32).

a European study shows that flavonoids have the potential to inhibit cell growth, especially in the context of colorectal cancer. Thus, while inhibiting cell proliferation of the epithelium and inducing the process of apoptosis, such substances may have therapeutic potential (35).

### Therapeutic potentials

Regarding flavonoids and the concentrations used in the studies, genistein and quercetin were administered by Kang and cols. (2011) in a 72-hour exposition with concentrations of 10, 50 and 100  $\mu\text{M}/\text{mL}$ . Both compounds promoted inhibition of cell growth in a dose-dependent mode in the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay. In the same study, exposition of resveratrol in a concentration of 50  $\mu\text{M}/\text{mL}$  for up to 120 hours showed an inhibition of cell growth (5).

Resveratrol was also used by Bian and cols. (2020) at a concentration of up to 50  $\mu\text{M}/\text{mL}$  in a 48 hours exposition, and presented different results according to the method of analysis applied. The analysis from the MTT assay revealed a decrease in cell viability in a dose dependent mode; in the flow cytometry method, cell cycle arrest and increase of apoptotic cells was observed; in the Colony formation, a colony formation decrease was found. Western blotting analysis showed an increase of caspase-3, -8 and bax expression, and a decrease of bcl-xl and mcl-1 expression (7).

Perna and cols. (2018) evaluated curcumin with a concentration of 25  $\mu\text{M}/\text{mL}$  in a 48-hour exposition, showing different cellular responses according to the method of analysis. In the Immunoblotting method, three results were obtained: degraded nrf2, reduced VEGF expression and up-regulated TNF $\alpha$  in 2 of the 3 complexes tested. In the analysis from the MTT assay, there was a reduced cell viability, and in the Western blotting analysis, both cell cycle regulators (cyclin D1,  $\beta$ -catenin, P21, P53) and apoptosis regulators (procaspase3, bcl-2) were down-regulated (10).

Curcumin was also used by Esposito and cols. (2019) in a 48-hour exposition with a concentration of 25  $\mu\text{M}/\text{mL}$ . The MTT assay revealed cell viability reduction, and immunofluorescence analysis demonstrated damage to the cell nucleus. There was a down regulation of cell cycle regulators (cyclin D1,  $\beta$ -catenin, p21, p53) and apoptosis regulators (procaspase3, bcl-2), verified by Western blotting, similar to that observed by Perna and cols. (2018) (9,10).

Zhou and cols. (2019) used narigin at concentrations of 6, 12 or 25  $\mu\text{M}/\text{mL}$ . In the MTT assay, cell proliferation inhibition was observed, and flow cytometry showed an induction in cell apoptosis. In the Western blotting analysis, there was an enhancement of caspase 3 and bax expression, reduction of cyclin D1, c-Myc, survivin, and bcl-2 expression, as well as the suppression of PI3K/AKT pathway activation (12).

Using extract from Annurca Flesh Apple (AFPE), Orlandella and cols. (2022) applied it in a 24 hours exposition with a concentration of up to 250  $\mu\text{M}/\text{mL}$ , resulting in a reduction of cell viability and promotion of cell cycle arrest analyzed by flow cytometry. Another concentration of AFPE (500  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) in a 20 hours exposition was evaluated by the DCFDA/H2DCFDA – Cellular ROS Assay Kit, obtaining a reduction of cell death induced by oxidative stress, contrasting with the findings described so far (13).

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) showed different cellular responses when used in different concentrations in the study by Wu and cols. (2019). Considering 24 hours of exposure with doses between 10-200  $\mu\text{M}/\text{mL}$ , it inhibits cell proliferation and cell viability when analyzed by EdU and MTS assays methods, and causes cell cycle arrest as shown in flow cytometry. In the same article, concentration up to 25  $\mu\text{M}/\text{mL}$ , evaluated by TUNEL staining and Western blotting, revealed an increase of the apoptotic index. Concentrations up to 50-200  $\mu\text{M}/\text{mL}$ , using Western blotting method, showed an increase of the bax/bcl-2 ratio and the expression levels of cleaved caspase-3 and cleaved PARP. Furthermore, Western blotting was used to analyze exposure with 50-200  $\mu\text{M}/\text{mL}$  EGCG, which revealed a gradually decrease of p-EGFR, RAS, p-RAF, p-MEK1/2 and p-ERK1/2 (11).

In the study by Yin and cols. (2017) *Prunella vulgaris* (PV) was used, a compound with rutin, hyperoside and other flavonoids isolated and identified from PV (luteolin, homoerinetin, cinaroside, quercetin and kaempferol). At concentrations of 0, 5, 10, 20 and 30% for 12, 24 and 36 hours, based on a CCK-8 assay, cell proliferation inhibition was observed. When used 50% PV for 24 hours, the Hoechst 33342 staining method revealed alteration of cellular morphology and cell nuclei, DNA extraction and fragmentation assay showed induction of cell apoptosis and RT-qPCR indicated decrease of bcl-2 expression and increase of bax and caspase-3 expression (8).

Fisetin was used in the research conducted by Liang and cols. (2020) at concentrations from 1  $\mu\text{M}/\text{mL}$  to 30  $\mu\text{M}/\text{mL}$  for 24 hours, promoting a cytotoxic effect evidenced by the MTT assay. At 15  $\mu\text{M}/\text{mL}$  dose, through the morphological examination in a fluorescence microscope, induction of cell apoptosis without compromising cellular membrane was visualized. In the concentration of 20  $\mu\text{M}/\text{mL}$ , still using the same analysis, an elevated quantity of late apoptotic cells was observed. The same dose revealed ROS enhancement, shown by DCFH-DA dye method, and reduction of the mitochondrial membrane potential was detected by spectrofluorimetry. The concentration of 15-20  $\mu\text{M}/\text{mL}$  was analyzed by flow cytometry which showed an alteration of cell cycle progression in a dose dependent mode. The Western blotting method revealed a down regulation of the cyclin D1 expression; up regulation of STAT3 and decreased expression of JAK-1. ELISA analysis showed an elevated protein expression of cleaved caspase-3, and -9 in a dose dependent mode (6).

Silibinin was applied by Oh and cols. (2013) with a 100  $\mu\text{M}/\text{mL}$  dose for 24 hours, which revealed a decrease in cell viability with the quick cell proliferation assay kit II (14). Xanthohumol was used in the research by Carvalho and cols. (2018) for two 48-hour and 72-hour time slots of exposure. For the first time slot, 10-100  $\mu\text{M}/\text{mL}$  concentration showed, in sulforhodamine B assay, a decrease in cell viability in a dose dependent mode. Concentrations of 100  $\mu\text{M}/\text{mL}$  revealed a high cell death rate and high percentage of fragmented DNA in the TUNEL assay, and finally in doses of up to 10  $\mu\text{M}/\text{mL}$  demonstrated an increase in caspase-3 and caspase-7 expressions using the western blotting method. For the second time slot another 10  $\mu\text{M}/\text{mL}$  concentration was applied, which revealed a cell cycle arrest using flow cytometry. Finally, exposure to doses of 0.05-0.1-100  $\mu\text{M}/\text{mL}$  showed increased levels of ROS at higher concentrations (pro-oxidant effect) through a fenton reaction and deoxyribose degradation cell-free assay (15).

In summary, all polyphenol substances studied had a molecular influence in the TPC-1 cell lineage, mostly in a dose and time dependent manner. Cellular proliferation was inhibited in all studies analyzed, most of them showed by the MTT assay (5-7,9,10,12,14,36). Cell cycle arrest was another mechanism evaluated primarily by using flow cytometry (37). The majority of polyphenols increased the activity of caspases (6-12,15)

and down-regulated the activity of cyclin D1, leading to cell death (6,9,10,12). The induction of apoptosis, evaluated by flow cytometry (7,12), TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) assay (11), DNA extraction and fragmentation assay (8), and analysis through morphological examination in a fluorescence microscope (6) found DNA damage (8,15) and accumulation of ROS (6,15). In contrast, only one study using pretreatment with AFPE showed a reduction in cell death induced by oxidative stress, underlying that polyphenols found specifically in this source may (alone or in combination) show a protective effect in this specific scenario (13). Finally, cell cycle and apoptosis regulators, inflammatory cytokines, inducers of cell growth, signaling pathways and altered mitochondrial membrane potentiality were also associated to the causing of cell death in TPC-1 lineage (6-13,15).

Therefore, it is possible to consider that many polyphenolic compounds have antineoplastic properties specifically in TPC-1 cell lineage. *In vitro* studies obtained results by using concentrations above usual dietary consumption, and tested the toxicity in control cells, without evidence of cell damage. However, this result is limited to cellular analysis, and this evidence should be used for studies in animal models, aiming to know the real safety and efficacy of these substances in this scenario. According to this evidence, some studies have already tested these polyphenolic compounds associated with antineoplastic drugs and the results, so far, are promising. For example, cisplatin administered with curcumin in mice potentiates the cytotoxicity via mediating cell death and cycle arrest, enhancing drug sensitivity and preventing resistance, in addition to reduced cisplatin-mediated side effects (38). Specifically, on thyroid cancer, a study using PTC cell culture of thyroidectomized patients showed that the addition of the isoflavone daidzein conjugated with an anti-estrogenic compound (N-t-boc-hexylenediamine) was able to amplify the inhibitory effect of Sorafenib<sup>®</sup> on cells, with a dosage ten times lower, reducing its important side effects (39). Another study, using PTC cell lineages K1 and BCPAP, showed that the co-administration of polyphenol quercetin and Sorafenib<sup>®</sup> lead to a reduction of the proliferation, adhesion and migration properties of the cells, enabling the reduction of the effective anticancer dosage of the drug (40).

Although relevant, these findings are reflected in *in vitro* studies using high doses of phytochemicals.

Their usual consumption was not able to demonstrate protection or risk of inducing neoplasms, whether thyroid or other primary foci. In addition to the amount of exposure to the phytochemical, one must consider the factors that influence the extraction of the active ingredient, which vary according to location, sun exposure, soil characteristics, among other factors. Therefore, to extrapolate these findings to all substances, it would be necessary to rigidly standardize the substances and adequately measure it in individuals who, in addition to the confounding factors related to the phytochemical, also suffer influences in the individual's organism, where absorption can be influenced by intestinal flora, interactions with other medications and other possible influencers. Therefore, an animal model with greater possibility of controlling individual factors and a standardization of the substance would be necessary to carry out more in-depth studies on this topic (41,42).

In conclusion, there is evidence that polyphenolic compounds have antineoplastic properties on a cellular level, through mechanisms such as inhibiting cell growth, increasing expression of apoptotic proteins, stimulating down regulation of cell cycle regulators and causing DNA damage, but, so far, in doses above those usually obtained through dietary consumption. There is also no evidence of toxicity considering cellular models. These findings reveal a possible therapeutic potential of polyphenols due to their direct effects on neoplastic cells and their actions combined with antineoplastic drugs. However, these results deserve further studies, advancing to trials in animal models and in association with other substances such as tyrosine kinase inhibitors, and, seeking alternatives for the treatment of refractory cases, which are extremely limited in current treatments.

Funding: no funding was needed in this article

Disclosure: no potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## REFERENCES

- Danckert B, Ferlay J, Engholm G, Hansen HL, Johannesen TB, Khan S, et al. Global Cancer Observatory: cancer today. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2020. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>
- U.S. Preventive Services Task Force. Screening for Thyroid Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA*. 2017;317(18):1882-7.
- Tuttle RM, Haugen B, Perrier ND. Updated American Joint Committee on Cancer/Tumor-Node-Metastasis Staging System for Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer (8th Edition): What Changed and Why? *Thyroid*. 2017;26(6):751-6.
- Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*. 2020;12(2):457.
- Kang HJ, Youn YK, Hong MK, Kim LS. Antiproliferation and Redifferentiation in Thyroid Cancer Cell Lines by Polyphenol Phytochemicals. *J Korean Med Sci*. 2011;26(7):893.
- Liang Y, Kong D, Zhang Y, Li S, Li Y, Ramamoorthy A, et al. Fisetin Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis via JAK/STAT3 Signaling Pathways in Human Thyroid TPC 1 Cancer Cells. *Biotechnol Bioproc Eng*. 2020;25(2):197-205.
- Bian P, Hu W, Liu C, Li L. Resveratrol potentiates the anti-tumor effects of rapamycin in papillary thyroid cancer: PI3K/AKT/mTOR pathway involved. *Arch Biochem Biophys*. 2020;689(15):108461.
- Yin DT, Lei M, Xu J, Li H, Wang Y, Liu Z, et al. The Chinese herb *Prunella vulgaris* promotes apoptosis in human well-differentiated thyroid carcinoma cells via the B-cell lymphoma-2/bcl-2-associated X protein/caspase-3 signaling pathway. *Oncol Lett*. 2017;14(2):1309-14.
- Esposito T, Lucariello A, Hay E, Contieri M, Pasquale T, Varriale B, et al. Effects of curcumin and its adjuvant on TPC1 thyroid cell line. *Chem Biol Interact*. 2019;305:112-8.
- Perna A, Luca AD, Adelfi L, Pasquale T, Varriale B, Esposito T. Effects of different extracts of curcumin on TPC1 papillary thyroid cancer cell line. *BMC Complement Altern Med*. 2018;18:63.
- Wu D, Liu Z, Li J, Zhang Q, Zhong P, Teng T, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits the growth and increases the apoptosis of human thyroid carcinoma cells through suppression of EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathway. *Cancer Cell Int*. 2019;19:43.
- Zhou J, Xia L, Zhang Y. Naringin inhibits thyroid cancer cell proliferation and induces cell apoptosis through repressing PI3K/AKT pathway. *Pathol Res Pract*. 2019;215(12):152707.
- Orlandella FM, Mirabelli P, Stefano AED, Iervolino PLC, Luciano S, D'Angelo S, et al. Effects of Annurca Flesh Apple Polyphenols in Human Thyroid Cancer Cell Lines. *Oxid Med Cell Longev*. 2022.
- Oh S, Jung SP, Han J, Kim S, Kim JS, Nam SJ, et al. Silibinin inhibits TPA-induced cell migration and MMP-9 expression in thyroid and breast cancer cells. *Oncol Rep*. 2013;29:1343-8.
- Carvalho DO, Freitas J, Nogueira P, Henriques SN, Carmo AM, Castro MA, et al. Xanthohumol inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human thyroid cells. *Food Chem Toxicol*. 2018;121:450-7.
- Veiga LHS, Neta G, Aschetbrook-Kilfoy B, Ron E, Devesa SS. Thyroid Cancer Incidence Patterns in Sao Paulo, Brazil, and the U.S. SEER Program, 1997-2008. *Thyroid*. 2013;23(6):748-57.
- Yu Q, Lv XY, Liu KP, Ma DK, Wu YH, Dai WJ, et al. Fertility Drugs Associated with Thyroid Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2018;2018:7191704.
- Guenther R, Patel Z, Chen H. Notch Signaling in Thyroid Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1287:155-68.
- Borges AKM, Ferreira JD, Koifman S, Koifman RJ. Thyroid Cancer in Brazil: descriptive study of cases informed by hospitalar medical records, 2000-2016. *Epidemiol Serv Saude*. 2020;29(4).
- Seib CD, Sosa JA. Evolving Understanding of the Epidemiology of Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2019;48(1):23-35.
- Rosário PW, Ward LS, Carvalho GA, Graf H, Maciel RMB, Maia AL, et al. Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: update on the Brazilian consensus. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2013;57:260-4.
- Filletti S, Durante C, Hartdl D, Leboulloux S, Locati LD, Newbold K, et al. Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019;30(12):1856-83.

23. Graef AD, Heede KVD, Meert V, Slycke SV. Papillary thyroid carcinoma with hobnail features showing rapid progression and therapy resistance. *Acta Chir Belg.* 2021;12(2):77-85.
24. Ohashi R. Solid variant of papillary thyroid carcinoma: an under-recognized entity. *Endocr J.* 2020;67(3):241-8.
25. Girard FM, Barra MB, Zettler CG. Variantes do carcinoma papilífero da tireoide: associação com fatores prognósticos histopatológicos. *Braz J Otorrinolaryngol.* 2013;79(6):738-44.
26. Hadoux J, Schlumberger M. Chemotherapy and tyrosine-kinase inhibitors for medullary thyroid cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2017;31(3):335-47.
27. Fallahi P, Ferrari SM, Galdiero MR, Varricchi G, Elia G, Ragusa F, et al. Molecular targets of tyrosine kinase inhibitors in thyroid cancer. *Semin Cancer Biol.* 2022;79:180-96.
28. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr.* 2022;22:19-34.
29. Cosme P, Rodríguez AB, Espino J, Garrido M. Plant Phenolics: Bioavailability as a Key Determinant of Their Potential Health-Promoting Applications. *Antioxidants.* 2020;9(12):126.
30. Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer.* 1993;20(1):21-9.
31. Kühnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet.* 1976;24:117-91.
32. Santos MCS, Gonçalves CFL, Vaisman M, Ferreira ACF, Carvalho DP. Impact of flavonoids on thyroid function. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(10):2495-502.
33. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998;56(11):317-33.
34. Franke AA, Cooney RV, Custer LJ, Mordan LJ, Tanaka Y. Inhibition of neoplastic transformation and bioavailability of dietary flavonoid agents. *Adv Exp Med Biol.* 1998;439:237-48.
35. Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr.* 1999;38(3):133-42.
36. Hosokawa M, Nogi K, Naito M, Yokoyama T. *Nanoparticle Technology Handbook.* 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 2018.
37. McKinnon KM. *Flow Cytometry: An Overview.* *Curr Protoc Immunol.* 2018;120:5.1.1-11.
38. Abadi AJ, Mirzaei S, Mahabady MK, Hashemi F, Zabolian A, Hashemi F. Curcumin and its derivatives in cancer therapy: Potentiating antitumor activity of cisplatin and reducing side effects. *Phytother Res.* 2022;36(1):189-213.
39. Izhakov E, Sharon O, Knoll E, Aizic A, Fliss DM, Kohen F, et al. A sorafenib-sparing effect in the treatment of thyroid carcinoma cells attained by co-treatment with a novel isoflavone derivative and 1,25 dihydroxyvitamin D3. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018;182:81-86.
40. Celano M, Maggiasano V, Bulotta S, Allegri L, Pecce V, Abballe L, et al. Quercetin improves the effects of sorafenib on growth and migration of thyroid cancer cells. *Endocrine.* 2020;67(2):496-8.
41. Pistolatto F, Masias M, Agudo P, Giampieri F, Battino M. Effects of phytochemicals on thyroid function and their possible role in thyroid disease. *Ann NY Acad Sci.* 2019;1443(1):3-19.
42. Gonçalves CFL, De Freitas ML, Ferreira ACF. Flavonoids, Thyroid Iodide Uptake and Thyroid Cancer – A Review. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6):1247.



## ANEXO B - Termo de Consentimento Livre Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

#### **Avaliação de componentes do sistema purinérgico e perfil oxidativo em pacientes com câncer de cabeça e pescoço**

Prezado Participante, Você está sendo convidado (a) a participar voluntariamente da pesquisa “Avaliação de componentes do sistema purinérgico e perfil oxidativo em pacientes com câncer de cabeça e pescoço”. Desenvolvida pela colaboradora técnica administrativa da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) e aluna do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBQA) da Universidade Federal De Santa Catarina (UFSC), Filomena Marafon, e por discentes dos cursos da área da saúde da UFFS – *Campus* Chapecó, sob a orientação da Professora Margarete Dulce Bagatini, professora titular da UFFS e professora convidada do PPGBQA. O objetivo central desse estudo é avaliar os componentes do sistema purinérgico e perfil oxidativo em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (CCP). Esta pesquisa se justifica em decorrência das inúmeras alterações metabólicas associadas ao CCP, devido à correlação do estresse oxidativo com uma maior incidência de tumores e da sinalização purinérgica com alterações do microambiente tumoral, estando associados a um pior prognóstico dos pacientes. O convite a sua participação se deve ao atendimento aos critérios de inclusão propostos pelos autores: idade superior a 20 anos e diagnóstico de CCP para os pacientes do grupo teste e para o grupo controle, indivíduos saudáveis com idade superior a 20 anos. Sua participação não é obrigatória e você tem plena autonomia para decidir se quer ou não participar, bem como desistir da colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação e sem nenhuma forma de penalização. Você não será penalizado de nenhuma maneira caso decida não consentir sua participação, ou desista da mesma. Contudo, ela é muito importante para a execução da pesquisa. Você não receberá remuneração e nenhum tipo de recompensa nesta pesquisa, sendo sua participação voluntária. Esclarecemos também que, apenas os pesquisadores que assinam este documento terão acesso aos dados das análises de seu sangue, e todas as precauções serão tomadas para manter sigilo absoluto sobre seu nome e respectivos dados. No entanto, sempre existe o risco remoto de que ocorra quebra de sigilo e anonimato, mesmo que seja não intencional e involuntário, caso isso ocorra, as consequências serão tratadas de acordo com a resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde. Esclarecemos também, que teremos acesso e ao seu prontuário médico para obtenção de dados sobre terapia medicamentosa e protocolo de tratamento empregado, utilização de medicação contínua, estadiamento e caracterização histopatológica do tumor, presença de recidivas. Serão garantidas a confidencialidade e a privacidade das informações por você prestadas. Qualquer dado que possa identificá-lo será omitido na divulgação dos resultados da pesquisa e o material armazenado em local seguro. A qualquer momento, durante a pesquisa, ou posteriormente, você poderá solicitar do pesquisador informações sobre sua participação e/ou sobre a pesquisa, o que poderá ser feito através dos meios de contato explicitados neste Termo. A sua participação consistirá em responder a um formulário com dados de identificação, socioeconômicos e outras informações relevantes. Você será submetido a coleta de sangue para análises laboratoriais, para estes você concederá a pesquisadora uma amostra de aproximadamente quinze (15) mL de sangue total, durante coleta realizada no HRO. Ao final da pesquisa, todo material será mantido em arquivo, físico ou digital, por um período de cinco anos. A pesquisa será desenvolvida segundo as normas da Resolução nº. 466 de 12 de dezembro de 2012. Segundo esta resolução, qualquer pesquisa possui riscos e benefícios. Referente ao formulário de pesquisa caso você não se sinta confortável com os questionamentos

poderá se abster de respondê-los. Pode ocorrer um risco associado ao procedimento de coleta, que incluem tontura ou mal-estar, sendo que para minimizá-lo a coleta será executada por profissional qualificado, e caso o participante sinta-se mal durante esse procedimento a pesquisadora irá aferir a pressão arterial e acompanhá-lo até normalização, caso o mal-estar persista o paciente será encaminhado à assistência médica. O benefício relacionado com a sua colaboração nesta pesquisa incluem o acesso aos resultados laboratoriais e orientações em caso da presença de alterações laboratoriais, sendo estes casos encaminhados para atendimento especializado. Os pesquisadores procederão a devolutiva dos resultados desta pesquisa em visita agendada com o paciente no HRO e realizarão palestras informativas e discussão dos resultados. Asseguramos que a coleta de sangue é realizada por profissionais capacitados e acompanhada pela pesquisadora, e você terá toda a assistência necessária caso venha se sentir desconfortável durante e momentos após a coleta de sangue, tendo plena assistência dos pesquisadores em qualquer momento que necessitar. As informações e os resultados obtidos através das análises laboratoriais, poderão ser utilizados em congressos científicos ou publicados em revistas científicas, asseguramos que jamais revelaremos seu nome, instituição ou qualquer informação relacionada a sua privacidade para que você não seja identificado. Caso concorde em participar, uma via deste termo ficará em seu poder e a outra será entregue ao pesquisador, pois esse documento é elaborado em duas vias, e todas as páginas devem ser rubricadas, e assinatura deve constar na página final do termo. O TCLE garante seus direitos como participante da pesquisa e nela está presente o contato e o endereço dos pesquisadores, bem como do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFFS para quaisquer dúvidas que você venha a ter futuramente.

Eu, (NOME COMPLETO) \_\_\_\_\_ declaro que li (ou tive este documento lido por uma pessoa de confiança) e entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa, bem como, tive todos os esclarecimentos que julguei necessários sobre a pesquisa repassados pelos pesquisadores. Portanto opto por livre e espontânea vontade em participar da pesquisa. Assinatura: \_\_\_\_\_.

Eu, Filomena Marafon, como aluna e pesquisadora, atesto que esclareci cuidadosamente a natureza e o objetivo deste estudo, os possíveis riscos e benefícios da participação no mesmo, junto ao participante, bem como comprometo-me a conduzir esta pesquisa de acordo com as leis preconizadas na Resolução 466/12 de 12/06/2012, que trata dos preceitos éticos e da proteção aos participantes dessa pesquisa. Assinatura: \_\_\_\_\_.

Eu, Margarete Dulce Bagatini, como pesquisadora responsável, atesto que esclareci cuidadosamente a natureza e o objetivo deste estudo, os possíveis riscos e benefícios da participação no mesmo, junto ao participante, bem como, comprometo-me a conduzir esta pesquisa de acordo com as leis preconizadas na Resolução 466/12 de 12/06/2012, que trata dos preceitos éticos e da proteção aos participantes dessa pesquisa. Assinatura: \_\_\_\_\_.

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS:

Tel e Fax - (049) 2049-3745

E-Mail: cep.uffs@uffs.edu.br

[http://www.uffs.edu.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2710  
&Itemid=1101&site=proppg](http://www.uffs.edu.br/index.php?option=com_content&view=article&id=2710&Itemid=1101&site=proppg)

Endereço para correspondência: Universidade Federal da Fronteira Sul/UFFS – Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS, Bloco da Biblioteca, Sala 310, 3º andar, Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul, CEP 89815-899, Chapecó, Santa Catarina, Brasil.

#### CONTATOS DOS PESQUISADORES

Endereço Profissional – Pesquisador Principal

Margarete Dulce Bagatini

Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS

Endereço: Campus Chapecó, SC 484, Km 02, s/n, Bairro Fronteira Sul;  
Chapecó/SC

Telefone: (49) 2049-6456

E-mail: margarete.bagatini@uffs.edu.br

Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_\_



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - CHAPECÓ

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 19/2023 - PPGCB - CH (10.41.13.10.05)

Nº do Protocolo: 23205.020369/2023-32

Chapecó-SC, 10 de julho de 2023.

**Ata de Defesa de Dissertação XX/PPGCB/UFS/2023**

Defesa de Dissertação da mestranda Marielle Lang Makiyama, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas.

Aos seis dias do mês de julho do ano de dois mil e vinte e três, às dezoito e trinta horas, de modo remoto, via webex, reuniu-se banca examinadora para defesa da dissertação apresentada por Marielle Lang Makiyama, intitulada: "*Efeitos do fitoquímico cafeína na linhagem celular TPC-1 de carcinoma de tireoide*". A Banca Examinadora composta pelos(as) professores(as): Profº. Dr. Marcelo Moreno (Orientador/presidente - UFFS), Profª. Dra. Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel (membro interno – UFFS); Profª. Dra. Jucimara Baldissarelli, (Membro Externo – UFPEL); Profª. Dra. Margarete Dulce Bagatini (Coorientadora - UFFS). O presidente da banca deu por aberta a sessão e logo a seguir passou a palavra à mestranda, para que no tempo de trinta e sete minutos expusesse seu trabalho. Terminada a exposição, passou-se à arguição da Banca Examinadora. Os membros examinadores decidiram por (X) aprovar ( ) reprovar o trabalho.

**Observações:** Realizar as alterações sugeridas pela banca.

Nestes termos, esta ata segue assinada digitalmente pelos membros da banca, exceto o mestrando.

  
(Assinado digitalmente em 10/07/2023 17:47)  
MARCELO MORENO  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
ACAD - CH (10.41.13)  
Matrícula: ###217#4

(Assinado digitalmente em 12/07/2023 14:04)  
MARGARETE DULCE BAGATINI  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DPG (10.51.05)  
Matrícula: ###325#3

(Assinado digitalmente em 10/07/2023 16:04)  
SARAH FRANCO VIEIRA DE OLIVEIRA MACIEL  
COORDENADOR DE CURSO  
PPGCB - CH (10.41.13.10.05)  
Matrícula: ###122#6

(Assinado digitalmente em 18/07/2023 17:00)  
JUCIMARA BALDISSARELLI  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ###.###.880-##

**Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Makiyama, Marielle Lang  
EFEITOS DO FITOQUÍMICO CAFEÍNA NA LINHAGEM CELULAR  
TPC-1 DE CARCINOMA DE TIREOIDE / Marielle Lang Makiyama.  
-- 2023.  
71 f.:il.

:

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da  
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biomédicas, Chapecó, SC, 2023.

1. Câncer de tireoide. 2. Sistema purinérgico. 3.  
Stress oxidativo. I. Universidade Federal da Fronteira  
Sul. II. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).