



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA (PPGRACI)

Emily Barbosa do Nascimento

**ANÁLISE MOLECULAR DAS INFECÇÕES POR VÍRUS EPSTEIN-BARR E
PARVOVÍRUS B19 EM PACIENTES COM NEOPLASIAS DE TIREOIDE NO
ESTADO DO AMAZONAS**

Manaus

2024

Emily Barbosa do Nascimento

**ANÁLISE MOLECULAR DAS INFECÇÕES POR VÍRUS EPSTEIN-BARR E
PARVOVÍRUS B19 EM PACIENTES COM NEOPLASIAS DE TIREOIDE NO
ESTADO DO AMAZONAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador(a): Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Lia Mizobe Ono

Manaus

2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

N244a	Nascimento , Emily Barbosa do Análise molecular das infecções por vírus Epstein-Barr e Parvovírus B19 em pacientes com neoplasias de tireoide no estado do Amazonas / Emily Barbosa do Nascimento . 2024 64 f.: il. color; 31 cm. Orientador: Luiz Carlos de Lima Coorientadora: Lia Mizobe Ono Dissertação (Mestrado Profissional em Cirurgia) - Universidade Federal do Amazonas. 1. Neoplasias. 2. Carcinoma. 3. Glândula Tireoide. 4. Vírus. I. Lima, Luiz Carlos de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título
-------	---

Emily Barbosa do Nascimento

**ANÁLISE MOLECULAR DAS INFECÇÕES POR VÍRUS EPSTEIN-BARR E
PARVOVÍRUS B19 EM PACIENTES COM NEOPLASIAS DE TIREOIDE NO
ESTADO DO AMAZONAS**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em (17 de Abril de 2024),
pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Silvania da Conceição Furtado
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Robson Luis Oliveira de Amorim
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Universidade Federal do Amazonas

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Manaus, 2024.

Dedico este trabalho aos meus pais, que
não pouparam esforços para que eu
pudesse realizar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por todo o zelo e dedicação que sempre despenderam comigo desde o meu nascimento, eles foram os responsáveis por me ensinar que a educação, o estudo e o esforço geram bons frutos para toda a sociedade. Ao meu esposo e meus amigos, por estarem ao meu lado nos piores e melhores momentos, incentivando-me a cada tropeço e comemorando todas as minhas vitórias. A todos os meus professores ao longo da vida, pela confiança, ensinamentos e encorajamento ao meu potencial acadêmico. Aos pacientes, pelo carinho ao longo da minha trajetória profissional e aprendizado constante sobre o ser humano. A todos, por fazerem parte da minha caminhada incessante de aprimoramento pessoal.

Olhem de novo para o ponto. É ali. É a nossa casa. Somos nós. Nesse ponto, todos aqueles que amamos, que conhecemos, de quem já ouvimos falar, todos os seres humanos que já existiram, vivem ou viveram as suas vidas. Toda a nossa mistura de alegria e sofrimento, todas as inúmeras religiões, ideologias e doutrinas econômicas, todos os caçadores e saqueadores, heróis e covardes, criadores e destruidores de civilizações, reis e camponeses, jovens casais apaixonados, pais e mães, todas as crianças, todos os inventores e exploradores, professores de moral, políticos corruptos, “superastros”, “líderes supremos”, todos os santos e pecadores da história da nossa espécie, ali – num grão de poeira suspenso num raio de sol (SAGAN, 1994, não paginado).

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer da tireoide é a neoplasia endócrina mais prevalente no mundo, o que reforça a necessidade de estudar os múltiplos fatores etiopatogênicos relacionados ao desenvolvimento dessas neoplasias, como os vírus oncogênicos. Entre diferentes agentes infecciosos possíveis, a infecção viral pelo vírus Epstein Barr (EBV) e Parvovírus B19 (B19) figuram como possíveis fatores de risco para os carcinomas bem diferenciados da tireoide. **OBJETIVO:** Avaliar a presença de infecção viral pelo EBV e B19 em fragmentos de tecido tireoidiano obtidos cirurgicamente na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON). **MÉTODO:** Estudo observacional, transversal e descritivo de análise de peças cirúrgicas dos pacientes com o diagnóstico de neoplasia de tireoide em busca da presença de vírus EBV e B19 pela técnica de PCR em tempo real. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da FCECON com o CAAE 44800421.9.0000.0004 e número do parecer 4.696.238. **RESULTADOS:** Foram incluídos no estudo 163 participantes. 145 mulheres (88.96%) com média de idade de 46.15 anos e 18 homens (11.04%) com média de idade de 46.39 anos. Negam histórico de tabagismo 82.21% pacientes e 73.01% dos mesmos negam histórico de etilismo. Nenhum paciente teve exposição à radiação prévia na região de cabeça e pescoço. Dos 163 participantes, 128 se consideram pardos, 18 brancos, 14 negros e 3 indígenas. Na história patológica pregressa (HPP), a maioria dos indivíduos incluídos na pesquisa eram hígidos (114) e 42 indicaram ser portadores de hipertensão arterial sistêmica. Quanto ao tipo histológico, dos 163 espécimes incluídos na pesquisa, 133 são do tipo carcinoma papilífero, 12 do tipo carcinoma folicular, 3 são do tipo carcinoma anaplásico, 1 do tipo carcinoma medular e 14 do tipo adenoma folicular. De todas as amostras, 24 tiveram DNA confirmados para EBV e 44 para B19. Ao ser realizado o Teste qui-quadrado de Person para correlacionar presença viral e tipo histológico não foi detectada associação significativa entre o tipo histológico (EBV P-valor = 0.6134 e B19 P-valor = 0.691). **CONCLUSÃO:** A literatura atual e o presente estudo conclui que o câncer de tireoide é mais comum em mulheres por volta dos 46 anos de idade, sendo o carcinoma papilífero de tireoide o tipo histológico mais comum e indolente. Não há associação positiva com o tipo histológico e presença de DNA viral para o EBV e B19 em tumores tireoidianos no Estado do Amazonas – Brasil.

Palavras-chave: Neoplasias, Carcinoma, Glândula Tireoide, Vírus.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Thyroid cancer is the most prevalent endocrine neoplasm in the world, which reinforces the need to study the multiple etiopathogenic factors related to the development of these neoplasms, such as oncogenic viruses. Among different possible infectious agents, viral infection by the Epstein Barr virus (EBV) and Parvovirus B19 (B19) appear as possible risk factors for well-differentiated thyroid carcinomas. **OBJECTIVE:** Evaluate the presence of EBV and B19 viral infection in thyroid tissue fragments surgically obtained at the Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON). **METHOD:** Observational, cross-sectional and descriptive study of analysis of surgical specimens from patients diagnosed with thyroid cancer in search of the presence of EBV and B19 viruses by the real-time PCR technique. The study was approved by the FCECON research ethics committee with CAAE 44800421.9.0000.0004 and opinion number 4.696.238. **RESULTS:** 163 participants were included in the study. 145 women (88.96%) with mean age of 45.15 years and 18 men (11.04%) with mean age of 46.39 years. 82.21% do not have a history of smoking and 73.01% deny a history of alcoholism. No patient had previous radiation exposure in the head and neck region. Of 163 participants, 128 consider themselves brown, 18 white, 14 black and 3 native american. In the past pathological history (PPH), most of the individuals included in the research were healthy (144) and 42 indicated having systemic arterial hypertension. As for the histological type, of the 163 specimens included in the research, 133 are papillary carcinoma, 12 are follicular carcinoma, 3 are anaplastic carcinoma, 1 is medullary carcinoma and 14 are follicular adenoma. Of all the samples, 24 had DNA confirmed for EBV and 44 for B19. When performing the Person chi-square test to correlate viral presence and histological type, no significant association was detected (EBV P-value = 0.6134 and B19 P-value = 0.691). **CONCLUSION:** The current literature and the present study conclude that thyroid cancer is more common in women around 46 years of age, with papillary thyroid carcinoma being the most common and indolent histological type. There is no positive association with histological type and presence of viral DNA for EBV and B19 in surgical specimens from patients diagnosed with thyroid cancer in the state of Amazonas – Brazil.

Keywords: Neoplasms, Carcinoma, Thyroid Gland, Virus.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Protocolo de detecção de vírus Epstein-Barr (MARKOULATOS <i>et al.</i> , 2001).....	28
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos dos pacientes tireoidectomizados na FCECON no período de maio de 2021 a maio de 2023 quanto ao sexo e idade.....	31
Tabela 2 – Classificação dos pacientes tireoidectomizados na FCECON no período de maio de 2021 a maio de 2023 quanto ao tabagismo, etilismo, etnia, e presença do DNA do vírus Epstein-Barr (EBV) e Parvovírus B19 (B19) no espécime tireoidiano neoplásico.....	31
Tabela 3 – Classificação dos pacientes tireoidectomizados na FCECON no período de maio de 2021 a maio de 2023 quanto à História Patológica Pregressa (HPP), estadiamento TNM e quanto ao tipo histológico.....	32
Tabela 4 – Teste qui-quadrado de Person para avaliar a associação entre a presença do Epstein-Barr Vírus com o tipo histológico da neoplasia tireoidiana.....	34
Tabela 5 – Teste qui-quadrado de Person para avaliar a associação entre a presença do Parvovírus B19 com o tipo histológico da neoplasia tireoidiana.....	35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Figura descrevendo a positividade e negatividade do DNA do vírus Epstein-Barr (EBV) com tipos histológicos dos espécimes tireoidianos.....33
- Figura 2** – Figura descrevendo a positividade e negatividade do DNA do Parvovírus B19 (B19) com tipos histológicos dos espécimes tireoidianos.....34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AITD	Distúrbios auto-imune da tireoide
B19	Parvovírus B19
COOA	Centro Observatório de Doenças Otorrinolaringológicas do Amazonas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EBV	Epstein-Barr virus
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EM3/EPS	<i>Primers</i> para amplificação do DNA pela técnica de reação de cadeia da polymerase - EM3 (ACTTACCAAGTGTCCATAGGAGC) e EP5 (AACATTGGCAGCAGGTAAGC)
FAPEAM	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas
FCECON	Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas
FHAJ	Fundação Hospital Adriano Jorge
H ₂ O	Água
HCV	Vírus da hepatite C
HHV-4	Herpes vírus humano 4
HPP	História Patológica Pgressa
LMP-1	Proteína latente de membrana 1
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
PCR	Reação da Cadeia de Polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RONs	Espécies reativas de oxigênio e hidrogênio
rtPCR	Reação da Cadeia de Polimerase em Tempo Real
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCS	Tecido celular subcutâneo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	JUSTIFICATIVA.....	20
3	OBJETIVOS.....	21
	3.1 Geral.....	21
	3.2 Específicos.....	21
4	HIPÓTESES.....	22
5	MÉTODO.....	23
	5.1 Tipo de estudo.....	23
	5.2 Aspectos éticos.....	23
	5.3 Características da amostra.....	23
	5.4 Critérios de inclusão e exclusão.....	24
	5.5 Tamanho da amostra.....	24
	5.6 Instrumentos de coletas de dados.....	25
	5.7 Procedimentos.....	25
	5.8 Realização de infoográfico sobre neoplasia tireoidiana.....	29
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
7	RESULTADOS	31
8	DISCUSSÃO.....	36
9	CONCLUSÃO.....	39
10	CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	40
11	MATERIAIS.....	41
12	FONTE DE RECURSOS.....	42
	REFERÊNCIAS.....	43
	APÊNDICE A – TCLE.....	48
	APÊNDICE B – FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS	52
	APÊNDICE C – TERMO DE COMPOSIÇÃO BIORREPOSITÓRIO.....	53
	APÊNDICE D – INFOGRÁFICO SOBRE NEOPLASIAS TIREOIDIANAS.....	55
	APÊNDICE E – STROBE CHECKLIST (STROME-ID).....	56
	ANEXO 1 – ANUÊNCIA DO ORIENTADOR	58
	ANEXO 2 – PARECER SUBSTANCIADO DO CEP.....	59

1 INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide é o câncer endócrino mais comum no Brasil e no mundo. As razões para o rápido aumento observado ainda não são totalmente compreendidas, mas as evidências sugerem que o superdiagnóstico, com o avanço nos métodos de detecção e nas políticas de triagem, não é o único condutor do aumento substancial da incidência. No entanto, o efeito de fatores ambientais/estilo de vida permanece especulativo, exceto o da exposição à radiação em uma idade jovem (Liu, 2017; Figueiredo, 2016).

As evidências que apoiam o papel da infecção viral como etiologia para a invasão do câncer de tireoide estão aumentando (Moghoofei, 2019). Cerca de 20 milhões de pessoas tiveram câncer de tireoide em 2022 (19.976.499 pessoas), o que indica a importância de identificar novos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento de tumores da tireoide (WHO/Globocan, 2022). O início e o desenvolvimento de tumores da tireoide geralmente ocorrem entre 32 e 65 anos e a incidência é maior em mulheres do que em homens (Chesnokova, 2009). Os principais tipos histológicos de tumor de tireoide são os carcinomas papilíferos, foliculares, medulares e anaplásicos (Xing, 2013).

A infecção crônica e a inflamação relacionadas aos vírus são responsáveis por 20-25% de todos os cânceres humanos (De Marzo, 2007; Kakavandi, 2018). A presença do vírus, suas proteínas e inflamação associada a vírus estão envolvidos no desenvolvimento do tumor. A inflamação crônica relacionada aos vírus ocorre através da secreção de diferentes mediadores do sistema imunológico, incluindo citocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS). A imunidade antitumoral é suprimida pela situação crônica atual e pode ser levada ao início e desenvolvimento de tumores e metástases (Xing, 2013; Wiseman, 1996).

Outro papel dos vírus no desenvolvimento do tumor é a prevenção de anoikis, que pode levar a um efeito fisiológico na homeostase tecidual. Anoikis é um processo que está relacionado à morte celular, tal processo desempenha sua função afetando a conexão entre a célula e a matriz extracelular. No anoikis, o desenvolvimento tumoral é reforçado com a possibilidade de erro no reparo, o que permite que células anormais mantenham as condições de sobrevivência fora do tecido de origem, fato que predispõe a metástases e aumentam disseminação tumoral (Chesnokova, 2009).

O Epstein-Barr Vírus (EBV) é classificado como Herpes vírus humano 4 (HHV-4) e pertence à família *Herpesviridae* e subfamília *Gammavirinae*. É um vírus icosaedro envelopado, possui DNA como seu material genético e tem grande afinidade por células epiteliais da nasofaringe e orofaringe, assim como linfócitos B (De Marzo, 2007). Sua afinidade por células epiteliais da nasofaringe e orofaringe fazem com que sua principal via de transmissão seja a saliva, sendo o contágio entre seres humanos realizado pelo contato com secreções orais (Chesnokova, 2009; Yao, 1985).

O EBV é um vírus tumoral bem conhecido, causa de 1% de câncer em todo mundo (Houldcroft, 2015), extremamente comum na população – acomete 95% da população adulta mundial (Almeida, 2017; De Castro Alves, 2018). A infecção aguda pelo EBV caracteriza-se por ser assintomática em sua grande maioria e possui forte relação de susceptibilidade com fatores socioeconômicos e sociodemográficos, como renda familiar, escolaridade e faixa etária (Balfour, 2015).

No caso de vírus como o EBV, que codifica vários genes, alguns deles estão envolvidos em anóikis, como a proteína de membrana latente 1, 2 (LMP-1, 2A) e pequenos ácidos ribonucleicos (RNAs) codificados por EBV. Dessa forma, o EBV está associado a diversos tipos neoplásicos, em especial as neoplasias epiteliais e hematogênicas, também sendo investigada a associação do EBV com a tumorigênese da tireoide (Yu, 2019; Tsang, 2015).

Na década de 1970, O DNA do EBV foi detectado em tecidos de pacientes com carcinoma nasofaríngeo (Wolf, 1973). Em 1997, o EBV foi classificado pela *International Agency for Research on Cancer*, como um carcinógeno de grau I. Carcinógenos de grau I são todos os agentes que, comprovadamente, causam neoplasias em humanos (Ribeiro-Silva, 2003). A infecção pelo EBV tem sido associada principalmente a linfomas e carcinomas nasofaríngeos (Young, 1988) e embora o vírus tenha tropismo para linfócitos B, ele também pode infectar células epiteliais (Almeida, 2017).

O EBV foi identificado como um dos fatores de risco mais importantes em muitos tipos de câncer linfóide e epitelioide, como o carcinoma papilífero da tireoide (Lloyd, 2011; Jha, 2016; Stamatiou, 2016).

Existe forte associação entre a infecção latente pelo EBV e o desenvolvimento de tumores malignos em humanos. Várias das proteínas expressas pelo EBV atuam diretamente como oncogene, estimulando a proliferação das células infectadas. Além

disso, o DNA viral, ao integrar-se ao genoma do hospedeiro, pode causar mutações em genes reguladores do ciclo celular, sobretudo no gene supressor tumoral p53, favorecendo o aparecimento de células neoplásicas (Ribeiro-Silva, 2003).

O Parvovírus B19 (B19) é um vírus gênero *Erythrovirus* (família *Parvoviridae*), que infecta células precursoras de eritrócitos da medula óssea e do sangue, possuindo fita simples de DNA não envelopado. Sabe-se que o B19 é detectado também com persistência, porém baixa expressão, em tecidos tireoidianos após infecções em hospedeiros humanos, sendo encontrado sua presença nos tireócitos e nos linfócitos intratireoidianos (Fallahi, 2016). A replicação do B19 em tecidos não permissivos leva a superexpressão de proteínas não estruturais, resultando em regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF-alfa, fato que gera um ambiente susceptível à oncogênese local que pode ser associada à presença viral (Oh, 2014; Etemadi, 2017).

Desde a descoberta do primeiro vírus tumoral candidato humano por Anthony Epstein e colegas em 1964 (Epstein, 1964), um conjunto diversificado de vírus DNA e RNA foi encontrado associado a cânceres humanos. Eles causam um conjunto variado de neoplasias humanas, originárias de diferentes fontes celulares, por transformação direta ou por influenciar o microambiente para permitir a tumorigênese. Assim, estima-se agora que a transformação celular associada ao vírus represente de 10 a 15% de todos os cânceres humanos (Moormann, 2016).

Em 2008, aproximadamente 2 milhões de novos casos de câncer (16%) em todo o mundo foram atribuídos à infecção. Se essas infecções pudessem ser evitadas e/ou tratadas, estima-se que haveria cerca de 23% menos cânceres em regiões menos desenvolvidas do mundo e cerca de 7% menos cânceres em regiões mais desenvolvidas (Oh, 2014).

Tendo em vista que, o Parvovírus Humano B19 (B19) persiste em muitos tecidos, como o tecido da tireoide (Moghoofoei, 2019; Etemadi, 2017), e que os vírus candidatos mais importantes para distúrbios auto-imune da tireoide (AITD) são o vírus da hepatite C (HCV), o EBV e o B19 (Fallahi, 2016), teorizou-se no presente projeto identificar a prevalência da presença dos vírus oncogênicos tireoidianos mais relatados na literatura, EBV e B19, em peças anatômicas de neoplasias de tireoide, uma vez que esse estudo é inédito no Amazonas, e servirá de base para epidemiologia local, bem como orientar futuras pesquisas de associação viral com estes carcinomas.

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, escassos são os dados sobre a infecção pelo EBV e B19 no papel da tumorigênese de carcinomas tireoidianos, principalmente na região Norte (Almeida, 2017; De Castro Alves, 2018).

A partir dessas informações emerge a ideia de realização do presente estudo. Além de adicionar novos dados científicos à literatura sobre o tema, documentando a prevalência de EBV e B19 em neoplasias de tireoide, o trabalho funciona como estímulo a investigação da relação entre infecção viral e neoplasias de tireoide, em especial em áreas onde as doenças tireoidianas são endêmicas, que é o caso do Estado do Amazonas (Botelho, 2020), além de fomentar a comunidade científica em busca de novas hipóteses para a gênese e, em um futuro distante, opções de tratamento desses tumores.

Observa-se também que, com os dados, melhor será o esclarecimento fornecido pelos profissionais de saúde ao paciente portador de neoplasia de tireoide.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a presença do EBV e B19 em peças anatômicas de neoplasias de tireoide obtidas através de cirurgias de cabeça e pescoço realizadas na Fundação Centro de Controle em Oncologia do Amazonas (FCECON).

3.2 Específicos

3.2.1 Descrever a prevalência de infecção pelo EBV e B19 em amostras de tecidos tireoidianos pós-tireoidectomia;

3.2.2 Caracterizar o perfil epidemiológico dos pacientes incluídos no estudo;

3.2.3 Associar os achados moleculares com o diagnóstico histopatológico da neoplasia;

3.4.4 Realizar um infográfico sobre neoplasias de tireoide com foco nos profissionais de saúde em contato com o tema, atualizando-os a epidemiologia local e os resultados obtidos no presente estudo.

4 HIPÓTESES

A presença de EBV e B19 na glândula tireoide pode estar associada à formação de neoplasias tireoidianas.

H0 – As neoplasias de tireoide cirurgicamente tratadas no Amazonas possuem presença de EBV e/ou B19.

H1 - As neoplasias de tireoide cirurgicamente tratadas no Amazonas não possuem presença de EBV e/ou B19.

5 MÉTODO

5.1 Tipo de estudo

Estudo transversal e observacional de análise de fragmentos da glândula tireoide obtidos no pós-operatório de pacientes com o diagnóstico neoplasia tireoidiana, a fim avaliar a presença da infecção de EBV e B19 em tumores tireoidianos de pacientes acompanhados no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FCECON.

5.2 Aspectos éticos

O estudo faz parte de um projeto maior intitulado “Estudo da prevalência de vírus oncogênicos em neoplasias de glândula tireoide no Estado do Amazonas” que foi submetido e aprovado dia 06 de Maio de 2021 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCECON sob o número CAAE 44800421.9.0000.0004 e número do parecer 4.696.238 (ANEXO 2).

Antes da inserção no estudo, os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE), sendo informados a respeito dos objetivos do estudo, os riscos e benefícios, e os procedimentos a serem realizados numa linguagem simples e compreensível, conforme APÊNDICE A.

A recomendação *Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology* (STROBE), na sua variação *Strengthening the reporting of molecular epidemiology for infectious diseases* (STROME-ID) específica para estudos envolvendo biologia molecular em doenças infecciosas, foi utilizada para conduzir esta pesquisa com o objetivo de aumentar a qualidade e a transparência da pesquisa em saúde e reduzir riscos de falhas éticas e vices (Field, 2014).

5.3 Características da amostra

O estudo recrutou pacientes com diagnóstico de neoplasias de tireoide tratados cirurgicamente pelo Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FCECON no período definido pela pesquisa (maio de 2021 a maio de 2023 – três anos).

5.4 Critérios de Inclusão e Exclusão

5.4.1 Inclusão

5.4.1.1 Foram incluídos no estudo, fragmentos tireoidianos provenientes de pacientes operados para esta doença, desde que maiores de 18 anos, de ambos os sexos.

5.4.2 Exclusão

5.4.2.1 Fragmentos cuja histopatologia do espécime tireoidianos não seja compatível com as neoplasias primárias da glândula - Adenoma Folicular, Carcinoma Papilífero, Carcinoma Folicular, Carcinoma Medular ou Carcinoma Anaplásico.

5.5 Tamanho da amostra

A amostra foi constituída por, no mínimo, 161 fragmentos de espécimes tireoidianos e suas replicatas, de maneira que se garanta um erro amostral não superior a 5% e confiabilidade de 95%. Para tanto, utilizou-se o cálculo do tamanho de uma amostra aleatória simples para populações finitas, considerando o tamanho da população (N) de 270, visto que este é o total de pacientes com neoplasias de tireoide que em média são atendidos no período de três anos de acordo com informações obtidas na FCECON e artigos publicados realizados no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FCECON (Figueiredo, 2016).

- Primeira aproximação do tamanho da amostra (n_0), onde E_0 (erro amostral tolerável) = 5% = 0,05.

$$n_0 = 1/E_0^2$$

$$n_0 = 1/0,0025$$

$$n_0 = 400$$

- Tamanho da amostra (n), onde N (tamanho da população com carcinoma de células escamosas atendidas no período de 3 anos) = 270.

$$N = \frac{N \times n_0}{N + n_0}$$

$$N + n_0$$

$$N = \frac{270 \times 400}{270 + 400}$$

$$N = 161$$

N = 161 pacientes aproximadamente para 3 anos.

5.6 Instrumentos de coleta de dados

O instrumento de coleta de dados do presente estudo está inserido no APÊNDICE B.

5.7 Procedimentos

5.7.1 Acesso e Processamento das peças cirúrgicas

5.7.1.1 Procedimentos de abordagem ao paciente com neoplasia tireoidiana e coleta de dados clínicos e epidemiológicos

No transcorrer do projeto maior, os pacientes que atendiam aos critérios de inclusão, foram abordados no ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FCECON durante a consulta de rotina, onde foram orientados sobre o estudo e seus objetivos, bem como, convidados a participar do mesmo. Tiveram tempo para ler o TCLE e tirar as dúvidas e ao concordarem com os termos do estudo, rubricaram, dataram e assinaram o TCLE (APÊNDICE A) em duas vias, ficando com uma e a outra com a equipe de pesquisa.

No mesmo dia da assinatura do TCLE os dados contidos no formulário de coleta de dados (APÊNDICE B), foram coletados dos participantes da pesquisa.

5.7.1.2 Acesso aos espécimes tireoidianos para composição do Biorrepositório da pesquisa e Análise da presença de vírus oncogênicos nos fragmentos de tecido tireoidiano (EBV e B19)

Os fragmentos da glândula de tireoide foram obtidos a partir do espécime cirúrgico fresco de tireoidectomias totais ou parciais realizadas pelo Serviço de Cabeça e Pescoço da FCECON devido a presença de possível neoplasia da glândula.

As peças cirúrgicas seguiram, conforme protocolo da FCECON, para o Laboratório de Anatomia Patológica para realização de estudo histopatológico, e,

mediante orientações do Patologista membro da equipe, foram fornecidos fragmentos para a composição do Biorrepositório deste estudo, sem prejuízo para a análise histopatológica.

As amostras compatíveis com Adenoma Folicular, Carcinoma Papilífero, Carcinoma Folicular, Carcinoma Medular ou Carcinoma Anaplásico - neoplasias primárias da glândula tireoide - foram selecionadas e testadas para presença de EBV e B19 por meio de rtPCR e sondas desenhadas especificamente para estes vírus.

5.7.2 Procedimentos de manejo das amostras para a composição do Biorrepositório

Das amostras frescas, avaliadas por médico patologista da equipe do estudo, foram obtidos fragmentos de regiões neoplásicas, que compuseram o biorrepositório. Três fragmentos da lesão tumoral de 3-5 mm do tecido tumoral foram selecionados (50-150 mg). O material coletado foi armazenado imediatamente em microtubos de 2,0 mL livres de DNase e RNase e congelados a -30 °C e armazenado no laboratório de biologia molecular da FCECON até o momento da extração do DNA, conforme Termo de Composição Biorrepositório (APÊNDICE C).

No momento das análises, as amostras foram descongeladas e realizado o processo de extração de DNA utilizando kits comerciais para espécimes frescos.

As técnicas moleculares de pesquisa do DNA do vírus EBV e Parvovírus B19, foram realizadas no laboratório de biologia molecular da Fundação Centro de Controle em Oncologia do Amazonas.

5.7.3 Protocolo de extração dos ácidos nucleicos

Extração para triagem viral - O DNA amostral foi extraído a partir de 25 mg de tecido fresco, utilizando o DNeasy® Blood&Tissue Kit (QIAGEN Inc., USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O volume final obtido foi de aproximadamente 200 µL.

A quantificação de DNA na amostra extraída foi realizada por espectrofotometria através do equipamento NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (ThermoScientific™ São Paulo, Brasil). De acordo com as recomendações técnicas.

5.7.4 Protocolo de controle endógeno da reação em cadeia da polimerase

A detecção do gene da β -globina foi amplificada por reação em cadeia da polimerase para avaliar a integridade do DNA extraído, a fim de evitar os resultados falsos negativos. Os iniciadores de β -globina humana utilizados foram GH20: (5'GAAGAGCCAAGGACAGGTAC'3) e PCO4: (5'CAACTTCATCCACGTTACC'3) (Life Technologies, São Paulo, Brasil) (Saiki, 1985).

5.7.4.1 Protocolo de detecção do Parvovírus B19

Para detectar o B19, o DNA foi testado por uma PCR *Semi-Nested*, utilizando-se o protocolo conforme descrito por Mendonça e colaboradores. Resumidamente, cada DNA foi sujeito à amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) com os iniciadores PVP1/PVP2. PVP1(ACAAGCCTGGGCAAGTTAGC) e PVP3 (TGGGCCTGGCAATGAGCTAC) forward iniciadores e PVP2 (CTGCACCAGTGCTGGCTTCT) reverse iniciador. Uma segunda rodada de amplificação foi realizada com 2 μ l (diluído 1: 500) da primeira mistura de reação, incluindo os iniciadores (PVP2-PVP3) (De Mendonça, 2008).

5.7.4.2 Protocolo de detecção de vírus de *Epstein – Barr*

Para a detecção do vírus de EBV nas amostras de tireoide foi utilizado o protocolo, com uma reação de PCR gênero-específico produzindo *amplicons* de 182 pb, de acordo com Markoulatos e colaboradores (Markoulatos, 2001).

Quadro 1 – Protocolo de detecção de vírus Epstein-Barr (MARKOULATOS et al., 2001).

PCR EBV			
Componentes	Vol.(μ l) 1 Reação	Concentração Final	
H ₂ O	15,3		
PCR buffer 10x (sem MgCl ₂)	2,5	1	X
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	1,5	mM
dNTP (10 mM)	1,0	0,4	mM
EM3/EP5 (10 μ M)	0,75	0,3	μ M
Bct S/S (10 μ M)	0,75	0,3	μ M
Taq Platinum 5 U/ μ l	0,2		
DNA	3		
Total	25		

O protocolo da reação de PCR no termociclador teve início a partir de desnaturação inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido por 10 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 segundos, hibridização a 63 °C durante 60 segundos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 segundos, hibridização a 60 °C durante 30 segundos, extensão a 72 °C durante 30 segundos e extensão final a 72 °C durante 10 minutos, a cada corrida foram incluídos os seguintes componentes de controles: amostra conhecida positivamente (controle positivo) e água RNase e DNase-free como branco da reação.

5.7.4.3 Realização de PCR em tempo real

Após a verificação da integridade do DNA, todas as amostras foram testadas e retestadas através de PCR em tempo real, para confirmação dos dados obtidos,

utilizando o Kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (2013) e seu protocolo laboratorial.

5.8 Realização de infográfico sobre neoplasia tireoidiana

Após a obtenção de dados locais sobre a prevalência da infecção viral em neoplasias tireoidianas, foi realizado um infográfico para os profissionais de saúde que trabalham com neoplasias tireoidianas no estado, principalmente a equipe de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FCECON, visando atualização acerca do tema e detalhar os dados epidemiológicos atuais e regionais obtidos na pesquisa. Devido à alta prevalência na região e a sobrecarga dos profissionais que lidam com neoplasias de tireoide, o infográfico será de suma importância para que o profissional tenha de fácil acesso as principais informações locais sobre a doença, elucidando os pacientes sobre a prevalência e principais fatores de risco locais com dados inéditos obtidos pelo presente estudo. O infográfico será distribuído gratuitamente aos profissionais de saúde que assistem tais pacientes no Estado do Amazonas, de maneira digital e com acesso por QR code.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da pesquisa foram organizados em um banco de dados utilizando o programa Epi-Info versão 7.2.1/2017 (CDC, Atlanta, Geórgia, EUA), e, também foi utilizado para a análise por estatística descritiva dos dados.

As variáveis qualitativas foram representadas por frequência absoluta (n) e relativa (%). Para comparações entre variáveis categóricas os pesquisadores utilizaram o teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando recomendado.

Já as variáveis quantitativas, foram representadas por média e desvio padrão. Para comparações dos dois grupos foi aplicado o teste T-Student quando aceitar a hipótese de normalidade dos dados ou teste de Mann-Whitney quando a hipótese de normalidade dos dados for rejeitada.

Foi adotado o nível de significância de 0,05 ($\alpha=5\%$). Níveis descritivos inferiores a este valor foram considerados significantes.

7 RESULTADOS

Dos 163 participantes da pesquisa, 145 são mulheres (88.96%) com média de idade de 46.15 anos e 18 homens (11.04%) com média de idade de 46.39 anos (TABELA 1). A maioria (82.21%) não possuem histórico de tabagismo e 73.01% negam histórico de etilismo. Nenhum paciente referiu ter sido exposto à radiação prévia na região de cabeça e pescoço. Dos 163 participantes, 128 se consideram pardos, 18 brancos, 14 negros e 3 indígenas quando se observa a etnia (TABELA 2).

Tabela 1 – Classificação dos pacientes tireoidectomizados na FCECON no período de maio de 2021 a maio de 2023 quanto ao sexo e idade.

Variável	Sexo	N	%	Média	DesvPad	Mínimo	Mediana	Máximo
Idade	Feminino	145	88,96	46,15	13,36	18,00	45,00	79,00
	Masculino	18	11,04	46,39	15,48	20,00	40,00	68,00
TOTAL		163	100	46,18	13,56	18,00	44,00	79,00

Tabela 2 – Classificação dos pacientes tireoidectomizados na FCECON no período de maio de 2021 a maio de 2023 quanto ao tabagismo, etilismo, etnia, e presença do DNA do vírus Epstein-Barr (EBV) e Parvovírus B19 (B19) no espécime tireoidiano neoplásico.

Variável		N	%
Tabagismo	Sim	29	17,79
	Não	134	82,21
Etilismo	Sim	44	26,99
	Não	119	73,01
Etnia	Branca	18	11,04
	Negra	14	8,59
	Parda	128	78,53
	Indígena	3	1,84
EBV	Positivo	24	14,72
	Negativo	139	85,28
B19	Positivo	44	26,99
	Negativo	119	73,01

Quanto à procedência, 128 pacientes residiam em Manaus, a capital do Estado do Amazonas, 29 residiam no interior do Amazonas (Autazes, Anori, Borba, Benjamin Constant, Iranduba, Ipixuna, Jutai, Lábrea, Manacapuru, Manicoré, Nhamundá, Novo

Remanso, Parintins e Tefé) e cinco em outros estados brasileiros (quatro no Pará - um residia em Belém – PA e três no interior do Pará nos municípios de Juruti, Porto de Moz e Faro, além de um paciente proveniente da capital do Estado do Ceará). Apenas um paciente era proveniente de outro país, a Venezuela (município de San Félix).

Na história patológica pregressa (HPP), a maioria dos indivíduos incluídos na pesquisa eram hígidos (69.94%) e 42 indicaram ser portadores de hipertensão arterial sistêmica. Outras comorbidades e a classificação TNM de estadiamento oncológico podem ser avaliadas na TABELA 3.

Quanto ao tipo histológico, dos 163 espécimes incluídos na pesquisa, 133 são do tipo carcinoma papilífero, 12 do tipo carcinoma folicular, três são do tipo carcinoma anaplásico, um do tipo carcinoma medular e 14 são do tipo adenoma folicular (TABELA 3).

Tabela 3 – Classificação dos pacientes tireoidectomizados na FCECON no período de maio de 2021 a maio de 2023 quanto à História Patológica Progressiva (HPP), estadiamento TNM e quanto ao tipo histológico.

Variável	N	%
HPP		
Hipertensão Arterial Sistêmica	20	12,27
Hipertensão Arterial Sistêmica; Asma; Prolapso mitral	1	0,61
Hipertensão Arterial Sistêmica; Diabetes Melitus	22	13,50
Hígido, sem doença	114	69,94
Transplante renal	1	0,61
Artrite reumatoide	1	0,61
Doença de Alzheimer	1	0,61
Diabetes Melitus	2	1,23
Miastenia gravis; Síndrome Antifosfolípide	1	0,61
Estadiamento T		
1 (2cm limitado à tireoide)	76	50,66
2 (2-4cm limitado à tireoide)	37	24,67
3 (>4cm ou extensão mínima)	26	17,33
4A (extensão para TCS, laringe, traquéia, esôfago ou recorrente laríngeo) 4B (invade fáscia pré-vertebral ou envolve carótida/vasos mediastinais) 3	7	4,67
Estadiamento N		
0 (linfonodos negativos)	98	65,33
1A (metástase em linfonodos pré-traqueais, paratraqueais ou pré- laríngeos)	31	20,66
	21	14,00

	1B (metástase linfonodal unilateral, bilateral, contralateral ou mediastinal superior)		
Estadiamento M	0 (sem metástase à distância)	145	96,67
	1 (com metástase à distância)	5	3,33
Tipo histológico	Carcinoma Anaplásico	3	1,84
	Carcinoma Folicular	12	7,36
	Carcinoma Medular	1	0,61
	Carcinoma Papilífero	133	81,60
	Adenoma Folicular	14	8,59

*O estadiamento TNM é realizado apenas para os tumores primários de tireoide malignos que são: carcinoma papilífero, carcinoma folicular, carcinoma medular e carcinoma anaplásico. O adenoma folicular apesar de ser uma neoplasia primária da tireoide é um tumor benigno e por esse motivo não se enquadra nesta classificação.

Dos 163 espécimes tireoidianos com neoplasia, 24 tiveram DNA confirmados para EBV e 44 para B19. Nas figuras 1 e 2, podem ser observados a positividade do DNA viral de acordo com o tipo histológico.

Figura 1 – Figura descrevendo a positividade e negatividade do DNA do vírus Epstein-Barr (EBV) com tipos histológicos dos espécimes tireoidianos.

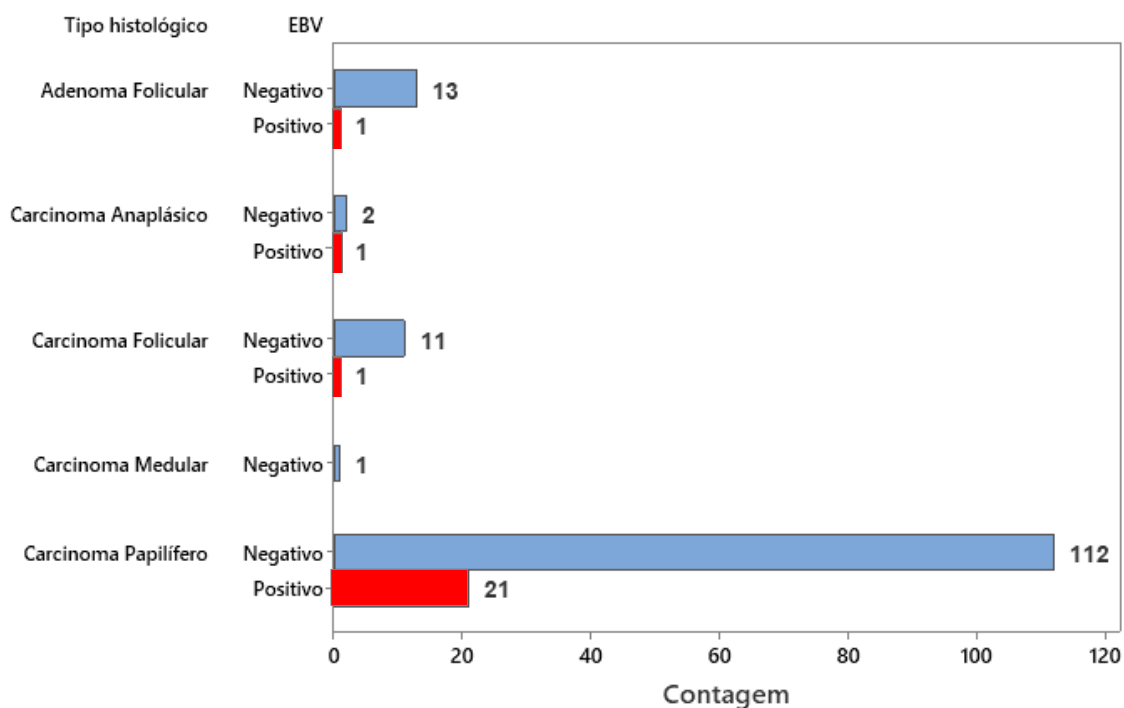
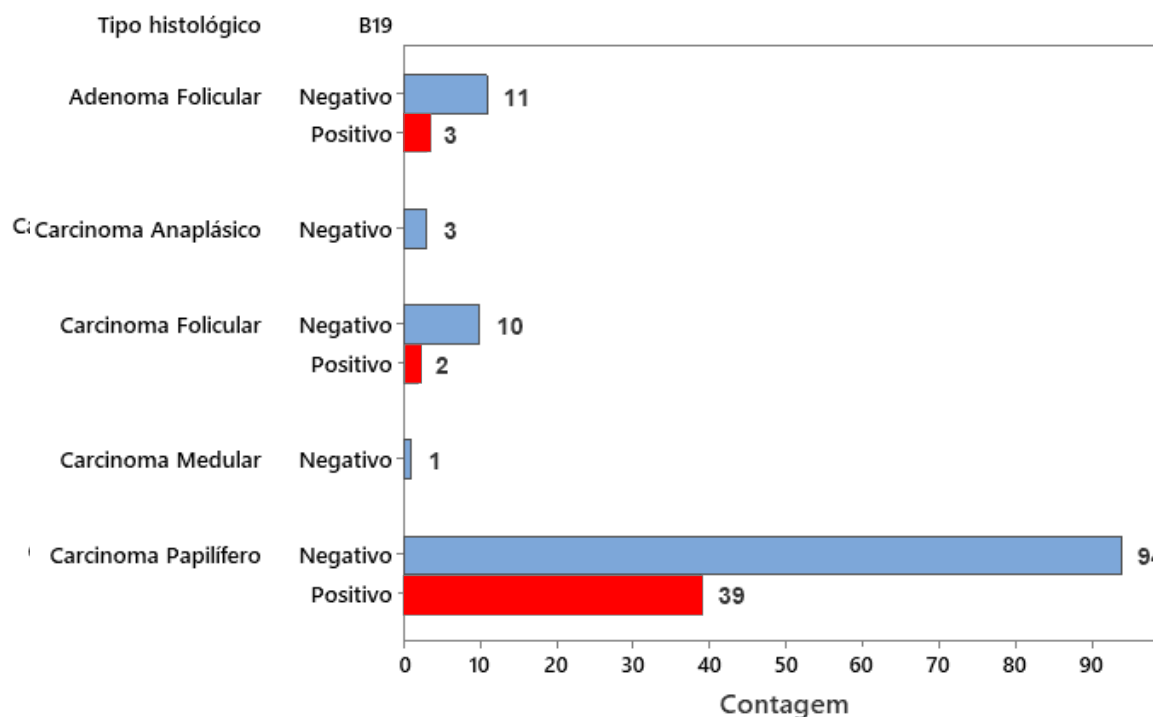


Figura 2 – Figura descrevendo a positividade e negatividade do DNA do Parvovírus B19 (B19) com tipos histológicos dos espécimes tireoidianos.



Ao ser realizado o Teste qui-quadrado de Person para presença viral e tipo histológico (TABELAS 4 e 5) não foi detectada associação significativa entre o tipo histológico com o EBV (P-valor = 0.6134) e também com o B19 (P-valor = 0.691).

TABELA 4 – Teste qui-quadrado de Person para avaliar a associação entre a presença do Epstein-Barr Vírus com o tipo histológico da neoplasia tireoidiana.

Tipo histológico	EBV		Todos
	Negativo	Positivo	
Adenoma Folicular	13	1	14
Carcinoma Anaplásico	2	1	3
Carcinoma Folicular	11	1	12
Carcinoma Medular	1	0	1
Carcinoma Papilífero	112	21	133
Todos	139	24	163

Após cálculos estatísticos, o Teste qui-quadrado de Person para associação de EVB e neoplasias tireoidianas indicou **p-valor= 0.6134**

TABELA 5 – Teste qui-quadrado de Person para avaliar a associação entre a presença do Parvovírus B19 com o tipo histológico da neoplasia tireoidiana.

Tipo histológico	B19		Todos
	Negativo	Positivo	
Adenoma Folicular	11	3	14
Carcinoma Anaplásico	3	0	3
Carcinoma Folicular	10	2	12
Carcinoma Medular	1	0	1
Carcinoma Papilífero	94	39	133
Todos	119	44	163

Após cálculos estatísticos, o Teste qui-quadrado de Person para associação de B19 e neoplasias tireoidianas indicou **p-valor= 0.691**

8 DISCUSSÃO

Quanto ao perfil socioeconômico, observa-se que o sexo feminino é o mais prevalente, com média de idade em torno dos 46 anos, fato concordante com a literatura nacional e regional (Nemetz, 2018; Botelho, 2020).

No presente estudo, a prática de tabagismo, etilismo e a história patológica pregressa, não tiveram associação com o número e tipos de neoplasias da tireoide, dados também consonantes a literatura nacional e internacional (Nemetz, 2018; Liu, 2017). A maioria dos pacientes na região amazônica, devido grande miscigenação, é considerada parda. Dessa forma, neste estudo 78.53% autodeclararam-se pardos, 11.04% brancos, 8.59% negros e 1.84% indígenas. Assim, a etnia não se mostrou um fator de risco para carcinomas tireoidianos.

Segundo Nemetz (2018) e Shah (2020), as neoplasias malignas tireoidianas diferenciadas são os carcinomas papilífero e folicular, com cerca de 95% dos cânceres primários de tireoide, possuem crescimento lento e melhor prognóstico. Já as neoplasias indiferenciadas são constituídas pelos carcinomas medular e anaplásico, tumores mais agressivos, raros e de prognóstico reservado, contando com cerca de 5% das neoplasias tireoidianas malignas. No presente estudo, observa-se 83,9% de tumores bem diferenciados e 2% de indiferenciados, concordando com os autores, fato que valida o estudo do ponto de vista estatístico na questão de representatividade dos tipos histológicos.

Quanto ao EBV, um vírus conhecidamente oncogênico (Moormann, 2016; Oh, 2014), observa-se que a população de Manaus e interior do Amazonas apresentam alta soroprevalência para infecção para EBV, como mostra a Dissertação de Mestrado de De Castro Alves (2018), em que 96.32% da população de Manaus e 90.97% da população de Presidente Figueiredo foram soropositivas para o referente vírus, sendo essa soroprevalência mais evidente no sexo feminino com 94.13% quando comparada com o sexo masculino com 89.14%.

Quando correlacionamos a soroprevalência alta do EBV no Amazonas (De Castro Alves, 2022) com a presença de DNA viral do EBV nas neoplasias malignas tireoidianas realizada no presente estudo, não houve relação da presença do EBV com as neoplasias tireoidianas diferenciadas e indiferenciadas.

Essa ausência de associação da presença do DNA viral com neoplasias tireoidianas concorda com o trabalho chinês de Yu e colaboradores (2019) em que

não houve correlação entre parâmetros histopatológicos e sorológicos positivos, além de que neste estudo nenhum dos pacientes com neoplasias tireoidianas ou controles demonstraram expressão de RNA do EBV na hibridização *in situ*.

Porém, um estudo iraniano similar ao realizado na presente pesquisa (Moghoofei, 2019), porém com amostras teciduais parafinadas, coloca o DNA viral do EBV presente em 71.9% das amostras neoplásicas tireoidianas e indica correlação positiva da presença do vírus no processo de anoikis, indicando que o EBV pode ter um papel importante na carcinogênese da glândula tireoide. Os resultados de Moghoofei e colaboradores (2019) mostram a expressão elevada de fatores inflamatórios, como interleucinas 1 e 6, fator de necrose tumoral α e interferon α/β , nos tecidos tireoidianos positivos pra EBV quando comparados com tecidos tireoidianos saudáveis. O estudo iraniano indica que o carcinoma papilífero foi o tipo histológico mais associado à infecção viral pelo EBV, porém este resultado pode ser devido ao carcinoma papilífero de tireoide ser o tipo histológico de maior prevalência na população mundial. Além disso, este estudo infere que quanto menor o grau de diferenciação e maior o estadiamento da neoplasia tireoidiana, maior expressão de RNA de proteínas do EBV.

Já no caso do B19, no presente estudo não há associação estatística da infecção viral com os carcinomas tireoidianos diferenciados e indiferenciados da tireoide, porém Wang e colaboradores (2008) indicam que o DNA do B19 estava presente nos tireócitos (e nos linfócitos intratireoidianos) em todas as doenças da tireoide, mas em geral no carcinoma papilífero de tireoide. Posteriormente, Adamson e colaboradores (2011) usando técnicas de imuno-histoquímica confirmaram que o B19 estava presente em 21/24 (88%) tumores do tipo carcinoma papilífero de tireoide, 3/3 cânceres anaplásicos de tireoide e 3/3 amostras de tecido tireoidiano saudável e que de acordo com o tipo de patologia tireoidiana, a localização da proteína do capsídeo B19 foi diferente, com um deslocamento nuclear para citoplasmático de tecidos não afetados para tumorais. Já Etemadi e colaboradores (2017), possui resultados que mostraram a presença de DNA B19 em 31 das 36 amostras de tecidos tireoidianos neoplásicos (86,11%) e que alterações do microambiente no tecido tireoidiano, como inflamação e radiação ionizante possivelmente implica na progressão tumoral, sugerindo que a infecção por B19 pode desempenhar um papel

importante na tumorigênese e no desenvolvimento do câncer de tireoide através do processo inflamatório.

Uma metanálise sobre infecções virais e risco de câncer de tireoide foi publicada em 2020, porém este trabalho sofreu muitas limitações indicadas pelo próprio artigo (Mostafaei, 2020). Primeiramente, a metanálise informa uma pequena quantidade de artigos referente à temática de oncovírus e neoplasias tireoidianas publicadas na literatura. Em segundo lugar, ela destaca a heterogeneidade dos artigos disponíveis no que se trata de tipos virais (EBV, B19, Poliovírus tipo 1, Herpes Vírus Simples tipo 1, Vírus da Hepatite C, Vírus Vacuolante Símio 40, Papiloma Vírus Humano, BK Poliomavirus), de diferentes técnicas de detecção viral (sorologia, PCR, hibridização *in situ*, imunohistoquímica, *Southern Blot*, Elisa, *Nested PCR*), do tipo de amostra analisada (tecido fresco, amostra parafinada, sangue), e até mesmo dos tipos de tumores tireoidianos incluídos nas pesquisas (diferenciados, indiferenciados, neoplasias benignas como adenoma folicular e bócio, além de linfoma tireoidiano). Dessa forma, como a metanálise de Mostafaei e colaboradores (2020) mesclou todos esses diferentes parâmetros para tentar chegar à um denominador comum, observa-se um alto risco de viés e baixo grau de recomendação nas análises realizadas do artigo em questão. Como o próprio autor explicita nas limitações do estudo, os vírus oncogênicos agem em vias biológicas diversas, seja como oncogene direto ou indireto, aumentando o ambiente pró-inflamatório local, sendo todas as nuances da via oncogenética específica, do tipo viral e de como a transformação do tecido sadio em tecido neoplásico ocorre, de fundamental importância quando se trata de pesquisa na área oncológica, uma vez que os antivirais e os quimioterápicos atuam em proteínas específicas das diferentes vias neoplásicas existentes.

O presente estudo discordou com parte dos artigos disponíveis na literatura atual acerca da infecção viral do EBV e do B19 nas neoplasias primárias tireoidianas. Os cuidados de higiene e manuseio foram realizados em todas as etapas do processo do estudo: coleta, armazenamento e manipulação laboratorial dos espécimes tireoidianos obtidos. Todas as amostras foram testadas e retestadas pela técnica de PCR em tempo real em um período de no máximo 3 meses do dia da coleta, para evitar falsos negativos, bem como a equipe responsável pela realização do trabalho laboratorial é qualificada e experiente. Todos os pacientes não utilizaram até o dia da coleta/cirurgia tratamentos antivirais ou antibióticos, o que poderia explicar a

porcentagem expressiva de negatividade dos vírus estudados nos espécimes tireoidianos.

Em suma, o presente estudo aponta que os tumores tireoidianos malignos tratados cirurgicamente na FCECON não possuem frequência elevada de infecção viral pelos dois vírus mais associados à esta patologia na literatura (EBV e B19), porém como se trata de um tema recente e com poucos estudos ao redor do mundo esse resultado é importante para o início da discussão acerca de oncovírus e carcinomas tireoidianos no Brasil. Observa-se que técnicas de imunohistoquímica, sorologia, expressão de proteínas virais e a pesquisa de outros vírus oncogênicos podem ser essenciais para verificar a associação viral com o câncer de tireoide no Estado do Amazonas – Brasil.

9 CONCLUSÃO

A literatura atual e o presente estudo conclui que o câncer de tireoide é mais comum em mulheres por volta dos 46 anos de idade, sendo o carcinoma papilífero de tireoide o tipo histológico mais comum e indolente. Este trabalho informa que não há associação positiva com o tipo histológico e presença de DNA viral para EBV e B19 nos tumores primários de tireoide removidos cirurgicamente em hospital de referência no Estado do Amazonas.

11 MATERIAIS

Especificação	Quantidade	Unidade	Custo Unitário	Custo Total
Tris (Base) 1kg	4	Unidade(s)	R\$360,00	R\$1.440,00
Microtubos de plástico 0,6 ml, pct com 1000	5	Unidade(s)	R\$100,00	R\$500,00
Ponteira de plástico 1000UI	5	Unidade(s)	R\$86,00	R\$430,00
Álcool etílico, 1L	10	Unidade(s)	R\$33,00	R\$330,00
Marcador de peso molecular (10-260kDa), 0,5 MI	2	Unidade(s)	R\$467,00	R\$934,00
kit RNA/DNA/Protein Purification plus (NorgenBiotekCorp)	1	Unidade(s)	R\$3.500,00	R\$3.500,00
Tubos para iniciadores	26	Caixas	R\$25,00	R\$650,00
Ponteira 10ul rack c/ filtro 96 und. –Caixa	20	Caixas	R\$45,00	R\$900,00
Microtubo PCR 200µL tampa, transp. pct c/ 1000und. Capp	5	Unidade(s)	R\$180,00	R\$900,00
Ponteiras de plástico	15pct	Unidade(s)	R\$45,00	R\$675,00
Microtubos de plástico 1,5 ml, pct com 1000	5	Unidade(s)	R\$89,00	R\$445,00
Designer gráfico do panfleto	1	Serviço	R\$ 300,00	R\$ 300,00
Impressão do panfleto em gráfica	1000	Unidade(s)	R\$ 500,00	R\$ 500,00
TOTAL				R\$R\$ 11.504,00

12 FONTE DE RECURSOS

A pesquisa foi aprovada para financiamento no Edital número 002/2021 da FAPEAM (Programa Amazônidas – “Mulheres e Meninas na Ciência”) sob o título ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE VÍRUS ONCOGÊNICOS EM NEOPLASIAS DE GLÂNDULA TIREOIDE NO ESTADO DO AMAZONAS. Projetos de iniciação científica na FCECON de temas semelhantes também colaboraram com recursos financeiros. Gastos eventuais advieram da receita dos pesquisadores e de fontes de projetos paralelos envolvendo a tireoide no Centro Observatório de doenças Otorrinolaringológicas do Amazonas – COOA, coordenado pelo Prof. Dr. Diego Monteiro de Carvalho.

REFERÊNCIAS

ADAMSON LA, *et al.* Parvovirus B19 infection in Hashimoto's thyroiditis, papillary thyroid carcinoma, and anaplastic thyroid carcinoma. *Thyroid*, v. 21, p. 411–7, 2011.

ALMEIDA, Jaqueline Fátima Martins *et al.* Investigation on the association between thyroid tumorigenesis and herpesviruses. *Journal of endocrinological investigation*, v. 40, n. 8, p. 823-829, 2017.

BALFOUR, Henry H. *et al.* Infectious mononucleosis. *Clinical & Translational Immunology*, v. 4, p. 1-7, 2015.

BOTELHO, João Bosco Lopes *et al.* Avaliação histórica dos diagnósticos histopatológicos tireoidianos no período de 2008 a 2018 em uma região endêmica para o Bócio. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 3, n. 6, p. 17051-17060, 2020.

CHESNOKOVA, Liudmila S.; NISHIMURA, Stephen L.; HUTT-FLETCHER, Lindsey M. Fusion of epithelial cells by Epstein–Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins $\alpha\beta 6$ or $\alpha\beta 8$. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 48, p. 20464-20469, 2009.

DE CASTRO ALVES, Carlos Eduardo *et al.* Epidemiologia da infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) em residentes de Manaus e Presidente Figueiredo. 84 folhas. Dissertação de Mestrado, Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, 2018.

DE CASTRO ALVES, Carlos Eduardo *et al.* Seroprevalence of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections in presidente figueiredo, amazonas, Brazil. *Journal of immunoassay and immunochemistry*, v. 43, n. 1, p. 67-77, 2022.

DE MARZO, Angelo M. *et al.* Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, v. 7, n. 4, p. 256-269, 2007.

DE MENDONÇA, Marcos César Lima *et al.* Heteroduplex mobility assay and single-stranded conformation polymorphism analysis as methodologies for detecting variants of human erythroviruses. *Journal of virological methods*, v. 148, n. 1-2, p. 40-47, 2008.

ETEMADI, Ashkan *et al.* Detection and a possible link between parvovirus B19 and thyroid cancer. *Tumor Biology*, v. 39, n. 6, p. 1010428317703634, 2017.

EPSTEIN, Michael Anthony; ACHONG, Bert G.; BARR, Yvonne M. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *The Lancet*, v. 283, n. 7335, p. 702-703, 1964.

FALLAHI, Poupak *et al.* The role of human parvovirus B19 and hepatitis C virus in the development of thyroid disorders. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, v. 17, n. 4, p. 529-535, 2016.

FIELD, Nigel *et al.* Strengthening the Reporting of Molecular Epidemiology for Infectious Diseases (STROME-ID): an extension of the STROBE statement. *The Lancet infectious diseases*, v. 14, n. 4, p. 341-352, 2014.

FIGUEIREDO, Raissa Barakatt *et al.* Perfil dos pacientes com nódulos de tireoide tratados em um hospital de referência em oncologia no Amazonas. *Rev Bras Cir Cabeça e Pescoço*, v. 45, n. 4, p. 115-20, 2016.

HOULDCROFT, Charlotte J.; KELLAM, Paul. Host genetics of Epstein–Barr virus infection, latency and disease. *Reviews in medical virology*, v. 25, n. 2, p. 71-84, 2015.

JHA, Hem C.; PEI, Yonggang; ROBERTSON, Erle S. Epstein–Barr virus: diseases linked to infection and transformation. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p. 1602, 2016.

KAKAVANDI, Ehsan *et al.* Anoikis resistance and oncoviruses. *Journal of cellular biochemistry*, v. 119, n. 3, p. 2484-2491, 2018.

LIU, Yihao; SU, Lei; XIAO, Haipeng. Review of factors related to the thyroid cancer epidemic. *International journal of endocrinology*, v. 2017, 2017.

LLOYD, Ricardo V. *et al.* Papillary thyroid carcinoma variants. *Head and Neck Pathology*, v. 5, n. 1, p. 51–56, 2011.

MARKOULATOS, Panayotis *et al.* Laboratory diagnosis of common herpesvirus infections of the central nervous system by a multiplex PCR assay. *Journal of clinical microbiology*, v. 39, n. 12, p. 4426-4432, 2001.

MOGHOOFEI, Mohsen *et al.* Epstein–Barr virus and thyroid cancer: The role of viral expressed proteins. *Journal of cellular physiology*, v. 234, n. 4, p. 3790-3799, 2019.

MOORMANN, Ann.; MÜNZ, Christian. Editorial overview: Viruses and cancer. *Current Opinion in Virology*, v. 20, p. IV-V, 2016.

MOSTAFAEI, Shayan *et al.* Viral infections and risk of thyroid Cancer: a systematic review and empirical Bayesian meta-analysis. *Pathology-Research and Practice*, v. 216, n. 4, p. 152855, 2020.

NEMETZ, M. A.; MATTANA, T. C. C. Abordagem dos Nódulos e do Câncer Diferenciado de Tireoide. *In: PIGNATARI, S. S. N.; ANSELMO-LIMA, W. T. Tratado de Otorrinolaringologia*. 3. ed. Cap. 138, p. 4745-4815. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

OH, Jin-Kyoung; WEIDERPASS, Elisabete. Infection and cancer: global distribution and burden of diseases. *Annals of global health*, v. 80, n. 5, p. 384-392, 2014.

RIBEIRO-SILVA, Alfredo; ZUCOLOTO, Sérgio. O papel do vírus epstein-barr na tumorigênese humana. *Medicina (Ribeirão Preto)*, v. 36, n. 1, p. 16-23, 2003.

SAIKI, Randall K. *et al.* Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SHAH, Jatin P. *et al.* Jatin Shah's Head and Neck Surgery and Oncology E-Book. Elsevier Health Sciences, 5ª Edição, p. 489-491, 2020.

STAMATIOU, Dimitris P. *et al.* Herpes and polyoma family viruses in thyroid cancer. *Oncology Letters*, v. 11, n. 3, p. 1635-1644, 2016.

TSANG, Chi Man; TSAO, Sai Wah. The role of Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Virologica Sinica*, v. 30, n. 2, p. 107-121, 2015.

WANG, J. H. *et al.* Detection of human parvovirus B19 in papillary thyroid carcinoma. *British journal of cancer*, v. 98, n. 3, p. 611-618, 2008.

WISEMAN, Helen; HALLIWELL, Barry. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, v. 313, n. Pt 1, p. 17, 1996.

WOLF, Hans; HAUSEN, Harald Zur; BECKER, Volker. EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature New Biology*, v. 244, n. 138, p. 245-247, 1973.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Globocan. International Agency for Research on Cancer. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>. Acesso em 05 de fev. de 2023.

XING, Mingzhao. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 13, n. 3, p. 184-199, 2013.

YAO, Q. Y.; RICKINSON, A. B.; EPSTEIN, M. A. A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *International Journal of Cancer*, v. 35, n. 1, p. 35-42, 1985.

YOUNG, Laurence. S. *et al.* Epstein-Barr virus gene expression in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of General Virology*, v. 69, n. 5, p. 1051–1065, 1988.

YU, Shi-Tong *et al.* Is Epstein-Barr Virus Infection Associated With Thyroid Tumorigenesis?—A Southern China Cohort Study. *Frontiers in oncology*, v. 9, p. 312, 2019.

APÊNDICE A
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE VÍRUS ONCOGÊNICOS EM NEOPLASIAS DE GLÂNDULA TIREOIDE NO ESTADO DO AMAZONAS

Pesquisador responsável: Dr. Diego Monteiro de Carvalho

Endereço do pesquisador responsável: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FCECON (CEP/FCECON) - localizado na Rua Francisco Orellana, 215, Planalto, Cep: 69040-010, Manaus - AM (3º andar).

Telefone do pesquisador responsável para contato: (92) 9 9396-9908 / (92) 98122-6168 / (92)98128-3266

Prezado (a) Senhor (a):

- Você está sendo convidado (a) a participar deste estudo de forma totalmente **voluntária**.
- Antes de concordar em participar desta pesquisa é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento.
- Os pesquisadores deverão responder a todas as suas dúvidas antes de você decidir participar.
- Você tem o direito de **desistir** de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade.

O (A) senhor (a) está sendo convidado a participar do projeto intitulado: **ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE VÍRUS ONCOGÊNICOS EM NEOPLASIAS DE GLÂNDULA TIREOIDE NO ESTADO DO AMAZONAS**

Objetivo: Identificar a presença dos micróbios ou microorganismos (neste caso os vírus) potencialmente causadores de tumores (câncer) na glândula tireoide, obtidas após as cirurgias de cabeça e pescoço realizadas na Fundação Centro de Controle em Oncologia do Amazonas (FCECON). **Justificativa:** No Brasil, principalmente na região Norte, poucos são os dados sobre a infecção causadas por vírus que podem causar tumores. Existem dois vírus citados em outras pesquisas que podem estar associados a estes casos, eles se chamam Vírus Epstein Barr e Parvovírus, embora existam outros como possíveis causadores de câncer de tireoide. Além de melhorar

as informações sobre esse tema, verificando a presença de vírus causadores de câncer em tumores de tireoide, o projeto pode funcionar como estímulo à investigação da relação entre infecção viral e o câncer de tireoide no estado do Amazonas e até mesmo em território nacional tendo em vista o baixo índice de pesquisas sobre a possível relação acima descrita. Com o conhecimento da causa inicial dos cânceres de tireoide elucidado, formas de prevenção podem ser elaboradas para reduzir o número de casos de tumores tireoidianos. **Do Procedimento e seus Riscos:** Para que você participe da pesquisa, você deverá autorizar a coleta de fragmentos (pedacinhos) de material da peça cirúrgica que já foi retirada no ato operatório das tireoidectomias totais ou parciais (remoção completa ou parcial da glândula tireoide), assim, não haverá interferência nenhuma entre o que foi programado entre você e o seu cirurgião. Esses pedacinhos de material, serão armazenados pelos pesquisadores e a seguir serão estudados por técnicas que permitirão a identificação do genoma (material genético) do vírus, nas peças cirúrgicas removidas do seu pescoço. Importante saber que as informações geradas após a análise serão publicadas e você também terá acesso, contudo somente após o fim de todo o estudo. Caso não sejam utilizados todos os fragmentos selecionados para este estudo, garantimos que eles não serão usados para outro fim, nem outras pesquisas, e deverão ser incinerados. Embora a equipe tenha tomado todas as medidas necessárias para o seu bem-estar como participante deste estudo, você pode sentir-se desconfortável com os questionamentos sobre sua participação na pesquisa, para evitarmos desconfortos, garantimos que tal abordagem seja feita em momento e local oportuno, por pessoal treinado a lhe ajudar e orientar, sempre prezando pelo seu bem-estar. Há o risco também de perda do sigilo de dados, para tanto, os pesquisadores garantem que suas informações serão sempre guardadas em local seguro e somente acessadas por membros da pesquisa. **Benefícios:** Este estudo pode ajudar a comunidade científica a elucidar a causa dos tumores de tireoide, e assim, ajudar governos e instituições a orientarem medidas de controle para estas doenças. **Sigilo:** As informações fornecidas por você terão sua privacidade garantida pelos pesquisadores responsáveis. Os participantes da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma. **Indenização e Ressarcimento:** É garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da sua participação na pesquisa, por meio de decisão judicial ou extrajudicial. Não há qualquer valor econômico, a receber ou a

pagar, pela sua participação. No entanto, caso haja qualquer despesa decorrente da sua participação na pesquisa, haverá ressarcimento realizado pelo grupo de pesquisa.

Consentimento pós-informado:

Declaro consentimento em participar deste Projeto, autorizando o acesso a fragmentos da tireoide, necessários para este estudo, segundo as condições a mim explicadas por este termo.

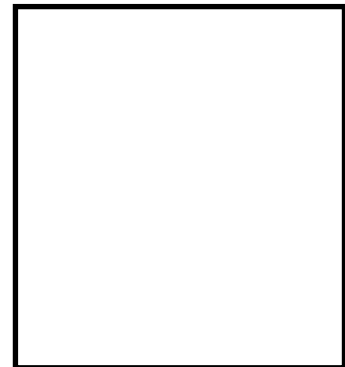
Declaro ainda estar ciente de que essa pesquisa tem finalidade científica, que a participação tem caráter voluntário e que as identidades dos voluntários serão mantidas em total sigilo por tempo indeterminado, tanto pelo executor como pela instituição onde será realizado, e que os resultados dos procedimentos executados na pesquisa serão analisados e alocados em tabelas, figuras ou gráficos e divulgados em palestras, conferências, periódico científico ou outra forma de divulgação que propicie o repasse dos conhecimentos para a sociedade e para autoridades normativas em saúde nacionais ou internacionais, de acordo com as normas/leis regulatórias de proteção nacional e internacional.

Também estou ciente de que a participação neste trabalho não trará custos, além dos já previstos neste termo, e que em qualquer momento poderei obter esclarecimentos sobre todos os procedimentos utilizados na pesquisa e nas formas de divulgação dos resultados, bem como a liberdade de recusar a minha participação ou retirar meu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo físico, material ou moral. Além disso, estou ciente e em caso de custos, despesas ou indenizações advindas da pesquisa, o próprio pesquisador responsabilizar-se-á por custeá-las.

Para mais informações: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FCECON (CEP/FCECON), Telefone Fixo: (92) 3655-4773, horário de atendimento ao público em geral e aos pesquisadores será de 08:00h às 12:00h todas as terças e quintas-feiras. Local de atendimento: Sala do CEP no 3º andar da Fundação CECON, localizado na Rua Francisco Orellana, 215, Planalto, Cep: 69040-010, Manaus - AM. Email para contato e quaisquer dúvidas sobre a pesquisa: comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.

Iniciais do participante: _____

Assinatura do doente/responsável



Polegar do Doente

(Para o caso de impossibilidade de assinatura)

Assinatura do pesquisador

Manaus, ____ de _____ de ____.

APÊNDICE B
FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

Projeto: ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE VÍRUS ONCOGÊNICOS EM
NEOPLASIAS DE GLÂNDULA TIREOIDE NO ESTADO DO AMAZONAS

1.SAME:_____

2.Idade:_____

3.Sexo:_____

3.Local de Nascimento:_____

4.Procedência do Paciente:_____

5.Etnia:

() Branca () Parda () Indígena () Amarela () Negra

6.Alcoolismo: () Sim () Não

7.Tabagismo: () Sim () Não

8.HPP:_____

9.Diagnóstico:_____

10.Tipo Histológico: _____

11.Estadiamento ao diagnóstico:_____

12.Status EBV: Positivo () Negativo ()

13.Status Parvovírus B19: Positivo () Negativo ()

APÊNDICE C

TERMO DE COMPOSIÇÃO BIORREPOSITÓRIO

O presente acordo estabelece as normas para operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano coletado e armazenado em Biorrepositório, vinculado ao Projeto de Pesquisa **“ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE VÍRUS ONCOGÊNICOS EM NEOPLASIAS DE GLÂNDULA TIREOIDE NO ESTADO DO AMAZONAS”**, a ser gerenciado pelos pesquisadores sob orientação do Prof. Dr. Diego Monteiro de Carvalho com participação da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas, fundação pública, CNPJ nº 34.570820/0001-30, conforme definido na legislação competente, atendendo, em especial, ao disposto nas Resoluções n 441/11 e n 466/12, ambas do CNS, na Diretoria de Ensino e Pesquisa representada na figura da Dra. Kátia Luz Torres e sob curadoria da Dra. Valquíria do Carmo Alves Martins.

- 1) O Biorrepositório, constituído por amostras de células da Glândula Tireoide atenderá às normas do Regimento Institucional de Biorrepositório da instituição depositária e será sediado e armazenado no Laboratório de Anatomia Patológica da FCECON - Rua Francisco Orellana, 215, Planalto, Cep: 69040-010, Manaus - AM.
- 2) O material biológico constituinte do Biorrepositório será mantido a fresco, refrigerado à menos -30 °C até sua utilização;
- 3) O prazo de armazenamento do Biorrepositório será o mesmo definido no cronograma do projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCECON.
- 4) As instituições acordantes, devidamente representadas, poderão ter acesso aos dados e materiais obtidos em decorrência da execução do projeto, durante sua vigência, mediante solicitação aos membros da equipe do projeto;
- 5) A solicitação de acesso a dados e materiais do Biorrepositório somente poderá ser feita por meio dos membros da equipe do projeto de pesquisa, devidamente cadastrados na Plataforma Brasil, dentro dos parâmetros estabelecidos pelo Projeto de Pesquisa e mediante aprovação da análise de ética;
- 6) O Biorrepositório estará sob a responsabilidade do pesquisador, competindo aos acordantes o cumprimento das disposições aqui constantes e observância das normas contidas no regulamento do Biorrepositório;

- 7) A requisição das amostras durante a vigência da pesquisa deverá ser feita por escrito e não poderá causar prejuízo ao regular desenvolvimento do Projeto de Pesquisa;
- 8) Havendo a retirada ou desistência por parte do participante da pesquisa, referente à amostra coletada e armazenada, deverá o pesquisador e a instituição que mantém a guarda disponibilizarem a amostra, nos termos da regulamentação vigente. Nesse caso, será facultado ao participante da pesquisa requerer a amostra ou solicitar que ela seja destruída pelo pesquisador;
- 9) Em caso de dissolução da parceria entre as instituições durante a vigência do projeto, a partilha e destinação dos dados e materiais que compõem o Biorrepositório serão objeto de novo acordo que deverá ser submetido à análise de ética dos Comitês de Ética Institucionais;
- 10) Todos os materiais armazenados no Biorrepositório serão incinerados após o fim do estudo.

Assinatura:



Prof. Dr. Diego Monteiro de Carvalho
Pesquisador Responsável pelo Projeto FCECON/FHAJ

APÊNDICE D – INFOGRÁFICO SOBRE NEOPLASIAS TIREOIDIANAS



APÊNDICE E – STROBE CHECKLIST (STROME-ID)

STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of *cross-sectional studies* (STROME-ID Strengthening the Reporting of Molecular Epidemiology for Infectious Diseases)

STROME 10 Strengthening the Reporting of Molecular Epidemiology for Infectious Diseases			Page No
	Item No	Recommendation	
Title and abstract	1	(a) Indicate the study’s design with a commonly used term in the title or the abstract	1
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	8/9
Introduction			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	16
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	21
Methods			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	23
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	23
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	23/24 25
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	25/26 27/28
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	25/26 27/28
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	37
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	24
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	29
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	29
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	29
		(c) Explain how missing data were addressed	29
		(d) If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	29
		(e) Describe any sensitivity analyses	29
Results			
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	30/31 32/33 34
		(b) Give reasons for non-participation at each stage	-

		(c) Consider use of a flow diagram	-
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	30/31 32/33
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	-
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures	34
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included	34
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized	-
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	-
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	34
Discussion			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	35
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	35/36 37
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	37/38
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	38
Other information			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	41
Ethics	23	Report any ethical considerations with specific implications for infectious-disease molecular epidemiology	23/45 50/51

*Give information separately for exposed and unexposed groups.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.

ANEXO 1



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia (PPGRACI)
Mestrado Profissional em Cirurgia



ANUÊNCIA DO(A) ORIENTADOR(A)

Título do Projeto

ANÁLISE MOLECULAR DAS INFECÇÕES POR VÍRUS EPSTEIN-BARR E
PARVOVÍRUS B19 EM PACIENTES COM NEOPLASIAS DE TIREOIDE NO
ESTADO DO AMAZONAS

Orientador

Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima

Coorientador

Prof. Dra. Lia Mizobe Ono

Linha de Atuação Científico-Tecnológica

V. Projeto científico

Discente

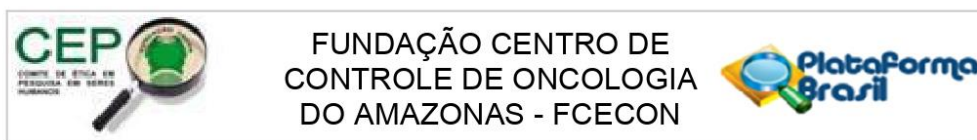
Número de Inscrição/Matricula

EMILY BARBOSA DO NASCIMENTO

2220628

Assinatura e carimbo do(a) Orientador(a)

ANEXO 2



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE VÍRUS ONCOGÊNICOS EM NEOPLASIAS DE GLÂNDULA TIREÓIDE NO ESTADO DO AMAZONAS.

Pesquisador: DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 44800421.9.0000.0004

Instituição Proponente: Diretoria de Ensino e Pesquisa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.696.238

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo PB_INFORMAÇÕES_ BÁSICAS_DO_PROJETO_1709697.pdf de (24/04/2021). Trata-se de Estudo transversal e observacional de análise de fragmentos da glândula tireoide obtidos no pós-operatório de pacientes com o diagnóstico de neoplasia tireoidiana, afim de avaliar a presença da infecção de vírus oncogênicos em tumores tireoidianos de pacientes acompanhados no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FCECON, no período de Janeiro de 2019 a Dezembro de 2021.

INTRODUÇÃO: O câncer da tireoide é a neoplasia endócrina mais prevalente no mundo, o que reforça a necessidade de estudar os múltiplos fatores etiopatogênicos relacionados ao desenvolvimento dessas neoplasias, como os vírus oncogênicos. Entre diferentes agentes infecciosos possíveis, a infecção viral pelo vírus Epstein Barr (EBV) e Parvovírus B19 figuram como possíveis fatores de risco para os carcinomas bem diferenciados da tireoide.

LOCAL DO ESTUDO : Será realizado na FCECON, onde será acessado o Departamento de Cabeça Pescoço, Serviço de Arquivo Médico (SAME), Centro Cirúrgico, Laboratório de Anatomia Patológica e Laboratório de Biologia Molecular (Rede Genoma).

POPULAÇÃO DO ESTUDO : Serão recrutados pacientes com diagnóstico de neoplasias de tireoide

Endereço: Rua Francisco Orellana, 215 - Planalto - 3º andar

Bairro: S/N

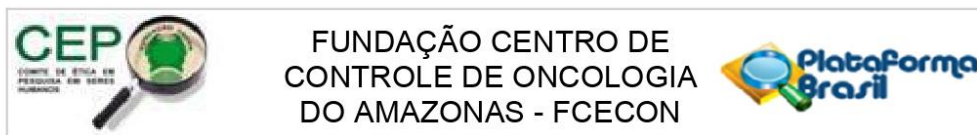
CEP: 69.040-010

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-4774

E-mail: comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br



Continuação do Parecer: 4.696.238

atendidos no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FCECON no período definido pela pesquisa.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO: Serão incluídos no estudo, fragmentos tireoidianos provenientes de pacientes operados para esta doença, desde que sejam maiores de 18 anos, de ambos os sexos.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO : Fragmentos cuja histopatologia do espécime tireoidiano não seja compatível com as neoplasias primárias da glândula - Adenoma Folicular, Carcinoma Papilífero, Carcinoma Folicular, Carcinoma Medular ou Carcinoma Anaplásico.

CÁLCULO DA AMOSTRA: A amostra será constituída por, no mínimo, 161 fragmentos de espécimes tireoidianos e suas replicatas, de maneira que se garanta um erro amostral não superior a 5% e confiabilidade de 95%. Para tanto, utilizou-se o cálculo do tamanho de uma amostra aleatória simples para populações finitas, considerando o tamanho da população (N) de 270, visto que este é o total de pacientes com neoplasias de tireoide que em média são atendidos no período de três anos de acordo com informações obtidas na FCECON e artigos publicados realizados no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FCECON.

METODOLOGIA : O protocolo é dividido em dois grupos: GRUPO 1 (n = 107) Grupo em que serão acessadas as amostras parafinadas de pacientes já operados e em seguimento no serviço de Cabeça e Pescoço. GRUPO 2 (n = 54) G2- Grupo em que serão acessadas as amostras frescas pós tireoidectomias, realizadas no Centro Cirúrgico da FCECON, sob orientação de profissional patologista da unidade, membro do estudo. Para os dois grupos acima, serão seguidos os seguintes procedimentos: Os pacientes que preenchem os critérios de inclusão, durante a consulta de rotina, serão abordados no ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FCECON, onde serão orientados sobre o estudo e seus objetivos, bem como, convidados a participar do mesmo. Ao concordarem com os termos do estudo, serão orientados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (APÊNDICE I). Com a aplicação de um questionário padrão (APÊNDICE II), serão coletadas informações epidemiológicas sobre os fatores de risco e os determinantes sociais de saúde relacionados às neoplasias tireoidianas. O acesso aos espécimes tireoidianos para composição do Biorrepositório da pesquisa e Análise da presença de vírus oncogênicos nos fragmentos de tecido tireoidiano (Epstein Barr-virus e Parvovírus B19) será feita de duas maneiras: Dos participantes incluídos no G1 - serão acessadas as amostras de tecido tireoidiano já

Endereço: Rua Francisco Orellana, 215 - Planalto - 3º andar

Bairro: S/N

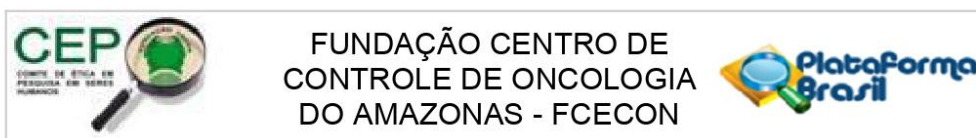
CEP: 69.040-010

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-4774

E-mail: comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br



Continuação do Parecer: 4.696.238

parafinadas, e com diagnóstico Histopatológico. Dos participantes incluídos no G2, as os fragmentos da glândula de tireoide serão obtidos a partir do espécime cirúrgico de tireoidectomias totais ou parciais realizadas pelo Serviço de Cabeça e Pescoço da FCECON devido a presença de possível neoplasia da glândula. Ainda no grupo G2, as peças cirúrgicas seguirão, conforme protocolo da Fundação CECON, para o Laboratório de Anatomia Patológica para realização de estudo histopatológico, e, mediante orientações do Patologista membro da equipe, serão fornecidos fragmentos para a composição do Biorrepositório deste estudo, sem prejuízo para a análise histopatológica. Para ambos os grupos, as amostras compatíveis com Adenoma Folicular, Carcinoma Papilífero, Carcinoma Folicular, Carcinoma Medular ou Carcinoma Anaplásico - neoplasias primárias da glândula tireoide - serão selecionadas e testadas para presença de Epstein Barr-vírus e Parvovírus B19 por meio de rtPCR e sondas desenhadas especificamente para estes vírus. As amostras positivas para EBV e Parvovírus B19 serão também estudadas por meio de imunohistoquímica para os marcadores de atividade viral.

Objetivo da Pesquisa:

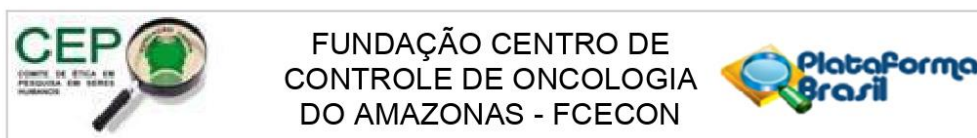
Objetivo Primário: Descrever a prevalência dos vírus oncogênicos em peças anatómicas de neoplasias de tireoide obtidas através de cirurgias de cabeça e pescoço realizadas na Fundação Centro de Controle em Oncologia do Amazonas (FCECON) período de janeiro de 2019 a dezembro de 2021.

Objetivo Secundário: 1. Caracterizar o perfil socioeconômico e comportamental dos pacientes incluídos no estudo para estabelecimento de prováveis fatores de riscos; 2. Descrever a prevalência de infecção pelo vírus Epstein Barr Virus em amostras de tecidos tireoidianos pós-tireoidectomia; 3. Descrever a prevalência de infecção pelo vírus Parvovírus B19 em amostras de tecidos tireoidianos pós-tireoidectomia; 4. Correlacionar os achados moleculares com o diagnóstico histopatológico da neoplasia; 5. Caracterizar o viroma das amostras negativas para vírus Epstein Barr Virus e Parvovírus B19 em busca da presença de outros vírus possivelmente oncogênicos nas peças de tireoide; 6. Correlacionar atividade dos Epstein Barr vírus e Parvovírus B19 encontrados nas amostras positivas para esses vírus a partir de imunohistoquímica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Por tratar-se de um estudo com aplicação de questionário e obtenção de material orgânico para avaliação laboratorial, a pesquisa apresenta riscos para os participantes, pertinentes a

Endereço: Rua Francisco Orellana, 215 - Planalto - 3º andar
Bairro: S/N **CEP:** 69.040-010
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-4774 **E-mail:** comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br



Continuação do Parecer: 4.696.238

invasão de privacidade, o desconforto proporcionado pelo fornecimento de informações acerca de sua doença, divulgação de dados confidenciais e discriminação e/ou constrangimento a partir do conteúdo revelado nos instrumentos de coleta de dados e análise laboratorial de fragmentos das peças cirúrgicas. Desta forma, frente aos riscos expostos, medidas e cautelas serão adotadas para minimizar e proteger o participante da pesquisa. Para as amostras frescas, os fragmentos da amostra tireoidiana serão coletados após o ato cirúrgico, não interferindo no procedimento em si, e os pacientes serão abordados durante o atendimento ambulatorial em consultório com os pesquisadores.

As amostras parafinadas, serão acessados no acervo da histoteca do Laboratório de Anatomia Patológica da FCECON. O TCLE e o questionário (APÊNDICE I e II) serão aplicados no momento da consulta médica, após a tomada de decisão cirúrgica entre o paciente e seu médico, nos casos não operados (G2), e após o fim da consulta de rotina nos casos que estão em seguimento pós-cirúrgico (G1), em sala reservada, com o objetivo de minimizar desconfortos na avaliação prática, bem como não interferir em qualquer relação de assistência estabelecida entre equipe de saúde e doente. Serão mantidos sob sigilo absoluto a identidade dos sujeitos da pesquisa e os dados obtidos nesse estudo estarão disponíveis exclusivamente aos pesquisadores do estudo, aos órgãos de controle e aos participantes. Os pesquisadores asseguram que as informações, bem como os fragmentos tireoidianos obtidos são exclusivos para fins deste estudo.

Benefícios: O projeto não trará benefícios diretos para o paciente, entretanto, como objetiva avaliar a prevalência de vírus oncogênicos em neoplasias de tireoide, um tema pouco estudado, principalmente na região amazônica, este estudo proporcionará um melhor conhecimento acerca da correlação da infecção viral com a carcinogênese da glândula, podendo servir como uma base de dados acurados para estudos futuros de neoplasias de glândula tireoide e até mesmo para a possível prevenção destas neoplasias tireoideanas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é relevante e exequível. A metodologia apresentada está adequada aos objetivos propostos. Foram apresentados os riscos e providências para minimizá-los.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os termos de apresentação obrigatória TCLE, CARTAS DE ANUÊNCIA DOS SETORES ENVOLVIDOS (FCECON : Centro cirúrgico ; Serviço de cirurgia de cabeça e pescoço;

Endereço: Rua Francisco Orellana, 215 - Planalto - 3º andar

Bairro: S/N

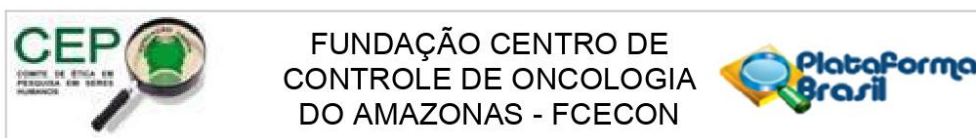
CEP: 69.040-010

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-4774

E-mail: comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br



Continuação do Parecer: 4.696.238

SAME; Laboratório de Biologia Molecular; Laboratório de Anatomia Patológica) Instituto Leônidas e Maria Deane - Fundação Oswaldo Cruz); DECLARAÇÃO DOS PESQUISADORES, TCUD com assinatura dos pesquisadores, FOLHA DE ROSTO, TERMO DE COMPOSIÇÃO DO BIORREPOSITÓRIO, TCUD, FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS, MEDIDAS SANITÁRIAS.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as recomendações foram atendidas, pendências e inadequações foram ajustadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembrando que existe o compromisso do pesquisador em divulgar os resultados da pesquisa (Res. CNS 5102016, Artigo 3º, Inciso IV).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1709697.pdf	24/04/2021 14:43:45		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TVIRUS_V1.pdf	24/04/2021 14:40:53	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	24/04/2021 14:39:24	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito
Outros	FINANCIAMENTO.pdf	24/04/2021 14:39:06	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_TVIRUS.pdf	24/04/2021 14:38:13	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_4652549.pdf	22/04/2021 11:33:51	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	16/04/2021 18:10:36	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	27/02/2021 01:03:36	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	COMPROMISSO_DIEGO.pdf	26/02/2021 20:14:09	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ANUENCIA_VALQUIRIA.pdf	26/02/2021 20:13:54	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito

Endereço: Rua Francisco Orellana, 215 - Planalto - 3º andar

Bairro: S/N

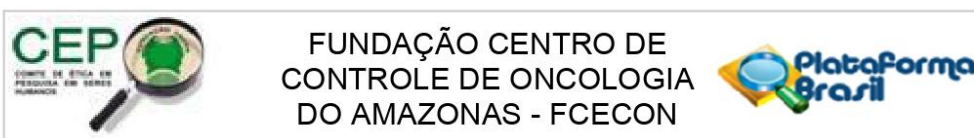
CEP: 69.040-010

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-4774

E-mail: comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br



Continuação do Parecer: 4.696.238

Declaração de Pesquisadores	ANUENCIA_SPARTACO.pdf	26/02/2021 20:13:45	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ANUENCIA_NAVECA.pdf	26/02/2021 20:13:31	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ANUENCIA_MOTA.pdf	26/02/2021 20:13:24	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ANUENCIA_MONIQUE.pdf	26/02/2021 20:13:15	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ANUENCIA_MARIA.pdf	26/02/2021 20:12:40	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ANUENCIA_JB.pdf	26/02/2021 20:12:33	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ANUENCIA_ENEDINA.pdf	26/02/2021 20:12:26	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ANUENCIA_EMILY.pdf	26/02/2021 20:12:13	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ANUENCIA_DEBORAH.pdf	26/02/2021 20:12:05	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	26/02/2021 20:11:03	DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 06 de Maio de 2021

Assinado por:
Lia Mizobe Ono
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Francisco Orellana, 215 - Planalto - 3º andar

Bairro: S/N

CEP: 69.040-010

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-4774

E-mail: comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br