

**CARCINOMA PAPILÍFERO DA TIREÓIDE:  
ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS CASOS  
USUAIS E AQUELES ASSOCIADOS À  
TIREOIDITE AUTOIMUNE**

**PAULO ROBERTO GRIMALDI OLIVEIRA**

**Tese de doutorado apresentada à Fundação  
Antônio Prudente para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**

**São Paulo**

**2009**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Oliveira, Paulo Roberto Grimaldi.

**Carcinoma papilífero da tireóide: estudo comparativo entre os casos usuais e aqueles associados à tireoidite autoimune /**

Paulo Roberto Grimaldi Oliveira – São Paulo, 2009.

137p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:  
Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. CÂNCER DA TIREÓIDE/patologia. 2. CARCINOMA PAPILAR. 3. TIREOIDITE AUTO-IMUNE. 3. DOENÇA DE HASHIMOTO. 4. IMUNO-HISTOQUÍMICA 5. BIOLOGIA MOLECULAR. 6. PIROSSEQUENCIAMENTO.

*A extensão do deserto que nos cerca é proporcional à resistência que temos em aceitar as mudanças que Deus propõe ao longo da vida.*

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, porque sei que, ao me colocar neste projeto, certamente Ele já tem um propósito para minha vida.

E à minha família, pelos momentos preciosos de convívio que deixamos de ter por causa deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

A todos aqueles que contribuíram para que este trabalho fosse realizado e em especial:

Ao Dr. Fernando Augusto Soares, pela oportunidade e pela orientação geral;

Ao Dr. Luiz Paulo Kowalski, pelo estímulo;

Ao Doutorando Cleiton Fagundes Machado, pelos conceitos de biologia molecular e pelo grande comprometimento pessoal, decisivo para a realização deste trabalho;

A todos os Colaboradores do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital AC. Camargo, por tantas providências tomadas;

Às pós-doutorandas Marcilei Elisa Cavicchioli Buin e Cláudia Malheiros Coutinho Camillo, pelo tempo e pela dedicação;

À Suely Francisco e a todas as funcionárias da Biblioteca, pela atenção e pelo carinho;

À FAPESP, pela confiança depositada no projeto e pelo auxílio financeiro que viabilizou a realização do projeto inicial;

À Olívia, minha filha muito querida, cuja dedicação e comprometimento ao laboratório Pathos permitiram que eu me voltasse inteiramente ao preparo deste trabalho durante todo este ano de 2009;

À Nazareth, minha esposa e ao Augusto, meu filho, pelo apoio incondicional e pela compreensão;

Ao meu pastor Frederico Bauerfeldt, ao Apóstolo Fábio Abbud e a todos os membros da minha igreja El Shaddai, pela ausência a tantos eventos e compromissos espirituais nestes últimos quatro anos;

A Deus, a Jesus Cristo e ao Espírito Santo, que têm o controle de todas as coisas, por terem feito germinar em meu coração a semente deste trabalho e providenciado todas as condições espirituais para que eu pudesse realizá-lo.

## RESUMO

Oliveira PRG. **Carcinoma papilífero da tireóide: estudo comparativo entre os casos usuais e aqueles associados à tireoidite autoimune.** São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Os nódulos de tireóide são frequentes no mundo todo, principalmente entre as mulheres. A preocupação maior no seu estudo é afastar a presença de neoplasia maligna, que corresponde a aproximadamente 10% de todos os casos. Alguns procedimentos médicos têm sido usados para se chegar ao diagnóstico pré-operatório dos nódulos tireoideanos, dentre os quais a cintilografia, a ultrassonografia e, mais recentemente, a punção aspirativa com agulha fina. O diagnóstico definitivo, porém, ainda é responsabilidade do estudo anatomopatológico, muitas vezes precedido pelo exame por cortes de congelação. Um dos fatores limitantes deste método é a presença de tireoidite autoimune, que dificulta o exame macroscópico pelas alterações morfológicas que provoca no tecido tireoideano. Não somente durante a biópsia de congelação, mas também no momento do diagnóstico definitivo, a associação entre tireoidite e carcinoma papilífero tem desafiado os pesquisadores, que até hoje não chegaram a um consenso sobre o significado desta associação. Na tentativa de colaborar para o esclarecimento desse tema, estudamos 102 amostras de tireóide arquivadas no banco de tumores do Hospital AC Camargo, formando com elas dois grupos de pacientes, um com carcinoma e tireoidite (70 pacientes) e outro, somente com carcinoma (32 pacientes). Tendo em vista a importância da caracterização objetiva do fenômeno inflamatório, subclassificamos, por parâmetros histológicos, a tireoidite em leve, moderada e intensa. Foi realizado estudo imunoistoquímico para avaliação de 16 proteínas relacionadas à presença de células indiferenciadas (p63), à via das MAPKs (Ras, AKT-1e ERK1/2), às moléculas de adesão (E-caderina e CD44), à

ativação da via de sinalização Wnt (beta-catenina), à via do receptor de morte (Fas-L e caspase 8), às moléculas ligadas à indução de interleucinas (iNOS e COX-2), aos fatores de crescimento e diferenciação celulares (galectina 3 e VEGF) e aos índices de proliferação celular e apoptose (Ki-67, caspase 3 clivada e Fas). Além disso, fizemos a pesquisa da mutação V600E do gene *BRAF* por pirosequenciamento e a pesquisa dos rearranjos cromossômicos RET/PTC1 e RET/PTC3 por RT-PCR. Os resultados evidenciaram diferenças estatisticamente significativas na expressão de Ras, ERK1/2, CD44, COX-2 e Fas entre os grupos com e sem tireoidite. Essas diferenças também validaram a subclassificação histológica para a intensidade da tireoidite, ao demonstrar que quanto mais intensa ela se apresentou, maior foi a expressão imunoistoquímica dessas proteínas.

## SUMMARY

Oliveira PRG. **[Papillary carcinoma of the thyroid: a comparison of typical cases with those associated autoimmune thyroiditis]**. São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Thyroid nodules are common throughout the world, mainly in women. The principal focus of their study is to exclude the possibility of a malignant neoplasm, which is found in approximately 10% of all cases. Various medical procedures, such as scintillography, ultrasonography, and, more recently, fine needle aspiration biopsy are used pre-operatively to diagnose thyroid nodules. However, the definitive diagnosis is still the pathologic diagnosis, often preceded by examination of multiple frozen sections. One of the limiting factors of this method is the presence of autoimmune thyroiditis, as the morphological tissue alterations associated with this inflammation cause problems in the macroscopic and microscopic evaluation of the tissue. Not only during the frozen section analysis, but also during the definitive evaluation, the association between thyroiditis and papillary carcinoma is a challenge, as there is still no consensus about the nature of this association. In an attempt to help clarify this situation, we studied samples of thyroid tissue from 102 patients, collected from the archives of the Tumor Bank of the AC Camargo Hospital, divided into two groups; the first group consisted of 70 patients with both carcinoma and thyroiditis, while the second group of 32 patients had only carcinoma. Due to the importance of an objective characterization of the inflammatory process, specifically in this research, histological parameters were used to sub classify the thyroiditis as mild, moderate or severe. We used immunohistochemical methods to study 16 proteins related to: the presence of undifferentiated cells (p63); the MAPK pathway (Ras, AKT-1 and ERK1/2); adhesion molecules (E-caderin and CD44); the Wnt signal activation pathway (beta-catenin); the death receptor

pathway (Fas-L and caspase 8); molecules associated with induction of interleukins (iNOS and COX-2); factors of growth and cellular differentiation (Galactin 3 and VEGF); and indices of cellular proliferation and apoptosis (Ki-67, activated caspase 3 and Fas). As well, we used pyrosequencing to study the V600E mutation of the *BRAF* gene, and RT-PCR to evaluate rearrangements of chromosomes RET/PTC1 and RET/PTC3. Our results showed statistically significant differences between the groups with and without thyroiditis in the expression of Ras, ERK 1/2, CD44, COX-2 and Fas. These results also validated the histological sub classification used to grade the intensity of the thyroiditis; the more intense the thyroiditis, the greater was the immunohistochemical expression of these proteins.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Tireóide: topografia e aspecto microscópico.....	2
<b>Figura 2</b>	Ninhos celulares sólidos.....	4
<b>Figura 3</b>	Nódulo na tireóide.....	5
<b>Figura 4</b>	Aspecto ultrassonográfico de nódulo tireoideano.....	8
<b>Figura 5</b>	Blocos de células diagnósticas de PTC em material de PAAF.....	9
<b>Figura 6</b>	Equipamento portátil para biópsias de congelação.....	11
<b>Figura 7</b>	Lobo tireoideano e istmo com tireoidite autoimune.....	13
<b>Figura 8</b>	O ciclo celular.....	16
<b>Figura 9</b>	Vias de sinalização intracelular das MAPKs.....	18
<b>Figura 10</b>	Alterações essenciais na fisiologia celular para o desenvolvimento do câncer.....	20
<b>Figura 11</b>	Via de sinalização da apoptose.....	25
<b>Figura 12</b>	Angiogênese tumoral.....	27
<b>Figura 13</b>	Tipos de carcinomas da tireóide.....	30

<b>Figura 14</b>	Patogênese do carcinoma originado nas células foliculares da tireóide.....	31
<b>Figura 15</b>	Via de sinalização ativada por RET e RET/PTC.....	41
<b>Figura 16</b>	Tireoidite autoimune.....	48
<b>Figura 17</b>	Classificação da intensidade da tireoidite autoimune: parâmetros histológicos.....	61
<b>Figura 18</b>	Preparo do TMA.....	62
<b>Figura 19</b>	Tela de trabalho do ACIS III.....	68
<b>Figura 20</b>	Amostras de DNA de carcinoma papilífero de tireóide.....	70
<b>Figura 21</b>	RNAs extraídos de HB4A.....	71
<b>Figura 22</b>	Pirograma.....	73
<b>Figura 23</b>	Curvas de amplificação para amostras de PTC com e sem rearranjos RET/PTC1 e RET/PTC3 por qRT-PCR.....	76
<b>Figura 24</b>	Painel imunoistoquímico das proteínas diferencialmente expressas.....	84
<b>Figura 25</b>	Influência da intensidade de tireoidite na diferença de expressão proteica entre pacientes com carcinoma papilífero da tireóide.....	86
<b>Figura 26</b>	Comparação da expressão relativa do rearranjo RET/PTC1 em carcinoma papilífero da tireóide com e sem tireoidite.....	90

<b>Figura 27</b>	Comparação da expressão relativa do rearranjo RET/PTC3 em carcinoma papilífero da tireóide com e sem tireoidite.....	90
<b>Figura 28</b>	Esquema correlacionando imunoexpressão e intensidade da tireoidite.....	106

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Características técnico-comerciais dos anticorpos.....	64
<b>Tabela 2</b>	Distribuição dos pacientes segundo a intensidade da tireoidite, gênero, idade e tamanho do PTC.....	79
<b>Tabela 3</b>	Valores médios, desvio-padrão e níveis de significância da expressão proteica mediante análise comparativa entre os grupos com TA (T1, T2 e T3) e sem TA (T0).....	81
<b>Tabela 4</b>	Valores médios, desvio-padrão e níveis de significância da expressão proteica mediante análise comparativa entre os grupos com TA (T2 e T3) e sem TA (T0).....	83
<b>Tabela 5</b>	Distribuição da mutação V600E do gene <i>BRAF</i> nos dois grupos estudados.....	88
<b>Tabela 6</b>	Distribuição do rearranjo RET/PTC1 nos grupos com e sem TA.....	88
<b>Tabela 7</b>	Distribuição do rearranjo RET/PTC3 nos grupos com e sem TA.....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACIS III</b>	sistema de imagem celular automatizado (do inglês <i>Automated Cellular Imaging System - ChromaVision Medical Systems</i> )
<b>ADP</b>	adenosina difosfato
<b>AMP</b>	adenosina monofosfato
<b>APAF</b>	fator ativador da protease apoptótica (do inglês <i>Apoptotic peptidase activating factor</i> )
<b>APC</b>	gene da polipose adenomatosa do cólon
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>c-AMP</b>	adenosina monofosfato cíclico
<b>CDK</b>	ciclina dependente de quinases
<b>cDNA</b>	ácido desoxirribonucléico complementar
<b>COX-2</b>	ciclo-oxigenase
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico (do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i> )
<b>DNase</b>	desoxirribonuclease
<b>EDTA</b>	ácido tetracético etilendiamina (do inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>Erk1/2</b>	quinases reguladas por sinais extracelulares (do inglês <i>extracellular regulated kinases</i> )
<b>FADD</b>	proteína associada a Fas com domínio de morte (do inglês <i>Fas-associated death domain</i> )
<b>FTC</b>	carcinoma folicular da tireóide (do inglês <i>follicular thyroid carcinoma</i> )
<b>HLA</b>	antígeno leucocitário humano (do inglês <i>human leucocyte antigen</i> )
<b>IAP</b>	proteína inibidora da apoptose (do inglês <i>inhibitor apoptosis protein</i> )
<b>IL</b>	interleucina
<b>INF</b>	interferon

<b>iNOS</b>	óxido nítrico sintase induzida
<b>KD</b>	kilo-Daltons
<b>Lef/Tcf</b>	fator linfóide-estimulante / fator de células T
<b>MAPK</b>	proteínas quinases ativadas por mitógenos (do inglês <i>mytogen-activated protein kinase</i> )
<b>MHC</b>	principal complexo de histocompatibilidade (do inglês <i>major histocompatibility complex</i> )
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>PBS</b>	solução tampão de fosfato (do inglês <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>PCR</b>	reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PI3K</b>	fosfoinosítide 3 quinase
<b>PPI</b>	pirofosfato inorgânico
<b>pRB</b>	proteína do retinoblastoma
<b>PTC</b>	carcinoma papilífero da tireóide (do inglês <i>papillary thyroid carcinoma</i> )
<b>qRT-PCR</b>	PCR quantitativa em tempo real (do inglês <i>real-time PCR</i> )
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i> )
<b>TA</b>	tireoidite autoimune
<b>TGI</b>	imunoglobulina de crescimento da tireóide (do inglês <i>thyroid growth immunoglobulin</i> )
<b>TMA</b>	<i>tissue microarray</i>
<b>TNF</b>	fator de necrose tumoral (do inglês <i>tumor necrosis factor</i> )
<b>TNFR</b>	receptor do fator de necrose tumoral (do inglês <i>tumor necrosis factor receptor</i> )
<b>TRADD</b>	domínio de morte associado ao fator de necrose tumoral (do inglês <i>tumor necrosis factor receptor associated death domain</i> )
<b>TRK</b>	receptor tirosina quinase (do inglês <i>tyrosine receptor kinase</i> )
<b>TSH</b>	hormônio estimulante da tireóide (do inglês <i>thyroid stimulating hormone</i> )

**VEGF** fator de crescimento vascular endotelial (do inglês *vascular endothelium growth factor*)

**WHO** Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*)

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	A tireóide.....	1
1.2	O nódulo de tireóide.....	4
1.3	O nódulo da tireóide e a ultrassonografia.....	7
1.4	A punção aspirativa com agulha fina (PAAF).....	8
1.5	A biópsia de congelação.....	11
1.6	O nódulo de tireóide e o estudo anatomopatológico.....	14
1.7	A biologia molecular e o câncer.....	15
1.7.1	Auto-suficiência em sinais de crescimento.....	19
1.7.2	Insensibilidade a sinais inibidores do crescimento.....	21
1.7.3	Resistência á apoptose – escape da morte celular programada.....	21
1.7.4	Potencial ilimitado de auto-replicação.....	25
1.7.5	Angiogênese sustentada.....	26
1.7.6	Capacidade de invadir tecidos e provocar metástases.....	28
1.8	O câncer da tireóide – o carcinoma papilífero (PTC).....	29
1.9	A patogênese molecular do PTC.....	34
1.10	O PTC e o gene BRAF.....	38
1.11-	O PTC e o gene <i>RET</i> .....	39
1.12-	O PTC e o gene <i>RAS</i> .....	43
1.13-	O PTC e o gene <i>TP53</i> e seus homólogos p63 e p73.....	44
1.14-	A tireoidite autoimune (TA).....	46
1.15-	A associação entre o PTC e a TA.....	50
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>56</b>
2.1	Geral.....	56
2.2	Específicos.....	56
<b>3</b>	<b>PACIENTES E MÉTODOS.....</b>	<b>58</b>

3.1	Casuística.....	58
3.2	A construção do <i>tissue microarray</i> (TMA).....	61
3.3	Imunoistoquímica.....	63
3.3.1	Anticorpos utilizados.....	63
3.3.2	Caracterização técnico-comercial dos anticorpos utilizados.....	64
3.3.3	Processamento técnico das imunocolorações.....	65
3.3.4	Avaliação microscópica da expressão proteica.....	67
3.4	Marcadores moleculares.....	69
3.4.1	Microdissecção das amostras.....	69
3.4.2	Extração do DNA e do RNA.....	70
3.4.3	Análise da mutação V600E do gene <i>BRAF</i> .....	71
3.4.4	Análise dos rearranjos RET/PTC1 e RET/PTC3.....	74
3.5	Análise estatística.....	77
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>78</b>
4.1	Casuística.....	78
4.2	Imunoistoquímica.....	79
4.3	Análise da mutaçãoV600E do gene <i>BRAF</i> .....	87
4.4	Análise dos rearranjos RET/PTC 1 e RET/PTC3.....	88
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>108</b>

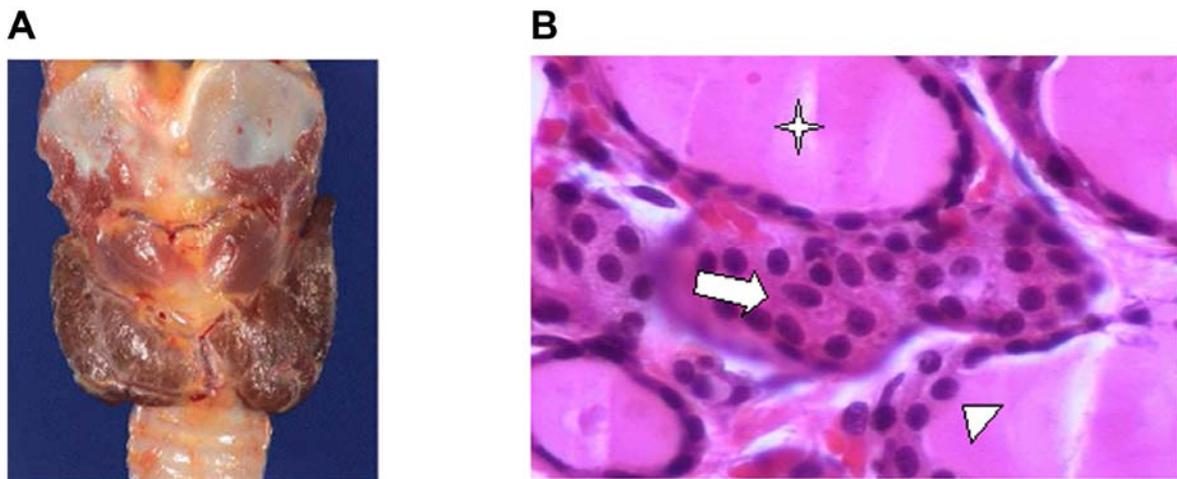
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A TIREÓIDE

O corpo humano é formado por diversos sistemas, cada um encarregado de realizar determinadas funções, que em conjunto, permitem a homeostase do organismo como um todo.

A tireóide desempenha, através dos hormônios que produz, papel fundamental no crescimento normal e no desenvolvimento do corpo humano, particularmente do sistema nervoso central. Hormônios tireoidianos requerem a glândula normalmente desenvolvida, o eixo hipotálamo-tireoideano funcionando e o aporte suficiente de iodo para que uma série de etapas bioquímicas controladas possa ocorrer no interior das células foliculares que compõem os folículos tireoideanos.

Anatomicamente, a glândula é formada por dois lobos principais, direito e esquerdo, posicionados à frente da cartilagem tireóide, unidos por uma estreita faixa de parênquima tireoideano chamada istmo (Figura 1).



**Legenda:** A - tireóide na posição anatômica normal (**Fonte:** BIDDINGER (2009a); B - no centro, provável bloco de células C (seta). Ao redor, folículos tireoideanos contendo colóide (estrela), atapetados por células foliculares preservadas (cabeça de seta).

**Figura 1** - Tireóide: topografia e aspecto microscópico

Em cerca de 50% da população, a tireóide apresenta também o lobo piramidal, fragmento adicional de tecido tireoideano unido ao istmo ou a um dos lobos principais (ARAÚJO FILHO et al. 2004).

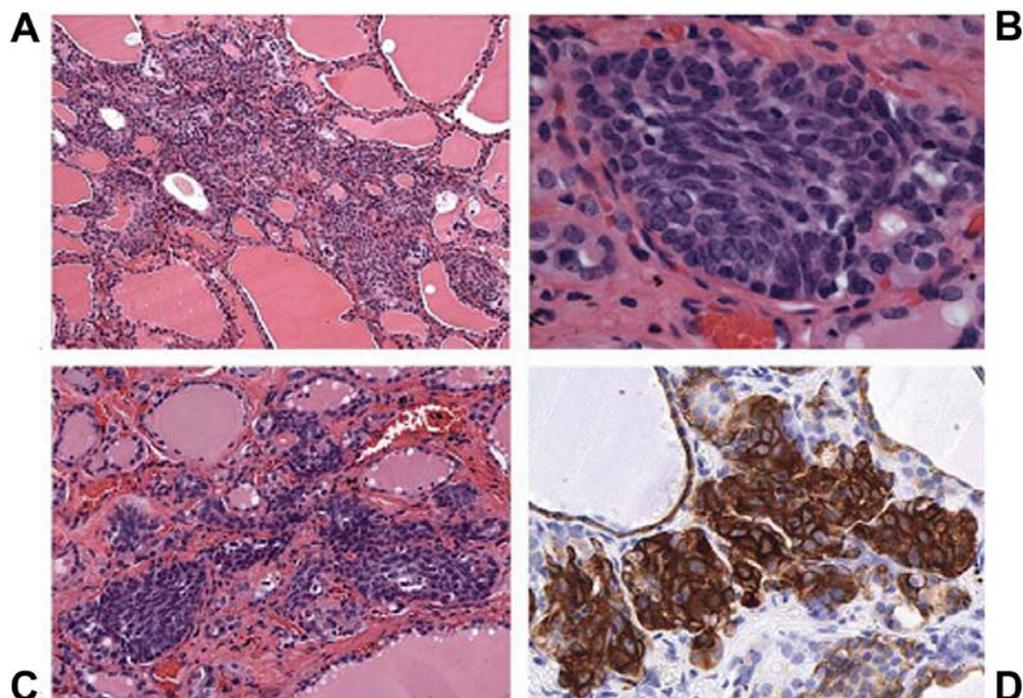
Histologicamente, a unidade básica da tireóide é o folículo, estrutura esférica que aparece nos cortes histológicos como um poliedro graças à pressão dos folículos adjacentes. Usualmente, a tireóide contém cerca de 500.000 a 1.500.000 folículos (SAAD et al. 2006). Cada 20 a 40 folículos compõem um lóbulo tireoideano. Internamente, o folículo é atapetado por uma camada única de células foliculares, cujo ápice está voltado para a luz, onde é armazenado o colóide. Este contém a tireoglobulina, uma glicoproteína iodetada, precursora da triiodotironina (T3) e da tiroxina (T4). Em meio ao colóide, podem ser achados cristais de oxalato de cálcio, que

auxiliam no diagnóstico histológico diferencial às vezes difícil entre tireóide e paratireóide (NADIG et al. 1978).

As células foliculares constituem o principal componente do parênquima tireoideano e mostram tamanho e forma variáveis de acordo com o estado funcional da glândula.

Outro componente importante da tireóide, distribuído em meio aos folículos é representado pelas células C, também chamadas parafoliculares, que representam cerca de 0,1% ou menos do peso da tireóide (CONGDON et al. 2001; HILLIER et al. 2003) e são responsáveis pela secreção de calcitonina, que controla a quantidade de cálcio no sangue (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004). As células C são identificadas microscopicamente pela demonstração imunoistoquímica de calcitonina (CHADWICK et al. 1997).

Um terceiro componente da histologia normal da tireóide são os “ninhos celulares sólidos”, agregados de células indiferenciadas de aspecto morfológico variável, ora semelhante a células escamosas, ora lembrando células transicionais, de forma poligonal ou fusiforme: alguns mostram cavidade central contendo mucina, todos apresentam forte expressão imunoistoquímica da proteína p63 (TRUEBA et al. 2005) e de citoqueratinas de alto peso molecular conhecidas como moléculas de adesão celular (CAM, do inglês *Cell Adhesion Molecules*) (Figura 2). Estes blocos celulares são esporadicamente identificados em meio aos folículos tireoideanos e correspondem a remanescentes embrionários dos corpos ultimobranquiais (KAMEDA et al. 2007), representando as células-tronco da tireóide (BYKOV 1993).



**Legenda:** Bloco de células-tronco indiferenciadas em meio a folicúlos tireoideanos. A e C – médio aumento (100X); B – grande aumento (400X); D - imunoposição de CAM-2.

**Fonte:** BIDDINGER (2009b)

**Figura 2** - Ninhos celulares sólidos

## 1.2 O NÓDULO DE TIREÓIDE

Os nódulos da tireóide são muito frequentes na população geral, sendo encontrados pela simples palpação em cerca de 20% das pessoas, cifra que sobe para 70% com o uso da ultrassonografia (EZZAT et al. 1994). Estudos realizados em indivíduos submetidos à autópsia revelam que o encontro de nódulos tireoideanos pode chegar a 50% da população (WANG e CRAPO 1997; BURGUERA e GHARIB 2000). Nódulos tireoideanos ocorrem preferencialmente em pacientes do sexo feminino, acometendo todos os grupos etários. O diagnóstico diferencial inclui diversas entidades

não-neoplásicas e neoplásicas, tanto de evolução biológica benigna, quanto maligna, algumas causando a morte do paciente (Figura 3).

O patologista tem papel preponderante no diagnóstico do nódulo tireoideano (ASA 2004), formulando o diagnóstico histopatológico que ainda é, nos dias atuais, o melhor procedimento para orientar o tratamento do paciente.



**Legenda:** Nódulo esbranquiçado bem delimitado na tireóide. O exame histológico revelou adenoma de células foliculares

**Figura 3** - Nódulo na tireóide

Algumas das entidades patológicas que ocorrem na tireóide são prontamente diagnosticadas pela simples identificação do conjunto de alterações morfológicas que as caracterizam histologicamente. Outras são controversas por apresentarem critérios morfológicos cuja interpretação pode variar de patologista para patologista (VOLANTE et al. 2007).

A preocupação maior no estudo do nódulo tireoideano é justamente afastar a presença de neoplasia maligna, que corresponde a aproximadamente 5% a 10% de todos os pacientes.

Até alguns anos atrás, além da anamnese, do exame clínico incluindo a palpação e dos exames laboratoriais, era obrigatória na semiologia do nódulo tireoideano a chamada cintilografia, que consta da administração de iodo radioativo ou tecnécio ao paciente, seguida pelo mapeamento da tireóide, que é marcada pela retenção dessas substâncias radioativas em suas células foliculares. De acordo com a quantidade de sinais radioativos emitidos, o nódulo é referido como quente, quando a quantidade de marcador é maior do que aquela presente no restante da glândula, morno para quantidades iguais e frio quando há menos marcador no nódulo do que no restante do parênquima.

Tumores malignos são encontrados em 5% dos pacientes com nódulos quentes, em 9% dos nódulos mornos e em cerca de 15% dos nódulos frios (MEIER e KAPLAN 2001). Por este motivo, todos os pacientes portadores de nódulo frio eram encaminhados à cirurgia para diagnóstico definitivo através do estudo anatomopatológico. Em alta porcentagem destas pacientes, no entanto, o estudo histológico das tireoidectomias evidenciava lesões totalmente benignas.

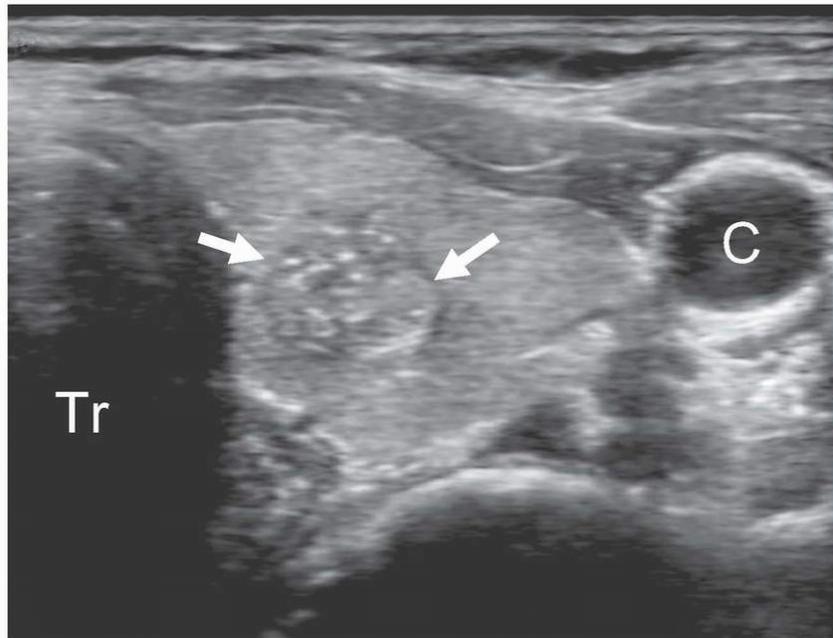
### 1.3 O NÓDULO NA TIREÓIDE E A ULTRASSONOGRRAFIA

Nos últimos anos, a ultrassonografia conquistou uma posição de destaque na semiologia dos nódulos tireoideanos, por suas características de praticidade, ausência de invasividade e boa correlação com os achados morfológicos encontrados no estudo anatomopatológico. Além de visualizar o tecido tireoideano e os nódulos presentes, a ultrassonografia permite realizar o exame das estruturas adjacentes à tireóide, tais como os linfonodos cervicais, um aspecto importante relacionado ao planejamento cirúrgico.

Os nódulos tireoideanos apresentam diferentes aspectos ultrassonográficos, resultantes da combinação de várias características, tais como a quantidade de nódulos presentes, a sua textura (sólido, misto ou cístico), ecogenicidade (isoecóico, hipoecóico ou hiperecóico), conforme a intensidade da resposta do nódulo ao estímulo sonoro, a presença ou ausência de halo hipoecóico periférico e de calcificações (macro ou microscópicas), contornos (regulares ou irregulares), calibre e aspecto dos vasos sanguíneos e relação com o parênquima tireoideano adjacente (RAGO e VITTI 2008) (Figura 4).

A ultrassonografia é um procedimento médico essencial para detectar a presença e definir as características do nódulo tireoideano, mostrando alto valor preditivo no diagnóstico de malignidade (CHAMMAS et al. 2008). Para o correto planejamento do seu tratamento, no entanto, é necessário definir a

sua natureza celular, isto é, quais são as células que o constituem e se existe algum risco de ele ser uma neoplasia maligna.



**Legenda:** Nódulo tireoideano com microcalcificações (setas), localizado entre a carótida (C) e a traquéia (Tr). Aspecto sugestivo de neoplasia maligna.

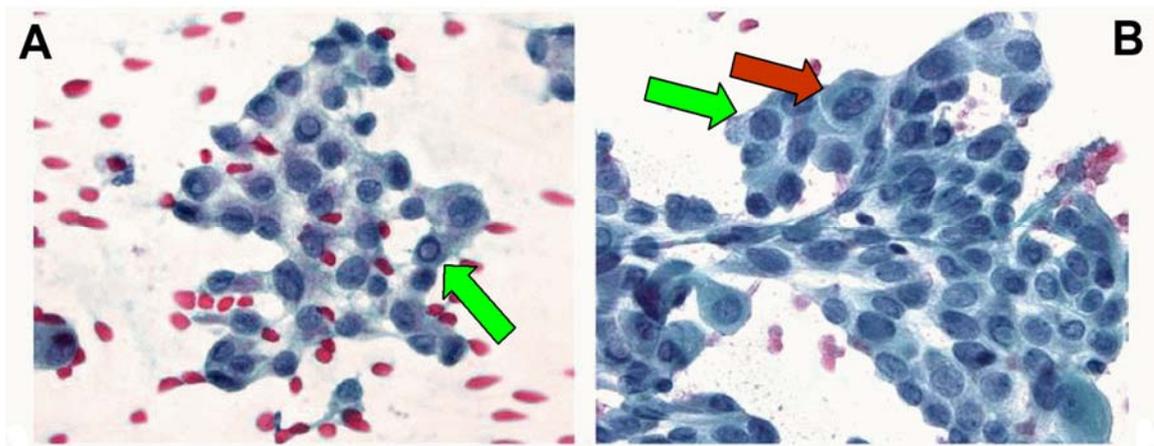
**Fonte:** NIKIFOROV e OHORI (2009)

**Figura 4** - Aspecto ultrassonográfico de nódulo tireoideano

#### **1.4 O NÓDULO DE TIREÓIDE E A PUNÇÃO ASPIRATIVA COM AGULHA FINA (PAAF)**

Ao contrário do que ocorre nas biópsias convencionais, realizadas com agulhas grossas para obtenção de fragmentos cilíndricos de tecido, procedimento chamado “core-biopsy”, a PAAF utiliza agulhas de fino calibre, que aspiram células ou pequenos blocos celulares para estudo microscópico. Este tipo de agulha provoca desconforto mínimo nos

pacientes, dispensando o uso de anestésicos. Por ser um método de fácil execução, rápido, economicamente viável e apresentar correlação bastante satisfatória com o diagnóstico anatomopatológico, a PAAF tem sido usada no mundo todo com frequência cada vez maior nos últimos anos (WU e BURSTEIN 2004). O material aspirado do nódulo tireoideano é transferido para lâminas de microscopia e submetido à coloração de Papanicolaou (PAPANICOLAOU e TRAUT 1941) (Figura 5) e diversas outras colorações especiais para estudo morfológico das células presentes.



**Legenda:** Vários critérios morfológicos permitem caracterizar o PTC em material obtido por PAAF: A - células foliculares com inclusões nucleares (seta) em meio a hemácias; B - células foliculares com cariomegalia (seta verde) e dobramentos cromatínicos (seta vermelha).

**Fonte:** NIKIFOROV e OHORI (2009)

**Figura 5** - Blocos de células diagnósticas de carcinoma papilífero da tireóide em material de PAAF.

O objetivo principal da PAAF é definir o tipo de célula que constitui o nódulo, emitir um parecer a respeito da sua natureza histológica e avaliar a necessidade de sua ressecabilidade.

Este método pode ser usado em qualquer órgão do corpo onde haja um nódulo, sendo mais frequentemente aplicado na tireóide, na mama, nos linfonodos e nas glândulas salivares. A utilização do citoaspirador, que permite a realização de vácuo na seringa utilizando-se apenas uma das mãos, popularizou o procedimento.

A PAAF teve um incremento substancial quando foi associada à ultrassonografia (punção aspirativa dirigida por ultrassom), que tornou possível posicionar a ponta da agulha e aspirar o material na região mais suspeita do nódulo. Além disso, esta nova técnica tornou possível obter material de nódulos muito pequenos, com poucos milímetros de diâmetro, ensejando o diagnóstico do carcinoma em sua fase mais inicial.

Nos casos em que a PAAF não consegue definir a natureza benigna ou maligna da patologia presente, está indicada a retirada cirúrgica do nódulo tireoideano (BALOCH et al. 2003), sendo recomendável em muitos destes casos a presença do médico anatomopatologista no momento da cirurgia, no centro cirúrgico, para realizar a chamada “biópsia de congelação”.

## 1.5 O NÓDULO DE TIREÓIDE E A BIÓPSIA DE CONGELAÇÃO

A biópsia de congelação tem por finalidade emitir um parecer sobre o provável diagnóstico histológico no momento do próprio ato cirúrgico, definindo se a natureza do nódulo é benigna ou maligna, evitando-se assim a reoperação do paciente, caso seja posteriormente diagnosticada no laboratório a presença de um câncer. Este procedimento deve ser sempre realizado no centro cirúrgico, uma vez que o equipamento necessário é simples e facilmente transportado pelo próprio médico patologista (Figura 6).



**Legenda:** Microscópio, micrótomo e material para biópsia de congelação.

**Figura 6** - Equipamento portátil para biópsias de congelação

Usualmente, o cirurgião retira o lobo tireoideano onde está localizado o nódulo suspeito, juntamente com o istmo adjacente e parte do lobo contralateral. O patologista realiza o exame macroscópico e seleciona cuidadosamente um ou mais fragmentos de tecido, que são congelados e submetidos à microtomia, obtendo-se em poucos minutos um corte histológico, que é corado e examinado microscopicamente. Na maioria das vezes, o patologista define um parecer prévio do diagnóstico com razoável grau de acerto.

Se a lesão for benigna, o cirurgião sutura os tecidos incisionados e encerra a cirurgia. Se, ao contrário, a lesão for histologicamente maligna, é realizada imediatamente a tireoidectomia total, seguida ou não pelo esvaziamento linfonodal, conforme haja ou não comprometimento dos linfonodos regionais (ANTON e WHEELER 2005).

Todo o material retirado do paciente é acondicionado em formalina (10% formol diluído de solução estoque 37% formaldeído) e encaminhado para estudo anatomopatológico convencional no laboratório, para elaboração do diagnóstico anatomopatológico definitivo.

Uma das maiores dificuldades que o patologista enfrenta ao realizar uma biópsia de congelação de tireóide (e que constitui o fator de maior limitação deste procedimento) é a presença de processo inflamatório que altera substancialmente o aspecto macroscópico da glândula, dificultando a escolha da melhor área para realizar a congelação (Figura 7). Nestes pacientes, não é raro que um parecer de “benignidade” emitido pelo patologista no momento da biópsia de congelação seja modificado

posteriormente, quando a peça cirúrgica é examinada por inteiro no laboratório, ao serem detectados um ou mais diminutos focos de carcinoma em meio ao processo inflamatório. Quase sempre, estes pacientes precisam ser novamente levados à mesa cirúrgica para totalização da tireoidectomia.



**Legenda:** Peça cirúrgica com alterações macroscópicas sugestivas de tireoidite, posteriormente confirmadas pelo exame microscópico: fibrose difusa em meio ao tecido normal, dificultando a localização do nódulo suspeito.

**Figura 7** - Lobo tireoideano e istmo com tireoidite autoimune.

Feita esta ressalva que limita o seu potencial, a biópsia de congelação, principalmente no Brasil, é um procedimento médico rotineiro bastante utilizado por cirurgiões de cabeça-e-pescoço em suas cirurgias da tireóide. Além de definir com razoável precisão a natureza benigna ou maligna do nódulo tireoideano, a biópsia de congelação é usada também para avaliação histológica das margens cirúrgicas, dando ao cirurgião a segurança de que a ressecção de um câncer foi completa. Em

procedimentos cirúrgicos realizados exclusivamente para fins diagnósticos em órgãos de difícil acesso, tais como cérebro e pulmão, a biópsia de congelação garante que o material obtido é representativo para diagnóstico anatomopatológico no laboratório.

## **1.6 O NÓDULO DE TIREÓIDE E O ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO**

Todos os materiais submetidos à biópsia de congelação devem ser posteriormente examinados no laboratório através do estudo anatomopatológico convencional, que quase sempre define o diagnóstico final e muitas vezes fornece informações necessárias para escolha do tipo de tratamento oncológico complementar a ser prescrito para o paciente portador de câncer.

O estudo anatomopatológico compreende a detecção e a interpretação das alterações morfológicas provocadas pela doença nos tecidos e suas células. O diagnóstico final deve ser sempre resultado da avaliação conjunta dos informes clínicos, dos exames laboratoriais, dos exames de imagem e dos aspectos morfológicos detectados ao estudo macro e microscópico da lesão. Fragmentos representativos de peças cirúrgicas e a totalidade dos pequenos fragmentos obtidos nas biópsias são submetidos a um processo químico com várias etapas, culminando na sua inclusão em blocos de parafina. A partir destes blocos, cortes realizados em micrótomo permitem obter fragmentos com poucos micrômetros de

espessura, os quais, além de indicarem o diagnóstico histológico através da coloração pela hematoxilina-eosina, permitem a realização do estudo imunistoquímico e de procedimentos de biologia molecular, às vezes necessários para se chegar ao diagnóstico definitivo.

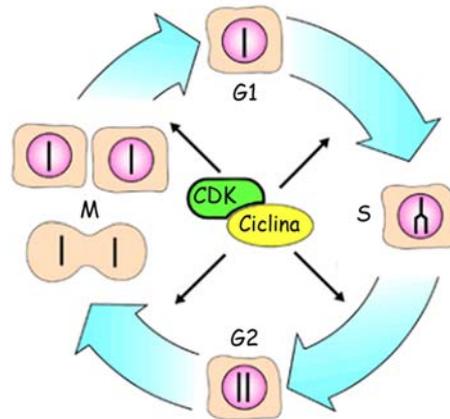
## 1.7 A BIOLOGIA MOLECULAR E O CÂNCER

Todos os seres vivos são formados por uma ou mais células, dotadas de uma mesma maquinaria para realização de suas funções vitais. As informações que permitem atingir o êxito nesta missão são armazenadas hereditariamente na forma de nucleotídeos dispostos ao longo da molécula de DNA. Este mesmo mecanismo possibilita também a perpetuação das espécies através da formação de novos indivíduos iguais aos que lhes deram origem.

Uma célula se reproduz através de uma sequência ordenada de eventos que duplicam seus componentes e depois dividem o corpo celular em duas metades iguais, idênticas à célula que lhes deu origem. Este ciclo de duplicação e divisão, conhecido como “ciclo celular” é o mecanismo básico através do qual todos os seres vivos se reproduzem (Figura 8).

Os detalhes do ciclo celular variam de organismo para organismo e em diferentes épocas na vida desse organismo. Há cinco fases no ciclo celular eucariótico padrão: **G<sub>0</sub>**, no qual a célula está desempenhando sua função no tecido e não duplica seu DNA; **G<sub>1</sub>**, quando a célula interrompe seu trabalho normal e se prepara para a síntese do DNA; **S**, que

corresponde à síntese ou replicação do DNA; **G2**, checagem do DNA recém-replicado e **M** (mitose) compreendendo a divisão do núcleo celular e depois a divisão do citoplasma, a citocinese, formando duas células-filhas idênticas.



**Legenda:** Desenho esquemático das fases do ciclo celular. Em G1, preparo para duplicação do DNA; S, duplicação do genoma; G2; células contendo o dobro do seu material genético; M, divisão celular. A progressão de todas as fases é dependente de proteínas quinases, que dependem, por sua vez, das ciclinas (CDKs).

### Figura 8 - O ciclo celular

Normalmente, a célula entra no ciclo celular como resposta a múltiplos sinais extracelulares, os quais podem causar não só a divisão da célula, como também diversos outros efeitos na biologia celular, tais como alterações na forma, no movimento, no metabolismo e na expressão gênica.

Esses sinais externos são representados por moléculas (proteicas ou lipídicas) específicas, chamadas “ligantes”, que se unem a receptores próprios localizados na célula. A função dos ligantes é converter (transduzir) um sinal externo em uma resposta interna.

Em geral, a união ligante/receptor é o primeiro de uma série de eventos que formam uma cadeia sequencial de processos intracelulares, através dos quais a mensagem é passada de um conjunto de moléculas de sinalização para outro, cada um provocando a modificação que caracteriza a próxima etapa, até que seja alcançada a resposta celular final. Essa cascata de sinalização intracelular atua como uma série de interruptores moleculares representados na sua grande maioria por proteínas.

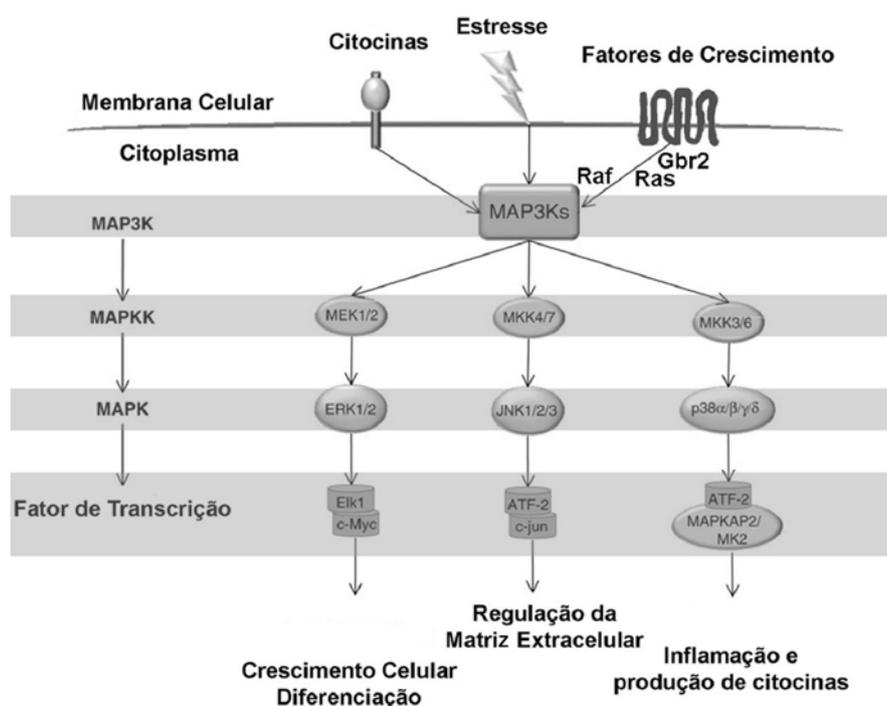
A adição de um grupo fosfato, fosforilação, tipo mais comum de modificação covalente reversível, é um meio altamente eficaz de tornar uma proteína-alvo ativa permitindo a progressão da cascata de reações necessárias à obtenção da resposta celular final.

As proteínas que catalisam estas reações são chamadas de proteínas quinases. O fosfato terminal de uma molécula de ATP é transferido a radicais específicos dos aminoácidos serina ou treonina por proteínas conhecidas como serina/treonina quinases, ou então a radicais específicos do aminoácido tirosina por tirosina quinases.

As fosfatases, por outro lado, são proteínas que revertem o efeito das quinases, catalisando a hidrólise do fosfato ligado à proteína, desta forma desativando a proteína-alvo.

A fosforilação frequentemente evoca efeitos altamente amplificados. Uma única quinase ativada pode fosforilar num curto intervalo de tempo centenas de proteínas-alvo, que, se forem outras proteína-quinases, irão amplificar exponencialmente o sinal que as ativou. Além disso, cada enzima alvo pode transformar um grande número de moléculas de substrato.

Em resumo, a rota de sinalização intracelular desencadeada por uma enzima fosforilada pela união ligante-receptor, pode ativar proteínas quinases que poderão por sua vez ativar outras enzimas, que poderão, da mesma forma, ativar proteínas implicadas na transcrição gênica, conhecidas como fatores de transcrição, que induzem a célula à resposta final (Figura 9).



**Legenda:** A família de proteínas MAPKs forma uma rede de cascatas de sinalização enzimática ativada por citocinas, estresse celular e fatores de crescimento. Essa cascata apresenta, geralmente, três níveis de envolvimento, sendo as MAP3Ks as primeiras ativadas. Em seguida, ativam as MAPKKs, que por sua vez ativam as MAPKs, estas responsáveis pela ativação de fatores de transcrição que poderão levar à proliferação e diferenciação da célula, regulação de produção de matriz extracelular ou ainda à inflamação.

**Figura 9** - Vias de sinalização intracelular das MAPKs.

O câncer, ou neoplasia maligna, é uma doença complexa, na qual as células conseguem neutralizar os controles normais de proliferação e sobrevivência celular através da aquisição de uma série de atributos biológicos que lhes permitem multiplicar-se autonomamente e disseminar-se como metástases para todo o organismo (HWANG et al. 2004).

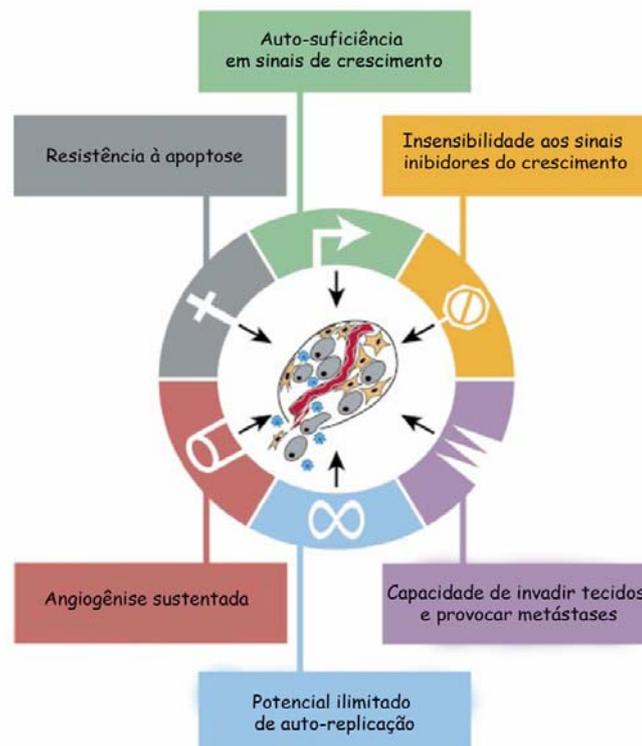
Esses atributos são adquiridos a partir de alterações no genoma, representadas por mutações que envolvem de um lado ganho de função para os proto-oncogenes, genes responsáveis por proteínas que ativam o ciclo celular e, de outro, perda de função para os genes supressores de tumor, genes responsáveis pela parada do ciclo celular (LENGAUER et al. 1998). Análises epidemiológicas mostram que são necessários de quatro a seis eventos genéticos ocorrendo em uma sequência pré-determinada para que um tumor se torne clinicamente detectável (RENAN 1993).

Os diversos genótipos que caracterizam os mais de 100 tipos de câncer na espécie humana têm como denominador comum a manifestação de seis alterações essenciais na fisiologia celular (HANAHAN e WEINBERG 2000) (Figura 10).

### **1.7.1 Auto-Suficiência em Sinais de Crescimento**

Em condições normais, os sinais que estimulam o crescimento e a proliferação das células provêm de outras células; no caso das células cancerosas, no entanto, eles são gerados na própria célula (HANAHAN e WEINBERG 2000). Este ganho de função em crescer e multiplicar-se autonomamente é devido à maior capacidade em captar sinais externos

ligados à divisão celular (LUKASHEV e WERB 1998; GIANCOTTI e RUOSLAHTI 1999), podendo modificar os respectivos circuitos bioquímicos intracelulares (MEDEMA e BOS 1993).



**Legenda:** Inter-relação de atributos celulares que permitem à célula multiplicar-se autonomamente e espalhar-se através de metástases para todo o organismo.

**Fonte:** Adaptado de HANAHAN e WEINBERG (2000).

**Figura 10** - Alterações essenciais na fisiologia celular para o desenvolvimento do câncer

A via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK, do inglês *mytogen activated protein-kinases*), das quais fazem parte as proteínas Ras, AKT-1, e ERK1/2, é um exemplo de uma via de sinalização responsável por divisão celular que, quando alterada, pode induzir o aparecimento de tumores.

### **1.7.2 Insensibilidade a Sinais Inibidores do Crescimento**

Em condições normais, o meio ambiente afeta a célula através de sinais que desencadeiam diversas respostas celulares, dentre elas a ativação do ciclo celular, como comentado anteriormente. Alguns destes sinais levam a célula da fase G1 para a fase S, outros a tornam quiescente (permanência em G1) e outros ainda fazem com que elas evoluam para um estado pós-mitótico irreversível de amadurecimento e diferenciação, impedindo definitivamente a sua multiplicação. Praticamente todos os sinais antiproliferativos confluem para a via de sinalização da proteína do retinoblastoma (pRb) e seus derivados, p107 e p130, moléculas que estão fortemente relacionadas à retenção da proteína E2F, fator de transcrição responsável pela transição da célula de G1 para S. Assim, pRb bloqueia a proliferação celular, seqüestrando E2F (WEINBERG 1995). Contrariando esse mecanismo muito eficiente no controle da proliferação celular, em muitas neoplasias malignas ocorre ruptura desta via de sinalização de pRb por diversos mecanismos, todos levando à liberação de E2F e, portanto, à proliferação celular exacerbada (HANNON e BEACH 1994).

### **1.7.3 Resistência à Apoptose - Escape da Morte Celular Programada**

A homeostase em organismos multicelulares depende de um balanço entre a proliferação e a morte das suas células. A apoptose, um tipo de morte celular programada, ocorre através de um programa celular aprimorado pela evolução biológica, eliminando células que preencham uma ou mais das seguintes características: 1- não são mais necessárias para que

o órgão ao qual pertencem possa exercer satisfatoriamente a sua função; 2- foram produzidas em excesso; 3- desenvolveram-se inapropriadamente; 4- estão infectadas; ou 5- foram acometidas por danos genéticos irreparáveis.

A apoptose, além de ser um processo celular normal que ocorre durante o desenvolvimento de um tecido adulto, representa também uma resposta celular fisiológica necessária aos numerosos estímulos nocivos que chegam à célula. A morte celular por apoptose é um processo ativo, dependente de energia, caracterizado morfológicamente por: 1- ruptura do citoesqueleto; 2- retração do corpo celular; 3- condensação da cromatina; 4- fragmentação nuclear; 5- formação de bolhas na membrana citoplasmática e 6- fragmentação do DNA (THOMPSON 1995). Na apoptose, não há ruptura da membrana celular, portanto o conteúdo citoplasmático não entra em contato com os tecidos do estroma ao redor da célula, o que explica a ausência dos fenômenos inflamatórios de tipo corpo estranho que poderiam ocorrer.

Em mamíferos, a apoptose é coordenada por uma família de proteínas chamadas “caspases”. Para realizar a apoptose e mantê-la sob controle, as células contêm procaspases inativas (procaspases 8 e 9), ditas caspases iniciadoras e também procaspases efetoras (procaspases 3, 6 e 7) (OKADA e MAK 2004), as quais, uma vez ativadas por oligomerização, convertem-se em caspases efetoras (SALVESEN e DIXIT 1997). Estas, uma vez ativadas, começam a clivar substratos específicos da célula, tanto no citoplasma quanto no núcleo, compondo assim o quadro morfológico e bioquímico que caracteriza a apoptose (THORNBERRY 1998).

Há duas vias de ativação das caspases, a extrínseca e a intrínseca. A via extrínseca envolve receptores de morte localizados na membrana celular através da fusão com seus ligantes específicos, o Fas-L (CD95-L) para o receptor Fas e o TNF para o receptor TNFR; esta fusão forma o complexo de sinalização de morte induzida (DISC, do inglês *death-induced signalling complex*). Este complexo recruta caspase 8, que inicia a cascata de sinalização (BUDIARDJO et al. 1999).

A via intrínseca de apoptose depende de diversos fatores intra e extracelulares, tais como ausência de fatores de crescimento, hipóxia, dano ao DNA e indução por oncogenes (OKADA e MAK 2004). Os sinais transduzidos por estes estímulos convergem para a mitocôndria numa série de eventos bioquímicos que resultam em: 1- permeabilização da sua membrana externa; 2- liberação de citocromo c e de outras proteínas proapoptóticas (KLUCK et al. 1999); 3- formação do apoptosomo, um grande complexo protéico contendo citocromo c, caspase 9 e APAF1 (do inglês *apoptotic protease activating factor*) e 4- a ativação das caspases (Figura 11).

A família de proteínas Bcl-2, que regula a liberação de citocromo c pela mitocôndria, é formada por alguns membros pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bid, Bim) e por outros membros anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W). O gene supressor de tumor *TP53* pode desencadear a apoptose promovendo a superexpressão de Bax, tendo como consequência a liberação de citocromo c.

A proteína Fas (CD95) é um receptor transmembrana que, quando ativado pela fusão com seu ligante, o Fas-L, recruta uma molécula adaptadora, chamada FADD (do inglês, *Fas-associated death domain*) (SCHULZE-OSTHOFF et al. 1998). FADD recruta procaspase 8, que se converte a caspase 8, num modelo chamado “indução por proximidade”, ao se aproximar da membrana plasmática (MUZIO et al. 1998; SALVESEN e DIXIT 1999).

No Carcinoma Papilífero da Tireóide (PTC, do inglês *Papillary Thyroid Carcinoma*) associado à tireoidite autoimune (TA), ao invés de recrutar procaspase 8 e assim desencadear a apoptose da célula folicular, ocorre uma ligação cruzada com outra proteína, a chamada FLIP (do inglês *Fas-like inhibitory protein - interleukin 1 beta*) (IRMLER et al. 1997), que impede a apoptose nas células neoplásicas. Além de impedir a apoptose, Fas ativa a via de sinalização de ERK, estimulando a proliferação da célula neoplásica (MITSIADES et al. 2006).

Mais de 50% dos tumores humanos apresentam uma mutação no gene *TP53* (HARRIS 1996), levando à perda de seus componentes pró-apoptóticos (ARSCOTT et al. 1999), o que pode ser evidenciado por imunohistoquímica.

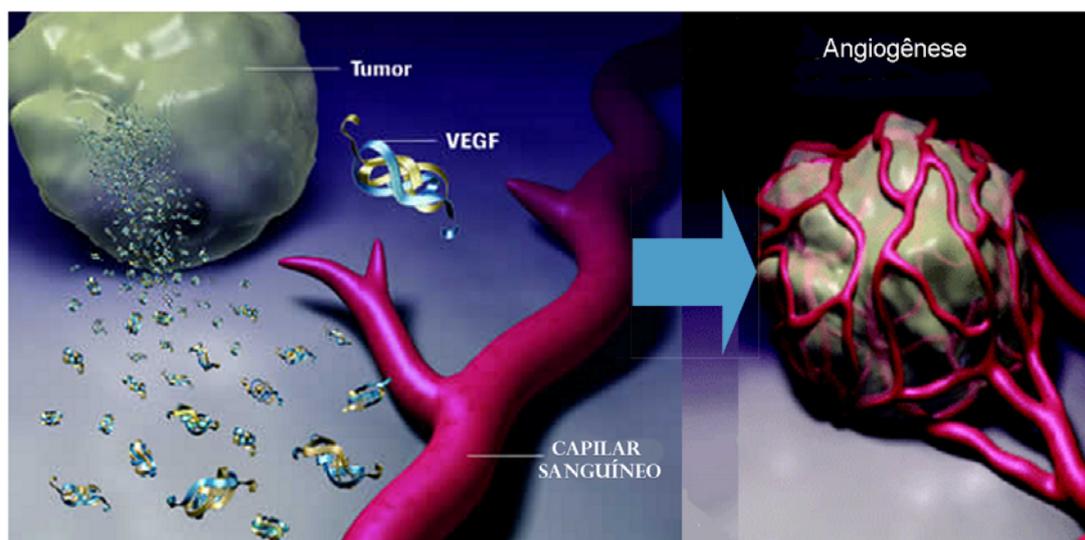


caracterizada por maciça morte celular, desarranjo no cariótipo e fusão das extremidades dos cromossomos. Nesta fase de crise, pode ocorrer o aparecimento de uma variante celular que adquire a capacidade ilimitada de auto-replicar-se, condição chamada de imortalização celular (WRIGHT et al. 1989). Estima-se que apareça uma célula imortalizada a cada 10.000.000 de células em crise. Muitas das células neoplásicas malignas cultivadas *in vitro* tornam-se imortalizadas, o que permite concluir que o potencial ilimitado de replicação é uma das características essenciais das neoplasias malignas. Esta atividade proliferativa pode ser avaliada através do estudo imunohistoquímico da proteína Ki-67, presente na célula durante todo o ciclo de divisão celular, mas ausente na fase G0.

#### **1.7.5 Angiogênese Sustentada**

No corpo humano, cada célula pode localizar-se a uma distância máxima de 100 micrômetros de um vaso sanguíneo, limite além do qual ela deixa de receber o aporte de oxigênio necessário para manutenção da sua homeostase. Nas fases iniciais, o crescimento dos tumores é bastante limitado porque suas células não possuem capacidade angiogênica. Se as células neoplásicas, durante sua multiplicação, distanciarem-se da rede vascular, suas células entrarão em sofrimento e poderão chegar à morte por falta de oxigênio, o fator mais importante para a ativação da apoptose. O aparecimento de novos vasos sanguíneos é um pré-requisito para que haja uma rápida expansão do tumor, fenômeno desencadeado pelo Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF, do inglês *vascular endothelium*

*growth factor*) (BOUCK et al. 1996; HANAHAN e FOLKMAN 1996) (Figura 12).



**Legenda:** As células tumorais, durante sua multiplicação, liberam VEGF, proteína responsável por estímulos angiogênicos. O aparecimento de novos vasos sanguíneos, trazendo à célula maior aporte de oxigênio, é um importante quesito para expansão tumoral.

**Fonte:** Roche

**Figura 12** - Angiogênese tumoral.

A trombospondina é um inibidor da vascularização e sua produção está sob controle direto do gene *TP53*. Com a inativação deste gene nos processos neoplásicos, haverá menor quantidade de trombospondina e, portanto, fica liberada a angiogênese (DAMERON et al. 1994). Além disso, a ativação do oncogene *RAS*, cuja expressão pode ser avaliada pela demonstração imunistoquímica da proteína Ras (proteínaquinase relacionada à proliferação celular), também estimula VEGF (RAK et al. 1995) e portanto a angiogênese. Um quarto mecanismo que contribui para a angiogênese é a ação das proteases que atuam diretamente na matriz

extracelular e liberam os agentes proangiogênicos aí presentes (WHITELOCK et al. 1996).

#### **1.7.6 Capacidade de Invadir Tecidos e Provocar Metástases**

Noventa por cento das mortes causadas por câncer são devidas a focos de metástases transportadas pelo sangue e/ou linfa e implantadas em órgãos distantes do foco primário (SPORN 1996). Usualmente, as células epiteliais permanecem unidas entre si e fixas nos tecidos graças a moléculas protéicas responsáveis pela adesão célula-célula e pela adesão célula-matriz extracelular, tais como CAM, as integrinas e a E-caderina (APLIN et al. 1998). A aderência célula-célula através de pontes de E-caderina resulta na transmissão de sinais anticrescimento através da via da beta catenina, que os repassa para diversas vias intracelulares de sinalização envolvendo o fator de transcrição Lef/Tcf (do inglês *lymphoid enhancer-binding factor / T cell factor*). A importância da via de sinalização que envolve as proteínas E-caderina e beta catenina no estudo de uma neoplasia pode ser dimensionada através da pesquisa imunistoquímica das proteínas correspondentes. Em muitos tumores, esta função da E-caderina mediada pela beta catenina é silenciada por mutações nos respectivos genes, o que facilita a invasão dos tecidos pelas células malignas. Além desse mecanismo, a via Wnt tem um importante papel na regulação da sinalização via beta catenina. As proteínas sinalizadoras da família Wnt regulam numerosos processos no desenvolvimento da célula animal, tais como estímulo mitótico, diferenciação, alterações na polaridade e adesão celular

(NUSSE 2005). Ao se ligar a receptores específicos na membrana plasmática, Wnt eleva os níveis de beta catenina citoplasmática, através da inibição de proteínas como a caseína quinase e GSK-3, que, juntamente com APC e Axina, sequestram beta catenina livre no citoplasma, controlando assim o crescimento celular (POLAKIS 2000; EISENMANN 2005).

## 1.8 O CÂNCER DA TIREÓIDE – O CARCINOMA PAPILÍFERO

A maior parte das neoplasias malignas da tireóide se origina nas células foliculares. De acordo com o aspecto histológico e o comportamento clínico, os tumores malignos derivados das células foliculares são classificados em carcinomas bem diferenciados, carcinoma pouco diferenciado e carcinoma anaplásico (indiferenciado) (DELELLIS e WILLIANS 2004).

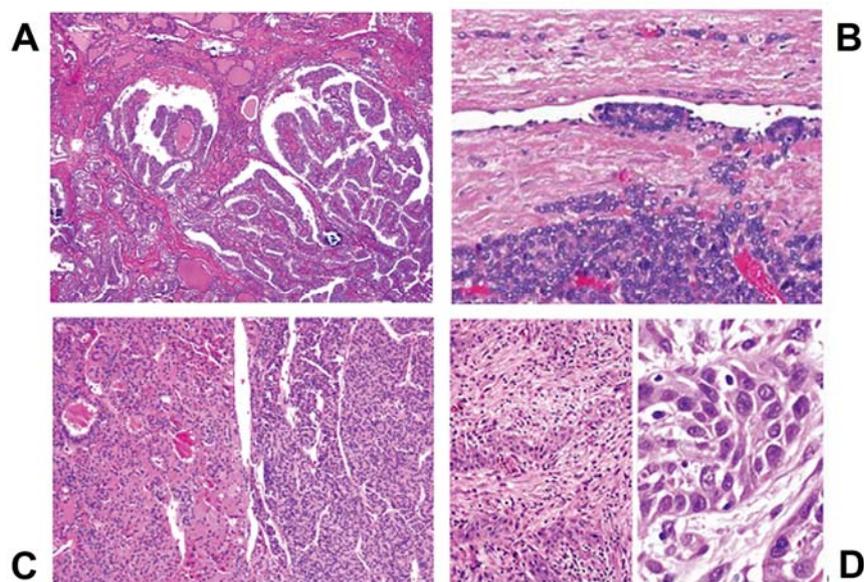
Os carcinomas bem diferenciados compreendem o Carcinoma Papilífero da Tireóide (PTC, do inglês *papillary thyroid carcinoma*) e o Carcinoma Folicular da Tireóide (FTC, do inglês *follicular thyroid carcinoma*), este último com suas duas variantes, a convencional e o carcinoma oncocítico. O PTC, por sua vez, pode ser subclassificado de acordo com o aspecto histológico em diversas variantes (ROSAI 2004b).

O PTC apresenta disseminação metastática por via linfática e sua evolução costuma ser lenta e insidiosa; quase sempre, pode ser totalmente curado pela tireoidectomia total (SCLAFANI et al. 1993), seguida ou não da ablação do parênquima tireoideano residual através do iodo radioativo.

Alguns casos, no entanto, mostram evolução desfavorável, invadem os tecidos vizinhos e provocam metástases à distância, não havendo nos dias atuais uma forma realmente eficaz para o tratamento desta situação.

O carcinoma anaplásico (indiferenciado) é altamente agressivo e geralmente leva o paciente à morte cerca de 1 ano após o diagnóstico.

O carcinoma pouco diferenciado é enquadrado tanto morfológica como clinicamente numa posição intermediária entre os carcinomas bem diferenciados e o anaplásico (KONDO et al. 2006). Recentemente, foram propostos critérios para sua melhor caracterização (VOLANTE et al. 2007) (Figura 13).

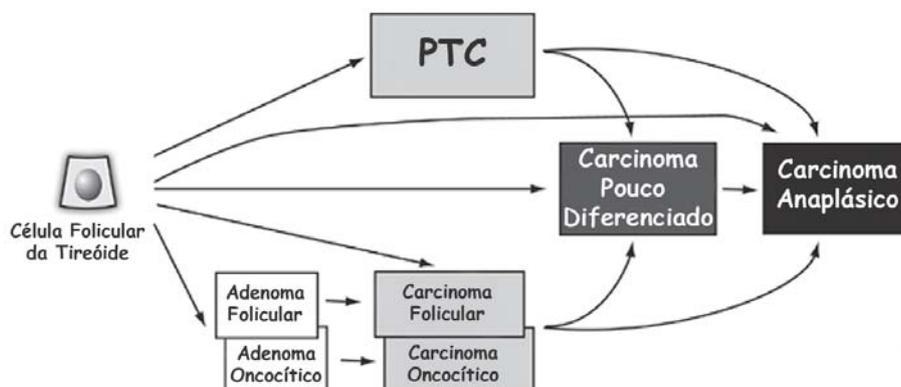


**Legenda:** Os vários tipos de carcinoma da tireóide; A - carcinoma papilífero bem diferenciado; B - carcinoma folicular bem diferenciado; C - carcinoma pouco diferenciado; D - carcinoma anaplásico (fotomicrografia à direita mostrando detalhes das células neoplásicas em maior aumento).

**Fonte:** NIKIFOROV e OHORI (2009)

**Figura 13** - Tipos de carcinomas da tireóide

A teoria de progressão sequencial dos tumores, segundo a qual os carcinomas bem diferenciados podem transformar-se inicialmente em lesões pouco diferenciadas e depois chegar ao carcinoma anaplásico (indiferenciado) é validada pela existência de pacientes portadores de tumores com áreas mais e menos diferenciadas associadas a uma raiz comum de alterações genéticas (VAN DER LAAN et al. 1993).



**Legenda:** Esquema mostrando possível progressão, associada à desdiferenciação celular nos tumores originados nas células foliculares da tireóide. Segundo a literatura, qualquer um deles pode progredir para o carcinoma pouco diferenciado e para o carcinoma indiferenciado (anaplásico), além de poder provocar o aparecimento de metástases à distância.

**Fonte:** NIKIFOROV e OHIRI (2009).

**Figura 14** - Patogênese do carcinoma originado nas células foliculares da tireóide

O PTC corresponde a 80% dos carcinomas bem diferenciados e é diagnosticado microscopicamente através de características morfológicas arquiteturais e celulares específicas. É a neoplasia maligna mais frequente do sistema endócrino (HUNDAHL et al. 1998; PARKIN et al. 2005). A incidência do PTC tem aumentado significativamente de maneira constante

em todo o planeta, nas últimas décadas (AKSLEN et al. 1990; LIU et al. 2001; BURGESS 2002; LEENHARDT et al. 2004; DAVIES e WELCH 2006). Nos Estados Unidos, nos últimos trinta anos, sua incidência triplicou de 2,7 para 7,9 por 100.000 habitantes (ALBORES-SAAVEDRA et al. 2007).

Dentre os motivos que explicam esse incremento substancial na incidência do PTC, está o uso generalizado da punção aspirativa com agulha fina dirigida pela ultrassonografia, que conta com transdutores cada vez mais aperfeiçoados, além do melhor reconhecimento da variante folicular do PTC (SUSTER 2006).

Os agentes etiológicos implicados na gênese do PTC são: 1- Radiação ionizante: tanto a terapêutica para tumores de cabeça e pescoço (RON et al. 1995), quanto a exposição acidental. O acidente ocorrido em Chernobyl provocou o aparecimento de PTC em mais de quatro mil crianças e adolescentes superexpostos à radiação. Nestes pacientes, o tempo mais curto decorrido entre a exposição e o diagnóstico foi de 4 anos, porém o risco de desenvolver a doença permanece elevado por 40 anos ou mais (NIKIFOROV 2006a); 2- Suplementação de iodo na dieta. Em regiões com deficiência grave de iodo, foi demonstrado por vários artigos científicos que a sua suplementação pelo uso de sal iodado foi acompanhada, de um lado, por uma redução na prevalência do FTC e do carcinoma anaplásico da tireóide e, de outro, por um aumento estatisticamente significativo na prevalência do PTC (HARACH et al. 2002; WILLIAMS et al. 1977); 3- Tireopatia pré-existente: Pacientes com nódulo único na tireóide mostram incidência 27 a 29 vezes maior de PTC quando comparados a pacientes

sem nódulo tireoideano; se os nódulos forem múltiplos, a incidência maior da neoplasia diminui para 6 a 9 vezes em relação à população normal (FRANCESCHI et al. 1999); 4- Fatores hereditários: Descendentes de pacientes portadores de PTC mostram incidência aumentada entre 5 a 9 vezes em relação ao restante da população (HEMMINKI et al. 2005). O PTC hereditário corresponde aproximadamente a 5% do total de casos, distribuídos em dois grupos de pacientes, aqueles que apresentam associação de PTC com neoplasias múltiplas e aqueles com pouco ou nenhum risco de desenvolver outras neoplasias. Nos pacientes do primeiro grupo, a associação mais conhecida é com a polipose adenomatosa familiar, doença autossômica dominante causada por uma mutação germinativa do gene *APC* (gene supressor de tumor que controla, entre outras, a atividade de beta-catenina). Em geral, estes pacientes têm em torno de 30 anos e a distribuição pelo sexo é de 8 mulheres para cada homem afetado pela síndrome (PLAIL et al. 1987; BULOW et al. 1988). No segundo grupo, os pacientes apresentam associações mais raras, dentre as quais temos: a- complexo de Carney (BOIKOS e STRATAKIS 2006), doença autossômica dominante, caracterizada por mixomas no coração e no tórax, hiperpigmentação da pele e hiperatividade endócrina (CARNEY et al. 1985); b- síndrome de Werner (ISHIKAWA et al. 1999), doença autossômica recessiva rara, caracterizada por encurtamento do telômero, que leva ao envelhecimento precoce (OZGENC e LOEB 2005).

A natureza hereditária do PTC é estabelecida convencionalmente quando numa mesma família 3 ou mais parentes de primeiro grau

desenvolvem a doença; famílias com 1 ou 2 membros afetados têm chance igual à da população geral para desenvolver carcinoma esporádico ou hereditário (CHARKES 1998, 2006). PTC familiar mostra hereditariedade autossômica dominante com penetração incompleta, que aumenta com a idade (BURGESS et al. 1997; MALCHOFF e MALCHOFF 2006), costuma ser multifocal e coexistir com múltiplos nódulos benignos da tireóide (UCHINO et al. 2002).

A exposição da tireóide aos fatores etiológicos do carcinoma provoca uma instabilidade cromossômica, predispondo a célula folicular às mutações que constituem as alterações genéticas precoces ou eventos de iniciação (VIGLIETTO et al. 1995). Posteriormente, sobrevêm as alterações genéticas tardias (eventos de progressão, citados no item 1.6 desta introdução).

## **1.9 A PATOGÊNESE MOLECULAR DO PTC**

Embora os PTCs sejam de origem monoclonal, isto é, as células neoplásicas provêm de uma só célula inicial (KIM et al. 1998), estudos moleculares evidenciam que múltiplos focos de PTC encontrados num mesmo paciente em geral mostram origens clonais distintas. Isto equivale a dizer que diferentes focos de tumor na mesma tireóide não representam uma disseminação intraparenquimatosa de um clone único, mas sim diversos tumores primários (SHATTUCK et al. 2005). Outro fato que corrobora este achado é que diferentes nódulos tumorais freqüentemente mostram alterações genéticas diversas, tais como diferentes estruturas da proteína

RET (codificada pelo proto-oncogene *RET* que, quando associada a PTC, é conhecida como *RET/PTC*) e também variações na mutação de *BRAF* (SUGG et al. 1998; PARK et al. 2006).

Em relação à ploidia, o PTC mostra conteúdo de DNA preservado, com aneuploidia presente em apenas 10% dos pacientes, proporção muito menor do que aquela encontrada nos FTCs e menor até mesmo do que aquela encontrada nos adenomas foliculares da tireóide (JONASSON e HRAFNKELSSON 1994). A maioria dos PTCs mostra cariótipo normal, variando de 20 a 40% a porcentagem dos pacientes que apresentam alterações citogenéticas (HERRMANN et al. 1991; ROQUE et al. 2001). Tais alterações podem ser numéricas ou estruturais. As primeiras envolvem alteração no número de cromossomos (a mais comum é a perda do cromossomo Y e ganho do cromossomo 17, cuja trissomia, alteração genética mais frequente, está presente na variante folicular do PTC) (FRAU et al. 2008). Das alterações estruturais, a mais comum é a inversão encontrada nos rearranjos *RET / PTC1* e *RET / PTC3*.

Casos isolados de translocação envolvendo quebras de cromossomo em 1p32-36, 1q22, 3p25-26 e 7q32-36 têm sido relatados (ZITZELSBERGER et al. 1999; ROQUE et al. 2001).

Através da técnica da hibridização genômica comparativa (CGH, do inglês *Comparative Genomic Hybridization*), têm sido detectados desequilíbrios cromossômicos em cerca de 40% dos pacientes portadores de PTC, número maior nas variantes histológicas mais agressivas da doença

(KJELLMAN et al. 2001; WREESMANN et al. 2004; RODRIGUES et al. 2007).

No PTC, a perda da heteroziguidade, resultado da deleção de pequenas regiões do cromossomo nas quais podem residir importantes genes supressores de tumor, é um evento pouco frequente (SOBRINHO-SIMÕES et al. 2005). Uma metanálise evidencia apenas 2,5% de perda da heteroziguidade no PTC, contra 20% detectados no FTC (WARD et al. 1998).

A patogênese do PTC está baseada na alteração de múltiplas vias de sinalização da célula folicular, das quais a mais importante é a via das MAPKs, que regula o crescimento, diferenciação e sobrevivência das células foliculares (ROBINSON e COBB 1997). A ativação exacerbada desta via na célula folicular pode ser a consequência de mutações pontuais nos genes *BRAF* e *RAS* e também de rearranjos cromossômicos nos genes *RET/PTC* e *NTRK1* (NIKIFOROV e OHORI 2009). Cerca de 70% dos pacientes portadores de PTC mostram pelo menos um destes eventos genéticos, sendo rara a concomitância de duas ou mais mutações (KIMURA et al. 2003; SOARES et al. 2003; FRATTINI et al. 2004).

As mutações guardam estreita correlação com propriedades biológicas específicas, por exemplo, os rearranjos cromossômicos no gene *RET* e no gene *PPAR $\gamma$*  (do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) estão presentes respectivamente no carcinoma papilífero (GRIECO et al. 1990) e no carcinoma folicular (KROLL et al. 2000).

Quanto ao PTC, os eventos moleculares iniciais que mais provavelmente parecem conduzir ao seu aparecimento são as mutações pontuais nos genes *BRAF* e *RAS* e os rearranjos cromossômicos nos genes *RET* e *TRK* (KROLL 2004).

Cerca de 70% dos PTCs apresentam pelo menos uma destas alterações genéticas, que influenciam diretamente a transdução de sinal na via das MAPKs, afetando as proteínas quinases ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), PI3K (*phosphoinositide-3 kinase*), MAPK p38 e c-JUN-quinase (ou MAPK8) (BARRIL et al. 1999; SANTORO et al. 2002).

Em relação ao perfil da expressão gênica do PTC, o uso de *microarrays* de cDNA de alta densidade permitiu chegar às seguintes conclusões: 1- O perfil de expressão gênica do PTC é diferente daquele apresentado pelo FTC e por outros tipos de tumor (HUANG et al. 2001; CHEVILLARD et al. 2004; FINLEY et al. 2004), fato que confere maior consistência à presente classificação histológica dos tumores da tireóide, preconizada pela Organização Mundial da Saúde-OMS (DELELLIS e WILLIAMS 2004); 2- parece que os múltiplos perfis de expressão gênica apresentados pelas variantes de PTC com mutações nos genes *BRAF*, *RET/PTC*, *RAS* e *TRK* (receptores tirosina quinases) já podem ser individualmente detectados, abrindo-se assim uma perspectiva molecular para uma nova classificação de PTC, baseada na avaliação conjunta dos padrões fenotípico e biológico com as mutações específicas (FRATTINI et al. 2004; GIORDANO et al. 2005); 3- o estudo dos arranjos de expressão gênica confirmou a superexpressão de vários genes sabidamente hiper-

regulados no PTC, tais como o *MET* (*mesenchymal-epithelial transition factor*), *LGAL3* (galectina 3) e *KRT19* (citoqueratina 19) (NIKIFOROV e OHORI 2009).

Outros achados genéticos no PTC revelam baixa expressão dos genes responsáveis pelas funções específicas da célula folicular, tais como a síntese do hormônio tireoideano e o estímulo de genes envolvidos na adesão, mobilidade e interação célula-célula, além de alterações nos genes que codificam citoqueratinas e outras proteínas envolvidas na resposta imunológica (CHEVILLARD et al. 2004).

Quanto às alterações na expressão de microRNAs no PTC, o perfil de expressão é específico, diverso daquele encontrado no FTC e em outros tumores da tireóide (NIKIFOROVA et al. 2008).

### **1.10 O PTC E O GENE *BRAF***

A mutação do gene *BRAF*, caracterizada pela substituição de timina por adenosina no nucleotídeo 1799 (T1799A) éxon 15, é a alteração genética mais frequente no PTC, levando à substituição da valina pelo glutamato no códon 600 (V600E) (KIMURA et al. 2003; SOARES et al. 2003). O proto-oncogene *BRAF* está situado no cromossomo 7q24 e codifica uma serina/treonina quinase que atua na cascata Ras-Raf-MEK-ERK (ver Figura 15 mais abaixo). Esta mutação leva a um ganho de função, representado pela criação de uma via alternativa na sinalização de ERK, também envolvida na tumorigênese de outras neoplasias, tais como

melanomas e adenocarcinomas de cólon (NUNES 2002). Esta mutação pontual ocorre quase que exclusivamente nos PTCs que mostram arquitetura papilar ou mista papilar/folicular (MAGALHÃES 2002).

As mutações do *BRAF* são tipicamente encontradas nas variantes clássica e de células altas do PTC, sendo raras na variante folicular (NIKIFOROVA et al. 2003; KIMURA et al. 2003). No PTC, podem ser encontradas em 29% a 69% dos casos, em cerca de 13% dos carcinomas pouco diferenciados e também em 35% dos carcinomas anaplásicos (PUXEDDU e FAGIN 2001; NUNES 2002). As mutações de *BRAF* são associadas a características clínicas mais agressivas, tais como extensão extracapsular, recidivas mais freqüentes e metástases à distância (XING 2007), graças à superexpressão de VEGF e de metaloproteinases (PALONA et al. 2006), alterações que em geral estão também presentes. Além desses efeitos no PTC, a mutação de *BRAF* predispõe o tumor à perda de diferenciação, com possível transformação para carcinoma anaplásico (NIKIFOROVA et al. 2003; KIMURA et al. 2003; NAMBA et al. 2003). A pesquisa desta mutação na variante de células altas do PTC mostra prevalência em 100% dos casos (MAGALHÃES 2002).

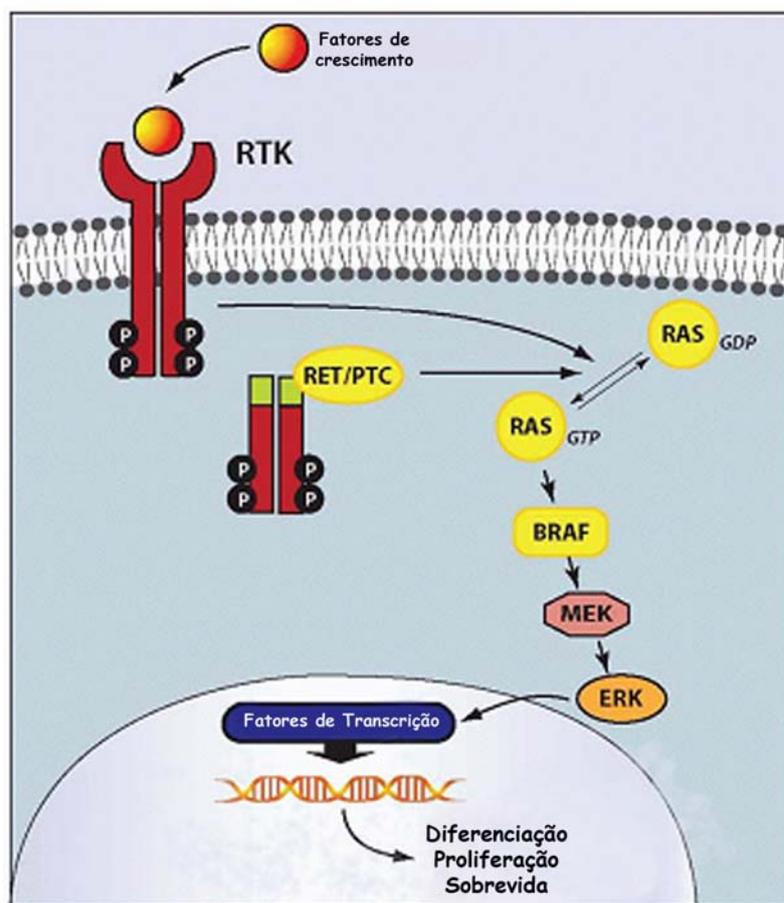
### **1.11 O PTC E O GENE *RET***

O proto-oncogene *RET* está localizado no braço longo do cromossomo 10q11.2 e contém 21 éxons, codificando doze isoformas proteicas alternativas, das quais uma atua como um receptor tirosina

quinase ancorado na membrana celular (TAKAHASHI 1988; NIKIFOROV 2009). Este receptor apresenta três domínios distintos: um domínio extracelular contendo um sítio para acoplamento com o ligante, um domínio transmembrana e um domínio intracelular incluindo uma região citoplasmática com atividade de proteína tirosina quinase. Os ligantes dos receptores RET são fatores neurotróficos da família dos Fatores Neurotróficos derivados de células da Glia (GDNF, do inglês *glial derived neurotrophic factor*), neutrolina, artemina e persefina. O acoplamento com o ligante provoca a dimerização do receptor, o que leva à autofosforilação da proteína em resíduos tirosina, ativando a cascata de sinalização intracelular (NIKIFOROV e OHORI 2009) (Figura 15).

Em condições normais, o *RET* tipo selvagem (não mutado) não é expresso nas células foliculares, sendo detectado apenas nas células C (parafoliculares) da tireóide. Se houver fusão do gene *RET* com outros genes, forma-se o oncogene chamado *RET/PTC*, que se torna ativado e constitutivamente expresso nas células foliculares (NIKIFOROV 2004).

O rearranjo *RET/PTC* é encontrado em cerca de 20% dos PTCs esporádicos em adultos, mas esta frequência depende de diferenças geográficas e da sensibilidade das diferentes técnicas utilizadas para sua detecção (TALLINI e ASA 2001; NIKIFOROV 2002; ZHU et al. 2006).



**Legenda:** Fisiologicamente, a ligação de fatores de crescimento a RTKs (receptores tirosina quinase) resulta na ativação da via de MAPKs responsáveis pela proliferação celular. O gene quimérico *RET/PTC* ativa constitutivamente essas vias, levando a célula a uma total independência dos fatores externos de crescimento.

**Fonte:** NIKIFOROV e OHORI (2009).

**Figura 15** - Esquema de via de sinalização ativada por RET e RET/PTC.

Ele é encontrado com maior frequência em crianças e adultos jovens com história de exposição à radiação ionizante (BOUNACER et al. 1997; RABES et al. 2000) e pode ser resultado da rejunção anômala de seqüências de DNA fragmentado pela ação direta da radiação, segundo autores que utilizaram a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH, do inglês *Fluorescence In Situ Hybridization*) (NIKIFOROVA et al. 2000).

Doze diferentes rearranjos *RET/PTC* já foram descritos, sendo o *RET/PTC 1* ou *H4* (*CCDC6-RET*) e o *RET/PTC 3* (*ELE1-PTC*) os mais comuns nos carcinomas papilíferos esporádicos da tireóide (NIKIFOROV e OHORI 2009). Estes rearranjos constituem exemplo de inversões paracêntricas, isto é, estão localizados apenas em um dos braços do cromossomo, não atingindo o centrômero. Ambos os genes que se fundem, o *RET* e o seu parceiro de fusão, o *H4* (*ELE1*) no caso do *RET/PTC1* e o *NCOA4* (*RFG*) no caso do *RET/PTC3*, residem no braço longo do cromossomo 10 (GRIECO et al. 1990; SANTORO et al. 1994; BONGARZONE et al. 1994; FUGAZZOLA et al. 1996).

Os diversos tipos de rearranjo *RET/PTC* parecem estar relacionados às diferentes variantes histológicas do PTC, correspondendo a variante clássica ao rearranjo *RET/PTC1* e a variante folicular, ao rearranjo *RET/PTC3*. A frequência destes rearranjos varia amplamente em populações de diferentes países, submetidas a diferentes fatores de risco (HOFF et al. 2000; MACIEL 2001).

Por outro lado, o encontro deste rearranjo em microcarcinomas (por definição, PTCs de diâmetro máximo inferior ou igual a 1 cm) permite supor que a sua presença seja um evento iniciador (MACIEL 1992), ao passo que a presença de múltiplos tipos de rearranjo em tumores maiores sugere eventos tardios (BRANDI et al. 2001; MACHENS et al. 2001).

Estes rearranjos são raros em carcinomas anaplásicos, indicando sua possível não-participação na progressão tumoral, embora haja poucos

estudos na literatura focalizando este tema (TAKAHASHI et al. 1985; PUNALES 2000).

A importância do rearranjo *RET/PTC* na patogênese do carcinoma papilífero da tireóide, quando detectado em níveis muito baixos ou somente em algumas células na intimidade de nódulos tireoideanos afetados pela tireoidite autoimune ainda não está claramente definida (UNGER et al. 2004; ZHU et al. 2006).

### **1.12 O PTC E O GENE RAS**

O gene *RAS* está localizado no cromossomo 1 e pertence a uma família de genes que codificam pequenas proteínas GTPases envolvidas na transmissão de sinais extracelulares para o núcleo. Anexa à face interna da membrana celular, a proteína Ras regula as vias de cAMP, de cálcio e de várias proteínas quinases (GOLBERT et al. 2003).

Desde a identificação da primeira mutação do gene *RAS* em tumores humanos (COOPER 1982), numerosas pesquisas têm sido feitas para decifrar o mecanismo pelo qual este gene promove a transformação da célula normal em célula neoplásica.

Uma vez ativada, a proteína Ras provoca a proliferação de células foliculares, ao contrário do que ocorre em culturas de fibroblastos, onde o seu efeito é interromper o fenômeno proliferativo. As células foliculares da tireóide são umas das poucas células do organismo cuja proliferação é positivamente regulada por uma molécula de ativação da cascata de

sinalização intracelular conhecida por cAMP (do inglês *cyclic adenosine monophosphate*). A inter-relação entre Ras e cAMP influencia diretamente as vias de sinalização ativadas por Ras.

O hormônio estimulante da tireóide, TSH (do inglês *thyroid stimulating hormone*), por sua vez, modula os efeitos do gene *RAS* na diferenciação, proliferação e sobrevivência da célula folicular (MEINKOTH 2004).

No PTC, mutações pontuais em *RAS* ocorrem em 10% dos casos, em geral associadas à variante folicular. Estas mutações localizam-se nos códons 12, 13 e 61 respectivamente dos genes *N-RAS*, *H-RAS* e *K-RAS* e estabilizam a proteína na sua conformação ativa, ligada à guanina-trifosfato (GTP), o que leva ao estímulo autônomo e permanente de diversas vias de sinalização, dentre elas a das MAPKs e a PI3K/AKT, ambas ligadas à proliferação celular (NAMBA et al. 1990; EZZAT et al. 1996; VASKO et al. 2004).

Estas mutações estão associadas também à encapsulação do tumor, a alterações morfológicas nucleares mais discretas e a uma menor frequência de metástases linfonodais (ZHU et al. 2003; ADENIRAN et al. 2006).

### **1.13 O PTC E OS GENES *TP53* E SEUS HOMÓLOGOS *p63* e *p73***

A proteína p53 é um fator de transcrição codificado pelo gene *TP53*, de grande importância nos organismos multicelulares, nos quais regula o ciclo celular, funcionando como agente supressor de tumor

(MATLASHEWSKI et al. 1984). Por esse motivo, o gene *TP53* é conhecido como o “guardião do genoma”, numa referência à sua função de impedir a proliferação de uma célula alterada, com seu DNA danificado.

Nos tumores da tireóide, a prevalência de mutações de *TP53* é de apenas 14,3% (FARID 2001), muito menor do que aquela encontrada nas neoplasias malignas de outros órgãos.

Foram identificadas duas proteínas homólogas de *p53*, a *p63* e a *p73*; em conjunto, elas constituem uma mesma família de fatores de transcrição inter-relacionados. Estas 3 proteínas compartilham até 63% de concordância na sequência de seus aminoácidos. O gene *TP53* codifica 6 proteínas identificadas por letras gregas, de  $\alpha$  até  $\xi$  e mostra atividade antiapoptótica (POZNIAK et al. 2000). As mutações de *p53* silenciam a sua capacidade de conduzir à apoptose a célula cujo DNA foi replicado erroneamente. Com isso, as demais mutações genéticas que usualmente não têm repercussão por causa do *p53* ficam liberadas, possibilitando o aparecimento de uma neoplasia maligna (LEVRERO et al. 2000).

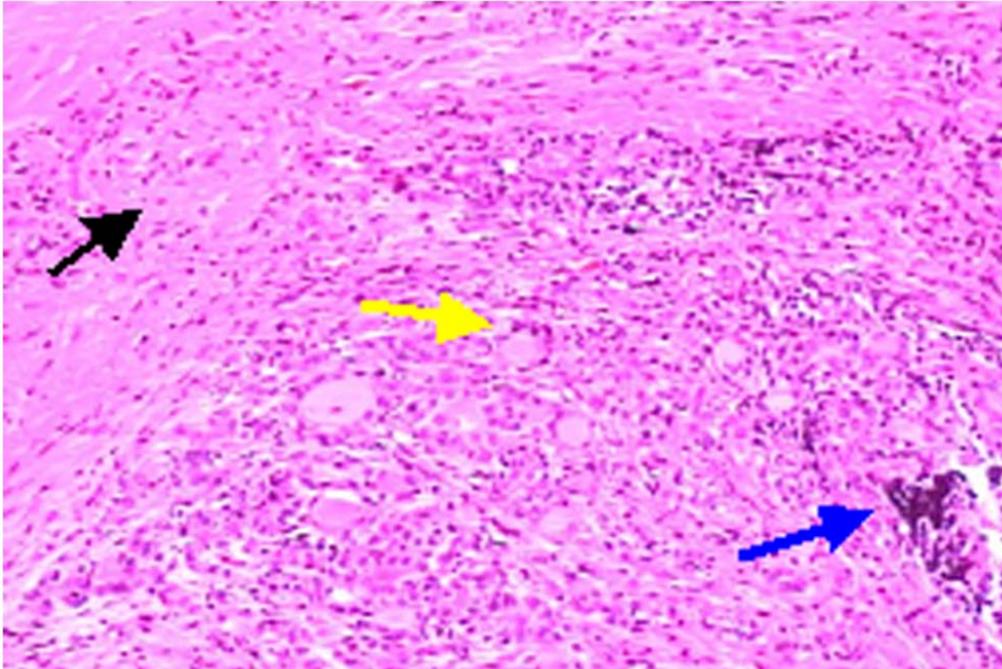
O gene *p63* não é um supressor tumoral como ocorre com o seu homólogo *p53* (LITTLE e JOCHEMSEN 2002). Ele é essencial para a manutenção de uma população de células-tronco nos tecidos epiteliais de diversos órgãos (YANG et al. 1999). A proteína por ele codificada é expressa no compartimento basal dos epitélios escamoso, mamário, salivar, prostático e das glândulas lacrimais e pode ser considerada um marcador de células de reserva (células-tronco, células indiferenciadas multipotenciais) nesses tecidos (PARSA et al. 1999). Na tireóide, as células-tronco são

representadas pelos ninhos celulares sólidos já referidos anteriormente. BURSTEIN et al. (2004), analisando cortes histológicos da tireóide de 88 pacientes, encontraram ninhos celulares sólidos em 21, nos quais em 7 havia PTC e TA. Em outras pacientes no mesmo grupo, sem PTC, foram encontrados também ninhos celulares sólidos, em meio a um quadro histológico revelando apenas TA. O autor propõe um modelo baseado nas células-tronco para explicar a gênese do PTC, sugerindo que: 1- as células tronco que formam os ninhos celulares sólidos, p63 fortemente positivas, são as células a partir das quais se origina um subgrupo de PTC (e não das células foliculares adultas; como tem sido preconizado); 2- estas mesmas células são pluripotentes e podem permanecer indiferenciadas ou diferenciar-se para linhagem escamosa ou glandular; podem, também, desencadear uma reação inflamatória, imunomediada, caracterizada por infiltrado linfocitário e as demais características da TA; 3- nesse contexto, o PTC e a TA estariam associados através de sua origem comum em células pluripotentes p63 positivas. Apesar de interessante, tal proposta está baseada apenas em 7 pacientes portadores de PTC associado à TA que mostraram ninhos celulares sólidos nos cortes histológicos de suas tireóides.

#### **1.14 A TIREOIDITE AUTOIMUNE (TA)**

Nos anais da Sociedade Clínica de Londres referentes ao ano de 1877 e novamente em 1888, consta o pronunciamento do patologista W.M. Ord, com as seguintes palavras a respeito das alterações histológicas que

ele havia encontrado pela primeira vez no estudo histológico de uma tireóide: “O *mixedema* depende de uma afecção destrutiva da tireóide... em todos os casos a tireóide está reduzida de tamanho e de cor variável, ora pálida, amarelo-esbranquiçada, ora avermelhada, firme, endurecida, fibrótica e aparentemente sem estrutura... A tireóide se transforma em um tecido fibroso delicado, infiltrado por ilhotas de células redondas, as quais evidentemente substituem as vesículas da glândula...Aqui e ali, observam-se também pequenos nódulos de 1 a 2 milímetros de diâmetro fortemente corados em negro..., os quais ao exame microscópico ... demonstram ser constituídos por leucócitos, por entre os quais há uns poucos corpúsculos epiteliais degenerados...”. Com estas palavras, foi feito o primeiro relato histórico da lesão então conhecida como “mixedema” (DAVIES 2003), hoje conhecida por tireoidite autoimune (VOLPE 1978a e b). Em 1912, mais de 30 anos depois, Hakaru Hashimoto descreveu quatro casos, que ele chamou de “struma lymphomatosa”, de pacientes portadores de bócio e hipotireoidismo (TAKAMI et al. 2008), quadro que ficou conhecido como “tireoidite de Hashimoto” (Figura 16).



**Legenda:** Alterações microscópicas descritas inicialmente por W.M.Ord (1877), substrato morfológico da doença descrita por Hakaru Hashimoto em 1912, conhecida como “tireoidite de Hashimoto”. Fibrose (seta preta), folículos atróficos (seta amarela), infiltrado linfocitário (seta azul) e metaplasia de células oxifílicas (células de Hurthle) difusamente distribuídas.

**Figura 16** - Tireoidite autoimune.

Tireoidite linfocitária, tireoidite crônica e tireoidite de Hashimoto são todos termos usados para designar o mesmo processo patológico que apresenta diferentes aspectos microscópicos na sua evolução, traduzidos por diversas manifestações clínicas (ROSAI 2004). Trata-se de uma alteração inflamatória órgão-específica, imunomediada, que deve ser genericamente chamada de tireoidite autoimune (TA) (DAVIES 2003), caracterizada funcionalmente pela produção de anticorpos dirigidos contra substâncias produzidas pela própria tireóide, o que pode alterar a sua função (DAYAN e DANIELS 1996; SARAVANAN e DAYAN 2001; PEARCE et al. 2003).

A tireoidite autoimune é uma condição destrutiva da tireóide cuja patogênese molecular ainda permanece desconhecida (DENNING et al. 2008). A doença costuma apresentar-se inicialmente assintomática, evoluindo para uma fase transitória com sinais de hipertireoidismo. Posteriormente, com o quadro morfológico plenamente instalado, na fase avançada, o paciente pode apresentar um quadro exuberante de hipotireoidismo, frente à atrofia do parênquima glandular e sua substituição por tecido fibroso. Em geral, os sinais e sintomas clínicos são correlacionados às alterações morfológicas causadas pelo processo inflamatório autoimune. As características anatomopatológicas que estabelecem o diagnóstico de TA variam desde leve infiltrado linfocitário focal sem repercussões no epitélio folicular até um quadro morfológico exuberante formado por intenso infiltrado linfocitário, formação de numerosos folículos linfóides exibindo centros germinativos proeminentes, extensa metaplasia oxifílica no epitélio folicular, destruição do parênquima glandular, atrofia de folículos tireoideanos e difusa proliferação fibrosa intersticial.

O diagnóstico anatomopatológico de TA, por basear-se num espectro morfológico progressivo, variável de acordo com o estágio em que a doença se encontra, depende da liberalidade com que o patologista classifica as alterações histológicas presentes. Esta subjetividade na interpretação dos achados microscópicos tem repercussão direta no estudo da epidemiologia da doença, cuja incidência é desconhecida e variável de acordo com o local geográfico estudado (HOLLOWELL et al. 2002). Em levantamentos

estatísticos baseados em autópsias, a prevalência de TA varia de 10% a 45% (WILLIAMS e DONIACH 1962; OKAYASU et al. 1991, 1994).

### 1.15 A ASSOCIAÇÃO ENTRE O PTC E A TA

O significado da associação entre o PTC e a TA permanece um tema controverso na literatura desde sua apresentação ao meio científico, nos idos de 1952 (LINDSAY et al. 1952). Estudos mostram que a frequência da associação pode variar entre menos do que 1% até 23% (WALKER e PALOYAN 1990).

A patogênese da TA envolve mutações nos genes que modulam a imunidade, dos quais a família HLA (do inglês *human leucocyte antigen*) é a mais importante. Esta família compreende 3 genes que codificam moléculas MHC (do inglês *major histocompatibility complex*) de classe I e mais 6 genes MHC de classe II (ADEREM e UNDERHILL 1999). O gene *CTLA-4* (do inglês *cytotoxic T leucocyte antigen*), conhecido como CD152, mostra polimorfismo associado à TA (LIOSSIS et al. 1998).

Como citado anteriormente, na TA, os pacientes formam anticorpos conhecidos como “antígenos microssomais” (ASA 1991) dirigidos contra substâncias produzidas pela própria tireóide, tais como a tireoglobulina e a peroxidase tireóidea.

Dentre os vários mecanismos imunológicos envolvidos na patogênese desta doença, o evento desencadeante e também o mais importante parece ser a sensibilização dos linfócitos CD4+ T *helper*, cuja ativação desencadeia

vários mecanismos que danificam as células foliculares, incluindo a liberação de citocinas tais como o interferon gama (INF- $\gamma$ ), que recruta e ativa macrófagos e células NK (do inglês *Natural Killer*). As células T *helper* também estimulam os linfócitos B a secretar anticorpos contra vários componentes das células foliculares (BIDDINGER 2009b).

Nas proximidades de folículos destruídos pelo processo inflamatório, são encontradas células apoptóticas (KOTANI et al. 1995). A união entre o receptor Fas e o seu ligante FasL parece ser importante na patogênese da TA, porém esta interação ainda é motivo de controvérsia. As células foliculares normais expressam Fas, principalmente quando expostas ao INF- $\gamma$  e à IL-1 $\beta$  e essa expressão aumentada tem sido relatada na TA. Este aspecto é acompanhado pela baixa expressão de Bcl-2 antiapoptótica, ao passo que os linfócitos infiltrativos mostram baixa expressão de Fas-FasL e alta expressão de Bcl-2 (GIORDANO et al. 2001). Este quadro proteico indica destruição de células foliculares e preservação dos linfócitos infiltrativos, porém a expressão de FasL nas células foliculares não é aceita por todos os pesquisadores, o que dificulta a interpretação desses achados (ARSCOTT e BAKER 1998; WEETMAN 2004).

A presença de imunoglobulinas estimulantes do crescimento da tireóide (TGI) e o excesso de TSH devido à queda do nível de T3 e T4 causada pela destruição do tecido tireoideano, levam inicialmente ao hipertireoidismo e têm sido implicados como responsáveis pelo aparecimento dos nódulos hiperplásicos vicariantes que em geral estão presentes na tireóide destes pacientes.

A punção aspirativa com agulha fina em geral pode sugerir o diagnóstico de TA ao evidenciar intenso infiltrado linfocitário e outras células inflamatórias, células oxifílicas, fibroblastos e restos celulares provenientes da destruição celular. Não é raro o achado de células foliculares com núcleos atípicos, mostrando membrana nuclear irregular, aumento de volume, pseudoinclusões e até mesmo dobramentos cromatínicos, achados histológicos sugestivos de PTC (BALOCH e LIVOLSI 2007).

De todas estas alterações, o sinal histológico característico da TA é a presença da célula oxifílica (também conhecida como célula de Hurthle), uma variante morfológica da célula folicular, constituída por citoplasma abundante, acidofílico e granuloso, circundando um núcleo central e volumoso, com nucléolo conspícuo.

A TA e o PTC mostram aspectos morfológicos, imunoistoquímicos e moleculares semelhantes (ARIF et al. 2002). Estudos moleculares em tireóides com TA indicam também a presença do rearranjo *RET/PTC*, que é um marcador associado ao PTC (WIRTSCHAFTER et al. 1997). Alguns relatos indicam que o PTC parece ser mais freqüente em pacientes portadores de TA e que nestes pacientes a incidência de pequenos focos de PTC (microcarcinomas) é alta (FINK et al. 1996).

O cenário que envolve este assunto é particularmente confuso até porque as alterações morfológicas presentes nas células foliculares de pacientes com TA são semelhantes àquelas que definem o diagnóstico de PTC (NIKIFOROV e OHORI 2009).

A inflamação crônica é sabidamente um fator associado ao desenvolvimento de diversas neoplasias em diferentes órgãos do corpo humano. Na patogênese dessas neoplasias, observa-se a participação de vários mediadores inflamatórios. A ciclo-oxigenase 2 (COX-2) é uma enzima que catalisa a formação de prostaglandinas a partir do ácido aracdônico, reação estimulada por algumas substâncias, dentre elas o óxido nítrico (NO). Este é produzido pela ação de enzimas conhecidas como sintases do óxido nítrico (NOS), das quais, a forma induzida (iNOS-2) é a que leva à produção de maiores quantidades de NO. Estas duas enzimas, COX-2 e iNOS, estão associadas à gênese de múltiplas neoplasias. Em relação à iNOS, um único estudo mostrou a sua expressão em 4/5 casos de PTC, sem relação com TA (KAYSER et al. 2000). Quanto à COX-2, outro estudo incluiu 22 casos, sendo 2 tireóides normais, 3 com bócio colóide, 5 com TA, 7 com PTC e 5 com carcinoma anaplásico. A expressão de COX-2 foi analisada por imunistoquímica e por *Western blot*, resultando positiva em pacientes portadores de PTC (6/7) e também naqueles com TA (5/5), levando os autores a propor a possibilidade da participação da COX-2 na patogênese do PTC associado à TA (CORNETTA et al. 2002).

A proteína p63 está envolvida na manutenção das células-tronco, as quais são necessárias para manter o desenvolvimento dos epitélios pluri-estratificados e a morfogênese (YANG et al. 1999; MILLS et al. 1999; YANG e MCKEON 2000; PELLEGRINI et al. 2001) e, devido à sua expressão em PTC e TA, a relação etiopatogênica entre ambas tem sido proposta (UNGER et al. 2003; BURSTEIN et al. 2004).

Alguns modelos experimentais têm focalizado a associação entre a TA e o PTC e tentado explicar a sua natureza. A tireóide de camundongos transgênicos para *RET/PTC3*, ao contrário de animais normais, produz citocinas (interleucina-1-alfa, interleucina-1-beta, interleucina-6, TNF-alfa e COX-2), criando dessa forma o meio ambiente adequado para o desenvolvimento e a progressão das células neoplásicas do PTC.

Em culturas de células, a transfecção de *RET/PTC* provoca a fosforilação do fator de transcrição STAT1 (HWANG et al. 2004). Esta ativação pode levar à superexpressão de complexos de histocompatibilidade de classe II, mantendo a intensidade do processo inflamatório.

Há relatos citando a presença de rearranjos do *RET/PTC* em pacientes portadores de TA (SHEILS et al. 2000), afirmação refutada por outros autores que interpretam esse achado como artefatos de ordem técnica, seja por contaminação da PCR, seja pela presença de micronódulos de PTC, tão comuns em pacientes portadores de TA (TALLINI et al. 1998; NIKIFOROVA et al. 2002; ARIF et al. 2002). WIRTSCHAFTER et al. (1997) estudaram 21 casos de TA, 16 dos quais mostraram associação com PTC e positividade para o rearranjo *RET/PTC1* e 19/21 apresentavam o rearranjo *RET/PTC3*, concluindo que existe uma relação de causa e efeito entre a TA e o PTC. Este estudo foi realizado com casos emblocados em parafina, extração de RNA e PCR, mas não estão suficientemente claros no artigo os critérios adotados para inclusão dos pacientes.

Outros estudos relatam uma frequência de PTC maior do que a esperada em tireóides portadoras de TA (WALKER e PALOYAN 1990).

Levantamentos epidemiológicos e estudos retrospectivos com grande quantidade de pacientes, no entanto, não confirmam existir uma associação efetiva entre a TA e o PTC (CRILE 1978; GOLDMAN et al. 1990).

Entre 01 de janeiro de 2006 e 10 de setembro de 2007, num período de pouco mais de 20 meses, foram publicados na literatura científica mais de 2 mil artigos sobre o câncer da tireóide, uma média de 100 artigos por mês, alguns deles tratando da associação entre tireoidite autoimune e carcinoma papilífero da tireóide, que, segundo a maioria dos autores, não parece ser casual (BENVENGA 2008).

Perante esse cenário, pode-se concluir que até o presente momento ainda não há um consenso sobre o significado da coexistência de TA e PTC no mesmo paciente. Para alguns autores, essa associação TA/PTC seria casual (NIKIFOROV 2006b), enquanto que para outros ela é de causa e efeito, devendo tal paciente ser tratado de forma especial (PRASAD et al. 2004).

Tendo em vista o aumento real na incidência do PTC, fato que tem sido constatado em quase todos os países, torna-se cada vez mais premente a necessidade de se encontrar uma resposta que consiga explicar satisfatória e definitivamente tal associação, o que certamente trará grandes benefícios aos pacientes por ela acometidos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Identificar a existência de eventuais diferenças entre as células neoplásicas que compõem o carcinoma papilífero da tireóide associado ou não à tireoidite autoimune, através de marcadores de expressão proteica e da pesquisa dos marcadores moleculares das mutações gênicas envolvidas.

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS**

1 Avaliar comparativamente em pacientes com PTC associado ou não à TA a expressão imunoistoquímica de proteínas relacionadas aos seguintes aspectos da biologia celular:

- presença de células indiferenciadas;
- via das MAPKs;
- moléculas de adesão;
- ativação da via de sinalização Wnt;
- via do receptor de morte;
- moléculas ligadas à indução de interleucinas;
- fatores de crescimento e diferenciação celulares;

→ Índices de proliferação celular e de apoptose.

- 2 Avaliar comparativamente nos pacientes com PTC associado ou não à TA a frequência da mutação pontual V600E no gene *BRAF* e dos rearranjos gênicos *RET/PTC1* e *RET/PTC3* no gene *RET*.

### **3 PACIENTES E MÉTODOS**

#### **3.1 CASUÍSTICA**

O levantamento dos casos de PTC foi feito a partir do banco de tumores do Hospital A.C. Camargo que contém amostras de tecido neoplásico obtidas no momento da cirurgia e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para preservação do DNA e do RNA.

Foram inicialmente selecionados 128 casos de PTC, tendo-se como critério de inclusão o diâmetro da neoplasia, maior ou igual a 1 cm. Destes casos, o material (lâminas e blocos de parafina) de 18 pacientes havia sido consumido em trabalho científico prévio, restando assim 110 pacientes.

Todo o material destes pacientes foi levantado do arquivo, totalizando 995 lâminas e respectivos blocos de parafina, indicando uma média de aproximadamente 9 blocos e respectivos preparados histológicos para cada paciente portador de PTC.

As 995 lâminas foram submetidas a uma primeira revisão que confirmou o diagnóstico de PTC em todos os pacientes, sendo escolhidos apenas os casos classificados como variante clássica, segundo os critérios histológicos preconizados pela OMS (2004); este foi o nosso segundo critério de inclusão na pesquisa, tendo sido eliminados mais 8 pacientes.

Assim, a casuística ficou constituída por 102 pacientes, portadores de PTC variante clássica, com diâmetro igual ou maior do que 1 centímetro. O

material representativo destes pacientes consta de 918 blocos de parafina e respectivos preparados histológicos, todos corados pela técnica da hematoxilina-eosina, de uso corrente em patologia cirúrgica.

A segunda revisão de todas as 918 lâminas teve o objetivo de escolher uma só lâmina, aquela que melhor representasse a região de contato entre o carcinoma e o estroma tireoideano adjacente, sede das alterações inflamatórias que afetam os tecidos.

As lâminas dos 102 casos foram revisadas pela terceira vez com a finalidade de formar os dois grupos de pacientes portadores de PTC, um associado e outro não associado a TA.

Os critérios adotados para tal classificação foram baseados no exame microscópico dos fragmentos presentes, com atenção especial ao número de agregados linfocitários e à quantidade de linfócitos em cada agregado. Quando o exame microscópico revelou ausência de linfócitos ou então não mais do que 2 agregados linfocitários, cada um deles formado por no máximo 20 linfócitos, o caso foi incluído no grupo SEM TA.

As lâminas que mostraram mais do que dois agregados linfocitários, ou então mais do que 20 linfócitos em cada um dos agregados classificaram o paciente no grupo COM TA. Mediante estes critérios, nossos grupos de estudo ficaram assim constituídos:

**Grupo 1** - 70 pacientes portadores de PTC com TA

**Grupo 2** - 32 pacientes portadores de PTC sem TA

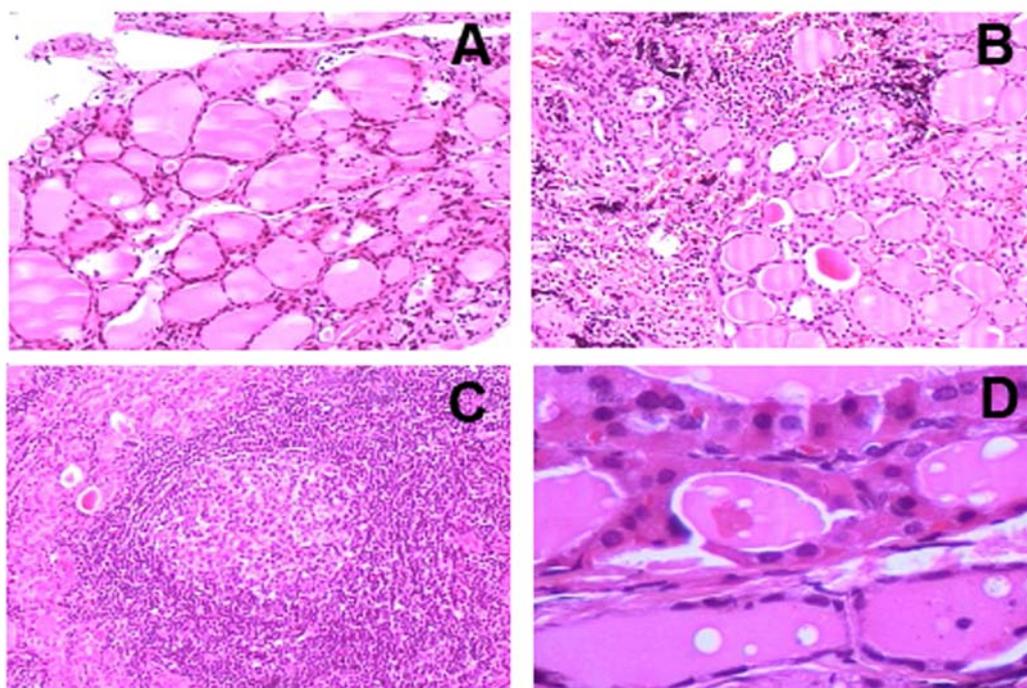
Em seguida, o grupo de pacientes com tireoidite foi desmembrado em 3 subgrupos, de acordo com a presença de folículos linfóides contendo centros germinativos proeminentes e a presença de células oxifílicas (células de Hurthle). Mediante esses critérios, a casuística ficou assim constituída:

T0 - SEM TIREOIDITE - ausência de linfócitos ou presença de no máximo 2 agregados linfocitários, cada um contendo até 20 linfócitos;

T1 - TIREOIDITE LEVE - presença de mais do que 2 agregados linfocitários ou mais de 20 linfócitos em pelo menos um agregado. Neste subgrupo, ausência obrigatória de folículos linfóides e também ausência de células oxifílicas;

T2 - TIREOIDITE MODERADA - infiltrado linfocitário intenso, com folículos linfóides e formação de centros germinativos. Ausência obrigatória de células oxifílicas;

T3 - TIREOIDITE INTENSA - os achados dos subgrupos anteriores acrescidos da presença de células oxifílicas - células de Hurthle. Infiltrado linfocitário de qualquer intensidade, com ou sem centros germinativos (Figura 17).



**Legenda:** Os subgrupos de pacientes com TA foram definidos pelos seguintes parâmetros histológicos aplicados à lâmina selecionada para representar cada paciente no TMA: A - T0: ausência de linfócitos ou até 2 agregados linfocitários (com no máximo 20 linfócitos cada um); B - T1: muitos linfócitos difusamente distribuídos, sem folículos linfóides; C - T2: folículos linfóides com centros germinativos, sem células oxifílicas; D - T3: Características morfológicas anteriores, acrescidas de células oxifílicas (grande aumento).

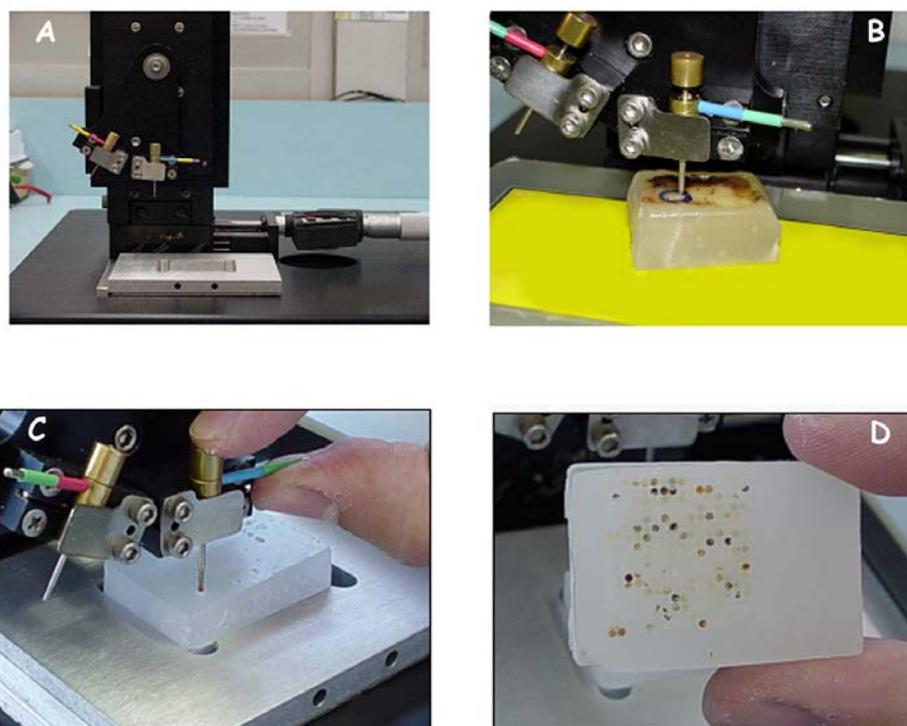
**Figura 17** - Classificação da intensidade da tireoidite autoimune - parâmetros histológicos

### 3.2 CONSTRUÇÃO DO TMA (do inglês *tissue microarray*)

Revimos as lâminas escolhidas com o objetivo de identificar uma área de aproximadamente 1 milímetro de diâmetro de onde seria retirado o fragmento de tecido para a construção do TMA. Para selecionar essa área, buscamos a superfície de contato entre a periferia do PTC e o estroma da tireóide, onde tem início a reação inflamatória que caracteriza a TA; esta área foi marcada inicialmente na lâmina com caneta hidrográfica. Em

seguida, colocamos a lâmina sobre a superfície de corte do respectivo bloco de parafina e marcamos a mesma área com tinta branca no bloco de parafina.

Com o *Tissue Microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, MD), foi retirado na área marcada de cada bloco doador um fragmento cilíndrico de tecido parafinado medindo aproximadamente 1 milímetro de diâmetro e 5 milímetros de extensão, que foi incluído no bloco receptor para formar o TMA (Figura 18).



**Legenda:** Equipamento utilizado para preparo do TMA. A - tissue microarrayer; B - retirando fragmento do bloco doador; C - inserindo fragmento no bloco receptor; D - TMA pronto.

**Figura 18** - Preparo do TMA.

A partir do bloco receptor (TMA) contendo os 102 fragmentos de tecido, cada um representando um paciente, foram confeccionados 100 preparados histológicos sequenciais, com lâminas especiais (*Instrumedics Inc, Hackensack, NJ*), devidamente identificados de 1 a 100, segundo o nível de profundidade de onde os cortes foram obtidos, correspondendo o número 1 ao nível mais superficial e o número 100 ao nível mais profundo.

Os cortes foram feitos em duplicata, de forma que cada lâmina apresenta dois conjuntos sequenciais justapostos, cada um contendo cilindros de todos os casos. Esta amostragem em quadruplicata tem a finalidade de minimizar a perda de amostras que pode ocorrer no TMA, pela baixa densidade do tecido tireoideano, que pode esfarelar-se ou descolar da lâmina durante a técnica histológica e também para aumentar a representatividade de cada lesão.

Todas as lâminas foram recobertas por película de parafina, embaladas a vácuo e armazenadas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização da técnica imunoistoquímica.

### **3.3 IMUNOISTOQUÍMICA**

#### **3.3.1 Anticorpos Utilizados**

A avaliação da expressão proteica foi feita através de reações imunoistoquímicas com os anticorpos abaixo descritos, selecionados como representantes das seguintes funções celulares:

Presença de células indiferenciadas:	p63
Via das MAPKs:	ras, AKT-1, ERK1/2
Moléculas de adesão:	E-caderina, CD44
Ativação da via de sinalização Wnt :	beta-catenina
Via do receptor de morte:	Fas-L, caspase 8
Moléculas de indução de interleucinas:	iNOS, COX-2
Fatores de crescimento e diferenciação:	galectina-3, VEGF
Índices proliferativo e de apoptose:	Ki-67, caspase 3 clivada, Fas

### 3.3.2 Caracterização Técnico-Comercial dos Anticorpos Utilizados

**Tabela 1** - Características técnico-comerciais dos anticorpos utilizados.

Proteína	Marca	Clone	Diluição	Rec. antigenica	Sistema de amplificação
p63	DAKO	4A4	1/2000	BM/EDTA/TRIS/pH9,0	Advance HRP(DAKO)
pAKT-1	Cell Signaling	587F11	1/100	PASCAL/CT/pH6,0	Advance HRP(DAKO)
E-Caderina	DAKO	NCH-38	1/600	BM/EDTA/TRIS/pH9,0	Advance HRP(DAKO)
CD44(H-CAM)	NovoCastra	DF1485	1/40	PASCAL/CT/pH6,0	Novolink polymer(NovoCastra)
B-Catenina	BD	14	1/3000	PASCAL/CT/pH6,0	Advance HRP(DAKO)
Fas	DAKO	DX-2	1/1500	BM/EDTA/TRIS/pH9,0	CSA (DAKO)
Fas-L	NovoCastra	5D1	1/50	PASCAL/CT/pH6,0	Novolink polymer(NovoCastra)
Caspase 8	NovoCastra	11B6	1/200	PASCAL/CT/pH6,0	Novolink polymer(NovoCastra)
iNOS	BD	6	1/400	PASCAL/CT/pH6,0	Advance HRP(DAKO)
COX-2	NovoCastra	4H12	1/3000	PASCAL/CT/pH6,0	Advance HRP(DAKO)
VEGF	DAKO	VG1	1/200	BM/EDTA/TRIS/pH9,0	Novolink polymer(NovoCastra)
Ki67	DAKO	MIB-1	1/2500	PASCAL/CT/pH6,0	Advance HRP(DAKO)
Casp.3 cliv	Cell Signaling	-	1/300	BM/EDTA/TRIS/pH9,0	Advance HRP(DAKO)
Galectina-3	Cell Marque	9C4	1/100	PASCAL/CT/pH6,0	Advance HRP(DAKO)
Ras	NeoMarkers	-	1/3000	BM/EDTA/TRIS/pH9,0	Novolink polymer(NovoCastra)
pERK1/2	EPITOMICS	E337	1/800	BM/EDTA/TRIS/pH9,0	Advance HRP(DAKO)

Os anticorpos fabricados para utilização em tecidos animais (coelho, rato e camundongo), segundo sua bula original, foram devidamente validados para uso em tecido humano através de estudo imunoistoquímico prévio realizado em amostras de tumores humanos conhecidos, diagnosticados no departamento de anatomia patológica do hospital A.C.Camargo, de acordo com as boas práticas de laboratório vigentes.

### **3.3.3 Processamento Técnico das Imunocolorações**

As 32 lâminas selecionadas dentre as 100 disponíveis do TMA foram desparafinadas e os cortes histológicos, hidratados e a seguir incubados a 60°C por 30 minutos. Seguiram-se 3 banhos de xilol (5 minutos cada) e 4 banhos de álcool etílico 95%. As lâminas foram então lavadas por 5 minutos em água corrente. A recuperação antigênica foi realizada em câmara Pascal (câmara de pressão controlada por microprocessador DAKO) em solução de citrato pH 6,0 por 30 segundos após atingir temperatura de 125°C e pressão entre 20 e 25psi. O resfriamento e a despressurização ocorreram até atingir a temperatura de 90°C, permanecendo em repouso por 10 segundos, seguindo-se lavagem com água corrente por 5 minutos. Para alguns marcadores, a recuperação antigênica foi realizada em banho-maria com solução EDTA / TRIS, em pH 9,0 e temperatura de 96°C por 40 minutos, seguido de resfriamento à temperatura ambiente por 20 minutos e lavagem em água corrente por 5 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito através de 3 banhos de 5 minutos cada com peróxido de hidrogênio a 3% e em seguida as lâminas foram lavadas em PBS. O bloqueio de

proteínas foi realizado pelo bloqueador específico de proteínas (Dako) por 20 minutos. As lâminas foram então incubadas com cada anticorpo primário por 2 horas à temperatura ambiente em câmara úmida e a seguir, lavadas em PBS. A incubação com anticorpo secundário (*Advance HRP Link DAKO*) foi feita por 30 minutos a temperatura ambiente. Nova lavagem com PBS, seguida da incubação com polímero (*Advance HRP enzyme-DAKO*, NovaCastra e o kit CSA - *catalysed signal amplification system - DAKO*) por 30 minutos a temperatura ambiente. Nova lavagem em PBS. A revelação da reação foi feita com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos (*Kit Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, DAKO*). As lâminas foram a seguir lavadas em água corrente e contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Merck) por 2 minutos. Nova lavagem em água corrente por 5 minutos. Finalizando, desidratação com álcool, diafanização com xilol e montagem com Permount (*Fisher Scientific*).

Do total de 100 lâminas obtidas por cortes do TMA, foram selecionadas duas para cada proteína avaliada por imunistoquímica, sendo uma de um nível mais superficial e outra mais profunda do bloco, com um intervalo mínimo de 30 cortes sequenciais entre elas (200 micrômetros). Como cada lâmina possui dois cortes sequenciais, esta metodologia representa uma análise em quadruplicata.

Os controles negativos para cada reação imunistoquímica foram processados da mesma forma, com a omissão do anticorpo primário e substituição por imunoglobulina do mesmo isotipo. Os controles positivos

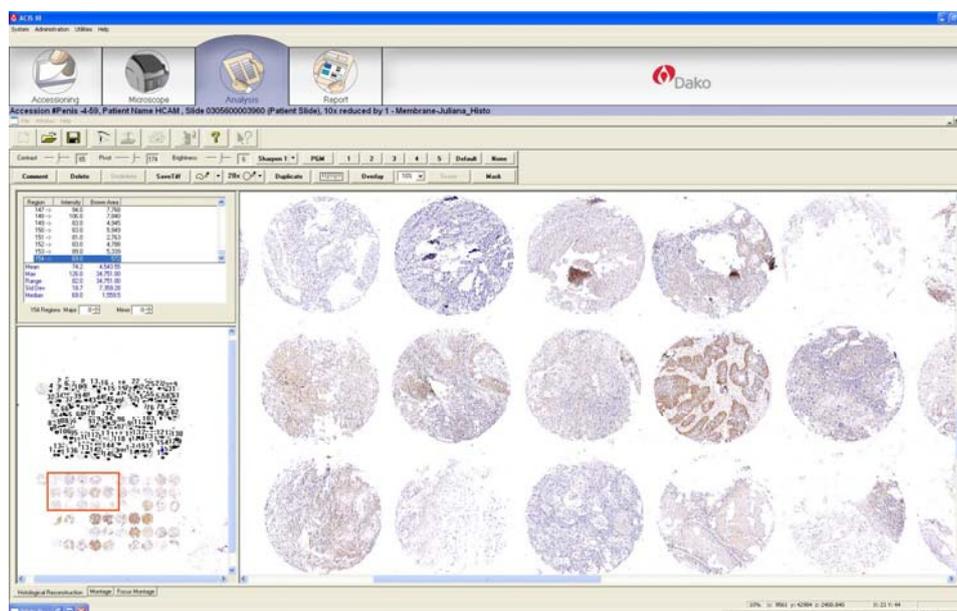
foram confeccionados com tecidos sabidamente positivos para os anticorpos testados.

### 3.3.4 Avaliação Microscópica da Expressão Proteica

Realizamos nosso estudo através do sistema automatizado de imagem celular ACIS III (do inglês *Automated Cellular Imaging System - ChromaVision Medical Systems, Inc., DAKO, Carpinteria, CA, EUA*).

Resumidamente, trata-se de microscópio digital automatizado (escaneador de imagens) acoplado a um computador com janela para captura e processamento de imagens. O ACIS III é capaz de detectar, contar e classificar células de acordo com a sua cor, tamanho e forma, permitindo o reconhecimento de 256 níveis de intensidade de imunocoloração (CREGGER et al. 2006).

Na avaliação das proteínas beta-catenina (membrana), E-caderina, Fas-L, CD44, VEGF, Ras, galectina 3 e Fas, que apresentam marcação na membrana celular, foi utilizado o programa computacional *membrane histo*. Na análise da expressão de beta-catenina (citoplasma), COX-2, galectina 3, i-NOS, Fas-L, VEGF, caspase 8, Ras, caspase 3 clivada, e AKT-1, presentes no citoplasma, foi utilizado o programa computacional *cytoplasm histo*. No estudo da expressão de p63, Ki-67, e ERK1/2, que evidenciam a presença da proteína no núcleo, foi utilizado o programa computacional *nuclear histo* (Figura 19).



**Legenda:** Tela do ACIS III com vários cortes do TMA. À esquerda, de baixo para cima, área para seleção dos fragmentos a serem avaliados (quadro vermelho), arquivo das áreas selecionadas e os índices numéricos fornecidos automaticamente pelo sistema, relativos à intensidade da expressão proteica.

**Figura 19** - Tela de trabalho do ACIS III.

Na avaliação microscópica de cada proteína, para cada localização celular, foi seguido o protocolo: 1- cadastro da lâmina no sistema, especificando a localização celular do anticorpo, conforme referido acima; 2- rastreamento dos cortes presentes, com captura automática de todas as imagens em arquivo digitalizado; 3- definição do chamado “colour-threshold”, feita manualmente pelo patologista; neste processo, são selecionadas inicialmente as áreas de expressão positiva (coloração marron) e depois as de expressão negativa (coloração azul), estabelecendo-se assim os parâmetros que o computador deverá obedecer na análise das imagens. Esta aferição foi feita individualmente para cada proteína, separadamente em cada uma das suas localizações celulares; 4- análise microscópica de

cada fragmento de tecido presente, selecionando-se no mínimo três áreas diferentes, tendo-se como critério de escolha sempre as regiões de maior positividade da imunexpressão; para cada área selecionada, o ACIS III registra uma grandeza numérica que representa a intensidade da imunocoloração; 5- a média aritmética das três ou mais áreas selecionadas representa a intensidade de imunexpressão para cada proteína, de forma que cada paciente tem a imunexpressão de cada uma das proteínas estudadas representada por apenas uma grandeza numérica.

Nas proteínas expressas apenas na membrana celular e no citoplasma, a intensidade de imunocoloração está indicada através de um único número que representa a intensidade de coloração positiva nas áreas selecionadas.

Nas proteínas com localização nuclear, por outro lado, o ACIS III fornece dois números de leitura: o primeiro indica a porcentagem de área nuclear positiva em relação à área total ocupada pelos núcleos (soma das áreas positiva, de coloração marron e negativa, de coloração azul); o segundo valor reflete a intensidade da imunocoloração positiva.

### **3.4 MARCADORES MOLECULARES**

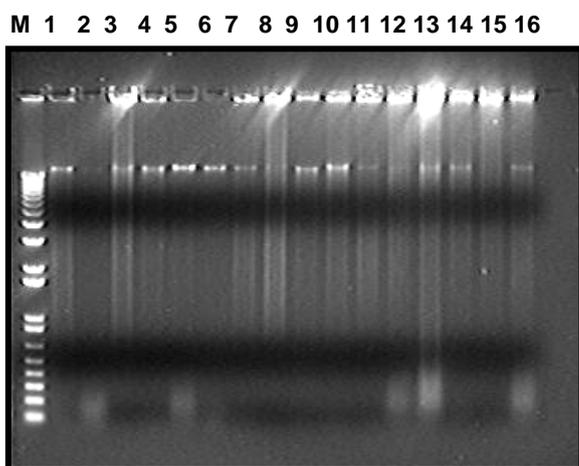
#### **3.4.1 Microdissecção das Amostras**

Os fragmentos de tireóide obtidos durante a cirurgia dos 102 pacientes e imediatamente congelados a - 80°C no banco de tumores foram inicialmente submetidos a um corte de congelação, corados pela técnica

hematoxilina-eosina e submetidos à avaliação histológica dos seus constituintes, sendo desprezados os componentes não tumorais, tais como fibrose, processo inflamatório, necrose etc. A efetividade da dissecação foi checada com novos cortes histológicos realizados no tecido remanescente.

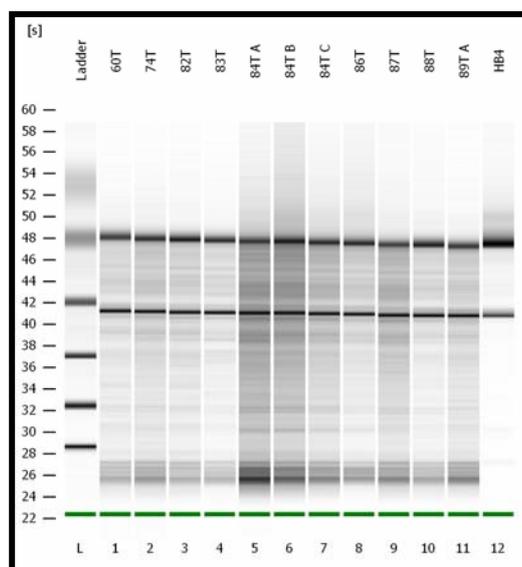
### 3.4.2 Extração do DNA e do RNA

O DNA e o RNA foram extraídos pelo método de *Tri Reagent* (Sigma) (CHOMCZYNSKI e MACKEY 1995). A avaliação da qualidade de cada uma dessas amostras foi feita através de leitura espectrofotométrica no equipamento Nanodrop ND-1000 (*Nanodrop Technologies, Wilmington, DE*) utilizando-se chip RNA 6000 Nano do equipamento *Bioanalyzer (Agilent Technologies)* e também através de corrida eletroforética em gel de agarose a 1% (Figuras 20 e 21).



**Legenda:** Gel de agarose 1% representativo da qualidade e integridade das amostras extraídas pelo método do TriReagent (Sigma). M: marcador de peso molecular; 1 a 16: amostras de DNA.

**Figura 20** - Amostras de DNA de carcinoma papilífero de tireóide.



**Legenda:** Gel representativo da análise da qualidade e integridade de amostras extraídas pelo método do *TriReagent* (Sigma). Foi utilizado o *chip* RNA 6000 Nano no equipamento *Bioanalyzer* (Agilent Technologies). L: marcador de peso molecular; 1 a 12: doze amostras de carcinoma papilífero de tireóide. RNA extraído de linhagem celular HB4A e utilizado como controle da corrida eletroforética.

**Figura 21** - RNAs extraídos de HB4A

### 3.4.3 Análise da Mutação V600e do *BRAF*

A análise da mutação do gene *BRAF* nos PTCs foi realizada pela técnica de pirosequenciamento, considerada adequada para o estudo de mutações genéticas pontuais.

O pirosequenciamento é um método baseado na detecção em tempo real do pirofosfato (PPI) liberado durante a síntese do DNA. Através de uma cascata de reações enzimáticas, são gerados sinais luminosos proporcionais à quantidade de nucleotídeos incorporados. Essa cascata inicia-se com a polimerização do ácido nucléico, na qual é liberada uma molécula de pirofosfato inorgânico a cada nucleotídeo incorporado pela polimerase. Esse

pirofosfato é convertido a ATP pela ação de outra enzima, a ATP-sulfurilase, que fornece à luciferase a energia suficiente para oxidar a luciferina e gerar luz. Como o nucleotídeo incorporado é conhecido, pode-se determinar a sequência do molde.

Foi pesquisada a mutação no códon V600E do gene *BRAF* utilizando-se o *Kit Pyromark™ BRAF* (Quiagen) que contém pares de iniciadores para a PCR, sendo um deles biotilado e outro um iniciador de sequenciamento.

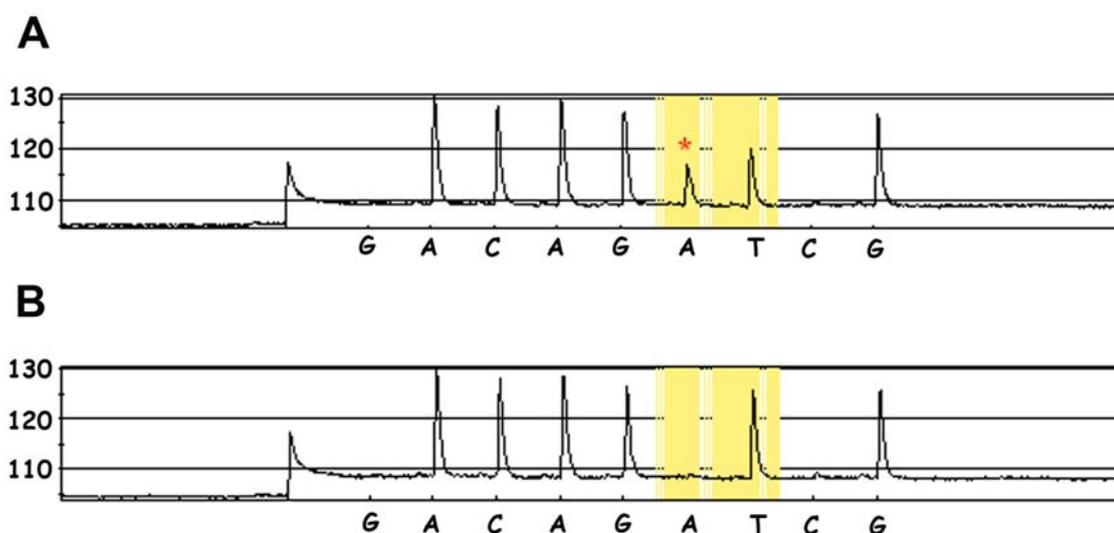
Em cada reação de PCR, a amostra continha 10-20ng de DNA genômico, 10pmols de iniciadores, senso e anti-senso e 1,25 unidades da enzima *Taq Platinum (Invitrogen)* em um volume total de 50 µl em H<sub>2</sub>O.

Os ciclos foram realizados em uma máquina de PCR *Eppendorf Mastercycler Gradient (Brinkman Instruments, Westbury, NY)* programada para submeter as amostras a 95°C durante 15 minutos e 45 ciclos de 95°C por 20 segundos, 51°C por 20 segundos, 72°C por 20 segundos e finalizando com um ciclo de 72°C por 5 minutos.

A amplificação da região específica foi verificada pela visualização do produto amplificado em um gel de 2% agarose *SybrSafe (Invitrogen)*.

A purificação da fita simples de DNA utilizada como molde na reação de sequenciamento foi realizada em uma placa de 96 wells (*Millipore, Bedford, MA*). 20 µL do produto biotilado foram purificados, utilizando-se esferas de agarose marcadas com estreptoavidina (*Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ*) e processados utilizando-se o kit *PSQ 96 Sample Preparation Kit (Pyrosequencing AB, Westborough, MA)*.

A reação de síntese por sequenciamento da fita complementar foi realizada automaticamente pelo instrumento *PyroMark MD (Biotage)* em temperatura ambiente, com reagentes *PyroGold (Biotage)*. O sinal emitido durante a incorporação de cada nucleotídeo detectado por uma câmera CCD foi convertido em picos para formar os pirogramas, que foram avaliados para determinar a presença ou ausência de mutação. Foi considerado *BRAF* mutado quando ocorreu a troca dos aminoácidos Valina (V) para Ácido Glutâmico (E) no códon 600, acarretando uma alteração na leitura, que passou de GTG para GAG, conforme mostra a Figura 22.



**Legenda:** Pirograma representativo da análise da mutação V600E de *BRAF* em amostras de PTC. A - Pirograma de uma amostra com mutação no códon 600 do gene de *BRAF* (GAT), indicado com o asterisco vermelho; B - Pirograma de uma amostra sem mutação *BRAF* (GTT).

**Figura 22** - Pirograma.

#### 3.4.4 Análise dos Rearranjos *RET/PTC1* e *RET/Ptc3*

A avaliação dos rearranjos *RET/PTC1* e *RET/PTC3* foi realizada por *Real Time PCR* quantitativa (qRT-PCR), segundo técnica já padronizada (RHODEN et al. 2004). O cDNA foi sintetizado utilizando-se 1µg de RNA total através do *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, CA)* e 1U/µL de *RNAse Out (Invitrogen, Carlsbad, CA)* de acordo com o protocolo do fabricante. A reação foi incubada a 25°C por 10 min, em seguida a 37°C por 120 min e 85°C por 5 seg. O cDNA foi estocado a -20°C.

A eficiência da transcrição reversa do RNA para cDNA foi avaliada pela amplificação por PCR do gene  $\beta$ -actina, com os oligonucleotídeos *Foward* 5'-GCACCCAGCACAATGAAG-3' e *Reverse* 5'-CTTGCTGATCCACATCTGC-3'. Os oligonucleotídeos foram desenhados em 2 éxons diferentes e amplificaram região de íntron. O ensaio foi realizado em volume final de 20µL contendo 0,2µM de cada oligonucleotídeo, 125µM de dNTPs (*Invitrogen, Carlsbad, CA*), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 10mM de Tris-HCl e 50mM de KCl, 1 U de *PlatinunTaq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA)* e 10ng de cDNA. A amplificação foi realizada segundo os seguintes ciclos: 95°C por 5 min para a desnaturação da molécula e ativação da *PlatinunTaq*; 35 ciclos a 94°C por 1 min, a 60°C por 1 min e a 72°C por 1 min, com extensão final a 72°C por 5 min.

O ensaio de amplificação foi realizado de acordo com os procedimentos recomendados no manual do "kit" *TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)*, conforme descrição a seguir:

A reação foi realizada em um volume final de 20 µl contendo 10ng de cDNA, 10,0µl do *TaqMan Universal Master Mix* (2X) (contendo MgCl<sub>2</sub>, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, enzima DNA polimerase modificada (*AmpliTaqGold*)), sonda e *primers* específicos para a detecção dos seguintes rearranjos:

**RET/PTC1:** RET/PTC1 F 5' CGCGACCTGCGCAA 3', RET/PTC1 R 5' CAAGTTCTTCCGAGGGAATTCC 3' e sonda RET/PTC1 6FAM - CAAGCGTAACCATCGAGGATCCAAAGT-TAMRA;

**RET/PTC3:** RET/PTC3 F 5' CCCAGGACTGGCTTACCC 3', RET/PTC3 R 5' CAAGTTCTTCCGAGGGAATTCC 3' e sonda RET/PTC3 6FAM - AAAGCAGACCTTGGAGAACAGTCAGGAGG - TAMRA;

**Controle endógeno:** β-ACTINA F 5' AGCCTCGCCTTTGCCGA 3', β-ACTINA R 5' CTGGTGCCTGGGGCG 3' e sonda β-ACTINA VIC - CCGGCTTCGCGGGCGAC - TAMRA.

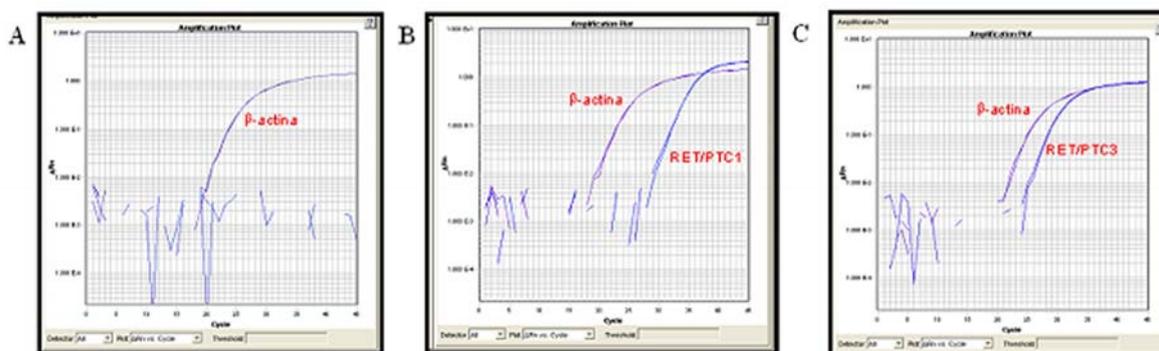
A amplificação foi realizada em 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto, precedidos por um período a 50 °C por 2 minutos e a 95 °C por 10 minutos. A amplificação foi feita no aparelho 7900HT *Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*).

Os produtos foram detectados pelo contínuo monitoramento do sinal fluorescente emitido. Dessa forma, os valores quantitativos (Ct) foram obtidos a partir do ciclo limiar, onde o aumento do sinal fluorescente

associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começa a ser detectado.

A expressão gênica foi quantificada relativamente à expressão de um gene controle ( $\beta$ -actina) e normalizada com um RNA de referência oriundo de linhagem celular de tireóide humana TT (ATCC) (Figura 23).

O resultado final ( $n_{\text{gene}}$ ) é expresso como um aumento ou diminuição da expressão de um gene em  $n$ -vezes quando comparado ao controle e ao calibrador, de acordo com a seguinte fórmula:  $n_{\text{gene}} = 2^{-(\Delta\text{Ct amostra} - \Delta\text{Ct calibrador})}$ , onde  $\Delta\text{Ct}$  da amostra e do calibrador são determinados subtraindo-se o valor médio de Ct do gene estudado do valor médio de Ct do gene usado como controle.



**Legenda:** A: amostra com amplificação do gene controle ( $\beta$ -actina), sem amplificação do rearranjo *RET/PTC1*; B: amostra com amplificação do gene controle e do rearranjo *RET/PTC1*; C, amostra apresentando amplificação do gene controle e do rearranjo *RET/PTC3*.

**Figura 23** - Curvas de amplificação para amostras de PTC com e sem rearranjo *RET/PTC1* e *RET/PTC3* qRT-PCR

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de expressão proteica por imunistoquímica nos diferentes subgrupos foram analisados pelos testes estatísticos de T de Student, ANOVA, Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney e correlação de Spearman. A comparação dos resultados moleculares (rearranjos *RET/PTC1* e *RET/PTC3*) foi avaliada pelo teste Mann-Whitney. A comparação dos resultados moleculares relativos à presença da mutação V600E em *BRAF* foi feita através do teste do Qui-Quadrado de Pearson. O valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CASUÍSTICA

De acordo com os parâmetros estabelecidos para caracterização da intensidade da TA, dos 102 pacientes selecionados, 32 foram classificados como T0 (sem tireoidite). Dos 70 restantes, 30 foram classificados no subgrupo T1 (tireoidite leve), 16 pacientes para o subgrupo T2 (tireoidite moderada) e 24 para o subgrupo T3 (tireoidite intensa).

A classificação pelo gênero reuniu 90 pacientes no sexo feminino e 12 no sexo masculino. Tabulando gênero e intensidade de TA, foram encontradas 27 mulheres com T1, 15 com T2, 23 com T3 e 25 sem TA. Nos homens, 3 com T1, 1 com T2, 1 com T3 e 7 sem sinais de TA.

A avaliação da idade dos pacientes, correlacionada à intensidade de TA, mostrou média aritmética e mediana respectivamente de 46,1 e 46 para o subgrupo T1, 47,67 e 48 para T2, 39,71 e 42 para T3 e 42,38 e 43 para T0.

O tamanho do PTC foi comparado com a intensidade de TA, obtendo-se os seguintes valores médios: 1,55cm para T1; 1,42cm para T2; 1,51 para T3 e 1,54 para T0.

Os dados acima podem ser observados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Distribuição dos pacientes segundo a intensidade de TA, gênero, idade e tamanho do PTC.

Intensidade da Tireoidite		T1	T2	T3	T0	Total
Paciente	Feminino (%)	27 (26,5)	15 (14,8)	23 (22,6)	25 (24,5)	90 (88,4)
	Masculino (%)	3 (2,9)	1 (0,9)	1 (0,9)	7 (6,9)	12 (11,6)
	Total	30 (29,4)	16 (15,7)	24 (23,5)	32 (31,4)	102 (100)
Idade	Média	46,1	47,6	39,7	42,3	_____
	Mediana	46	48	42	43	_____
Tamanho PTC	cm	1,55	1,42	1,51	1,54	_____

## 4.2 IMUNOISTOQUÍMICA

Em relação à expressão das diversas proteínas estudadas, foi feita uma primeira análise estatística comparando pacientes T0 (sem tireoidite) com pacientes T1, T2 e T3 (com tireoidite). Estes resultados podem ser apreciados na Tabela 3.

Essa análise revelou que p63 (marcação nuclear) não demonstrou diferença significativa entre os dois grupos, nem na porcentagem da área nuclear corada, nem na intensidade de coloração em cada núcleo. Na avaliação das proteínas relacionadas às MAPKs, foram encontradas diferenças significativas em Ras, com maior expressão no grupo com TA, tanto no citoplasma ( $p < 0,0001$ ), como na marcação de membrana ( $p = 0,003$ ), e em ERK1/2, superexpressa no grupo com TA (intensidade nuclear) com  $p = 0,002$ . Nas moléculas de adesão, E-caderina não apresentou diferença, porém CD44 (marcação membrana) evidenciou nítida e significativa diferença ( $p < 0,0001$ ), com maior expressão no grupo com tireoidite. A via

Wnt não mostrou diferença na expressão de beta-catenina, nem no citoplasma, nem na membrana. A via dos receptores de morte mostrou valores de Fas-L e de caspase 8 sem diferenças estatisticamente significativas nos dois grupos. Nos marcadores de moléculas indutoras de interleucinas, iNOS não se mostrou válida para diferenciar pacientes com e sem TA, porém COX-2 evidenciou importante diferença ( $p < 0,0001$ ), com maior expressão no grupo dos pacientes com TA. Quanto aos fatores de crescimento e diferenciação celulares, a galectina 3 e o VEGF não mostraram diferença. O índice de proliferação celular (Ki-67) também foi indiferente, a exemplo da caspase 3 clivada como índice de apoptose. A proteína Fas, outro marcador de apoptose, apresentou importante superexpressão no grupo com TA ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3** - Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância da expressão proteica mediante análise comparativa entre os grupos com TA (T1, T2 e T3) e sem TA (T0).

Proteínas		Tireoidite		Não Tireoidite		p
		média	DP	média	DP	
<b>Pesquisa de células indiferenciadas:</b>						
	porcentagem	59,76	14,37	56,39	18,68	0,495
<b>p63</b>	Intensidade no núcleo	76,72	7,63	76	8,76	0,441
<b>Via das MAPquinases:</b>						
	Intensidade no citoplasma	137,51	10,07	127	14,86	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>Ras</b>	Intensidade na membrana	142,62	11,73	133,46	15,33	<b>0,003</b>
	Intensidade no citoplasma	89,86	7,85	89,86	9,14	0,999
	porcentagem	17,23	16,58	17,81	17,72	0,949
<b>AKT-1</b>	Intensidade no núcleo	122,08	8,24	122,43	7,4	0,846
	porcentagem	9,73	5,18	7,79	4,51	0,090
<b>ERK-1/2</b>	Intensidade no núcleo	74,17	5,6	71,52	4,42	<b>0,002</b>
<b>Moléculas de adesão:</b>						
<b>e-caderina</b>	Intensidade na membrana	96,94	8,8	93,79	7,11	0,083
<b>CD44</b>	Intensidade na membrana	122,21	13,63	108,79	17,43	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>Ativação da via de sinalização Wnt:</b>						
	Intensidade no citoplasma	108	16,53	105,87	21,81	0,591
<b>beta catenina</b>	Intensidade na membrana	123,9	14,99	121,53	15,98	0,472
<b>Via do receptor de morte:</b>						
	Intensidade na membrana	99,29	6,16	101,05	8,4	0,545
<b>Fas-L</b>	Intensidade no citoplasma	93,3	6,63	89,6	17,97	0,458
	Intensidade no citoplasma	159,58	15,71	157,88	14,88	0,139
<b>caspase 8</b>	porcentagem	88,51	4,23	88,76	12,46	0,857
	Intensidade no núcleo	164,66	4,35	162,68	10,91	0,464

## Cont/ Tabela 3

Indução de interleucinas:						
iNOS	Intensidade no citoplasma	127,74	19,32	123,7	21,79	0,499
COX-2	Intensidade no citoplasma	127,70	12,53	92,99	16,68	<b>0,0001</b>
Fatores de crescimento/diferenciação celular						
	Intensidade no citoplasma	127,42	18,86	129,16	22,47	0,704
galectina 3	Intensidade na membrana	141,09	19,67	142,95	18,82	0,870
	Intensidade no citoplasma	55,62	4,13	55,8	2,78	0,244
VEGF	Intensidade na membrana	62,29	7,18	62,18	4,66	0,452
Índices proliferativo e de apoptose						
	porcentagem	4,5	2,23	4,31	2,49	0,399
Ki-67	Intensidade no núcleo	63,12	6,25	63,75	7,01	0,910
Caspase 3 clivada	Intensidade no citoplasma	60	4,32	59,22	3,08	0,634
Fas	Intensidade na membrana	154,34	13,93	141,06	11,42	<b>&lt; 0,0001</b>

**Legenda:** Porcentagem = área positiva / área total (positiva + negativa); intensidade = intensidade da imunocoloração; DP=desvio-padrão; p = significância estatística.

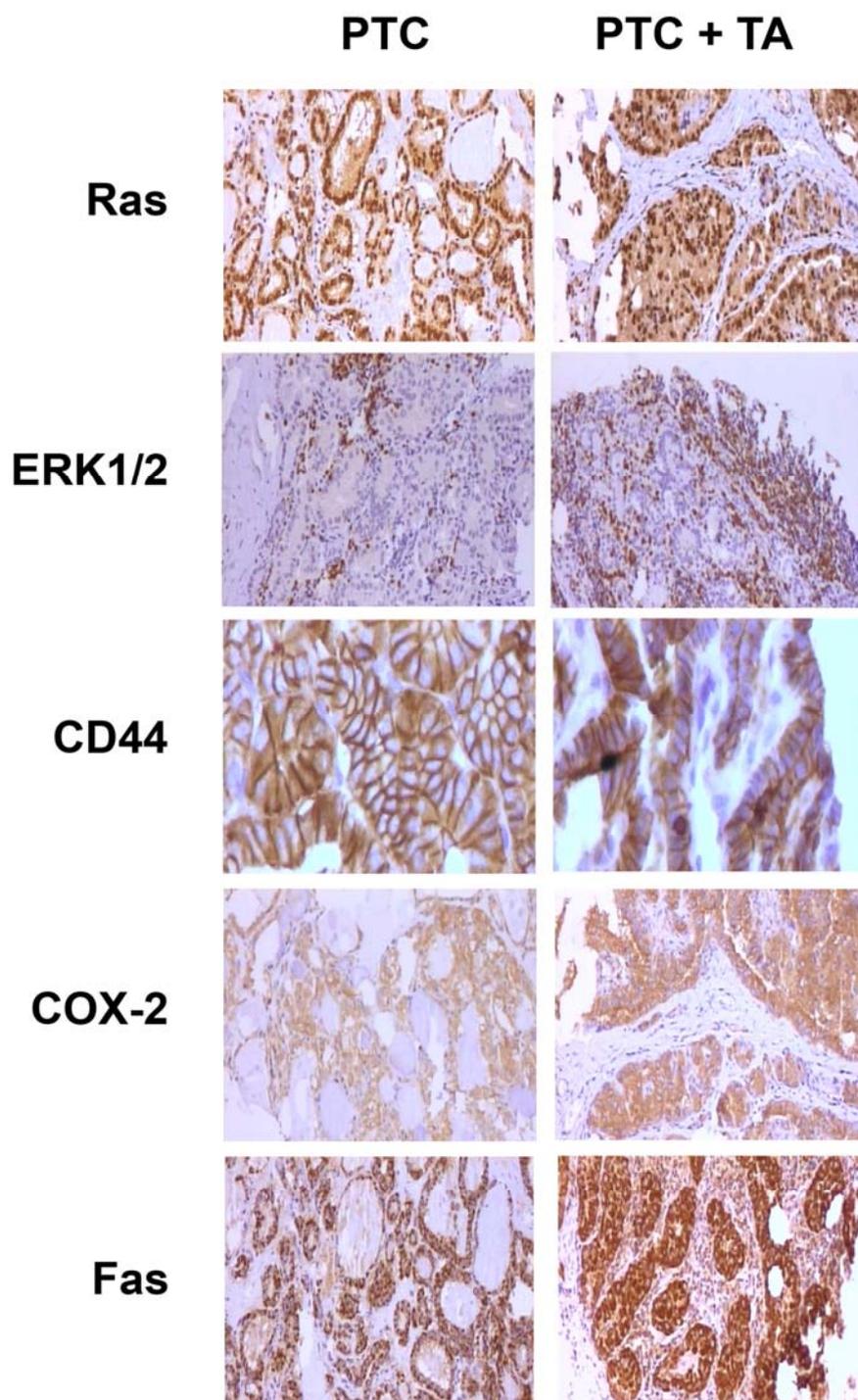
Buscando uma maior compreensão desses resultados, foi realizada uma segunda avaliação estatística, desta vez excluindo o subgrupo T1 e comparando apenas os casos de TA de maior intensidade (T2/T3) contra o subgrupo sem TA (T0), obtendo-se os seguintes resultados: 1- Ras continua diferenciando os grupos com e sem TA, porém em menor intensidade; 2- ERK1/2 passou a diferenciar os grupos não só pela maior intensidade de coloração como também pela porcentagem de área nuclear imunocorada; 3- CD44 e Fas não sofreram alteração, mantendo-se importantes marcadores proteicos na diferenciação entre os pacientes portadores de PTC com TA

daqueles sem TA associada; 4- A proteína COX-2 continua válida para diferenciação dos grupos com e sem TA, mais intensamente (tabela 4).

**Tabela 4** - Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância da expressão proteica mediante análise comparativa entre os grupos com TA de maior intensidade (T2 e T3) e sem TA (T0).

Proteínas	Tireoidite (T2/T3)		Não Tireoidite (T0)		p	
	média	DP	média	DP		
<b>Via das MAPquinases:</b>						
	Intensidade no citoplasma	138,50	10,29	127	14,86	<b>0,0004</b>
<b>Ras</b>	Intensidade na membrana	142,30	11,95	133,46	15,33	<b>0,009</b>
	porcentagem	10,62	5,38	7,79	4,51	<b>0,018</b>
<b>ERK1/2</b>	Intensidade no núcleo	75,93	5,51	71,52	4,42	<b>0,0001</b>
<b>Moléculas de adesão:</b>						
<b>CD44</b>	Intensidade na membrana	126,70	14,04	108,79	17,43	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Indução de interleucinas:</b>						
<b>COX-2</b>	Intensidade no citoplasma	127,70	12,32	92,99	16,68	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Apoptose:</b>						
<b>Fas</b>	Intensidade na membrana	147,90	13,37	141,06	11,42	<b>0,0005</b>

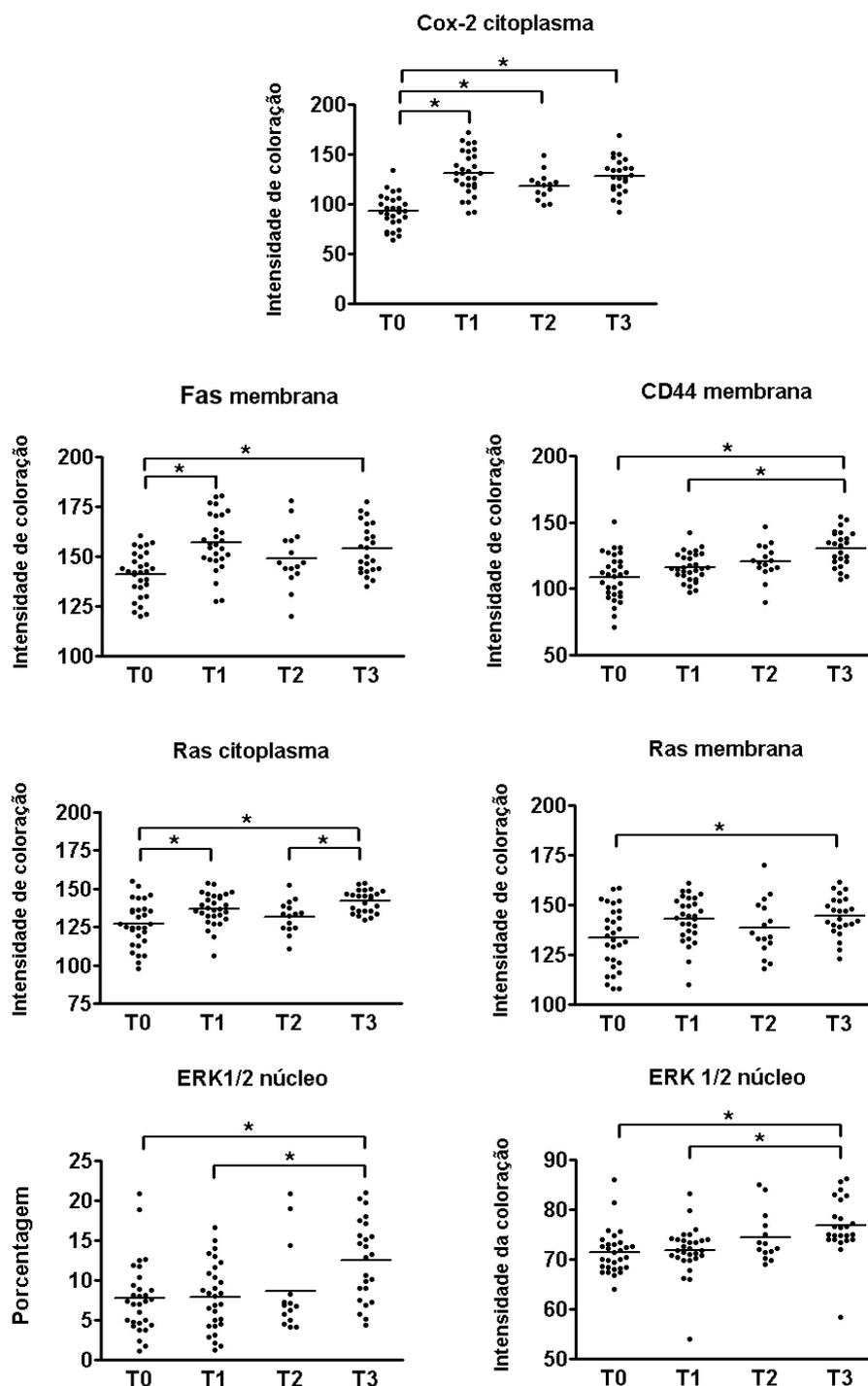
**Legenda:** Porcentagem = área positiva / área total (positiva + negativa); intensidade = intensidade da imunocoloração. DP = desvio-padrão, p = significância estatística.



**Legenda:** Painel imunoistoquímico representativo das proteínas que apresentaram diferença estatística nos níveis de expressão em pacientes com e sem TA.

**Figura 24** - Painel imunoistoquímico das proteínas diferencialmente expressas.

A seguir, foram realizadas análises estatísticas comparando todos os subgrupos de tireoidite entre si em relação a cada uma das 16 proteínas estudadas (T0 x T1 X T2 X T3), encontrando-se as seguintes proteínas diferentemente expressas: 1- Ras: na marcação de citoplasma, diferencia T0 de T1 ( $p < 0,05$ ), T0 de T3 ( $p < 0,001$ ) e T2 de T3 ( $p < 0,05$ ); na marcação de membrana, Ras diferencia apenas T0 de T3 ( $p < 0,05$ ); 2- A proteína ERK1/2, na avaliação feita pelo ACIS III sobre a porcentagem da área nuclear imunocorada, diferencia os subgrupos T0 de T3 ( $p < 0,01$ ) e T1 de T3 ( $p < 0,05$ ). A mesma proteína, na avaliação da intensidade de coloração nuclear, diferencia também T0 de T3 ( $p < 0,001$ ) e T1 de T3 ( $p < 0,001$ ); 3- CD44 mostra diferentes expressões nos subgrupos T0 de T3 ( $p < 0,001$ ) e T1 de T3 ( $p < 0,01$ ); 4- COX-2 diferenciou os subgrupos T0 de T1 ( $p < 0,001$ ), T0 de T2 ( $p < 0,01$ ) e T0 de T3 ( $p < 0,001$ ); finalmente, 5- Fas, nesta análise multivariada, mostrou-se capaz de diferenciar os subgrupos T0 de T1 ( $p < 0,001$ ) e T0 de T3 ( $p < 0,01$ ) (Figura 25).



**Legenda:** Gráficos das análises das proteínas COX-2, CD44, CD95, Ras e ERK 1/2.

\* =  $p < 0,05$ .

**Figura 25** - Influência da intensidade da TA na diferença de expressão protéica entre pacientes com PTC.

Com base nesses achados, foram feitas análises de correlação estatística entre a intensidade de imunexpressão e a intensidade da tireoidite nessas proteínas diferentemente expressas.

O coeficiente de correlação indica a força e a direção do relacionamento linear entre duas variáveis aleatórias e é expresso por “r”. Como resultado, obtivemos os seguintes coeficientes de correlação:

$$r_{\text{COX-2}} = 0,52 \text{ (p} < 0,001\text{);}$$

$$r_{\text{Fas}} = 0,30 \text{ (p} = 0,004\text{);}$$

$$r_{\text{CD44}} = 0,49 \text{ (p} < 0,001\text{);}$$

$$r_{\text{RAS citoplasma}} = 0,38 \text{ (p} < 0,001\text{);}$$

$$r_{\text{RAS membrana}} = 0,24 \text{ (p} = 0,017\text{);}$$

$$r_{\text{ERK1/2 percentagem}} = 0,32 \text{ (p} = 0,002\text{);}$$

$$r_{\text{ERK1/2 intensidade}} = 0,48 \text{ (p} < 0,001\text{)}.$$

### 4.3 ANÁLISE DA MUTAÇÃO V600E DO GENE *BRAF*

Foram submetidas ao pirosequenciamento, para pesquisa da mutação V600E, 93 amostras de PTC, das quais 49 (48%) mostraram-se mutadas e 44 (43,1%) não mutadas, conforme a Tabela 5. Na avaliação estatística entre os grupos sem tireoidite (T0) e com tireoidite (T1, T2 e T3) não observamos diferença. Em seguida, fizemos mais 3 avaliações, T0 com T1, T0 com T2 e T0 com T3, também sem diferença estatística. Portanto, em relação à mutação V600E do gene *BRAF*, na nossa casuística não houve

diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com e sem tireoidite autoimune.

**Tabela 5** - Distribuição da mutação V600E do gene *BRAF* nos grupos com e sem TA.

V600E	MUTADO	NÃO MUTADO	PERDA	TOTAIS
COM TA (%)	34 (33,4)	31 (30,4)	5 (4,9)	70 (68,6)
SEM TA (%)	15 (14,7)	13 (12,7)	4 (3,9)	32 (31,4)
TOTAIS	49 (48)	44 (43,1)	9 (8,8)	102 (100)

#### 4.4 ANÁLISE DOS REARRANJOS *RET/PTC1* E *RET/PTC3*

Para avaliar o padrão de expressão gênica dos rearranjos *RET/PTC1* e *RET/PTC3* em amostras de PTC com e sem TA, foram extraídas 102 amostras de RNA, das quais 84 (25 sem TA e 59 com TA) apresentaram boa integridade para a avaliação do rearranjo por qRT-PCR.

O rearranjo *RET/PTC1*, mostrou amplificação em 29,4% das amostras de PTC com TA e 12,7% das amostras de PTC sem TA, conforme a Tabela 6 (Figura 26).

**Tabela 6** - Distribuição do rearranjo *RET/PTC1* nos grupos com e sem TA.

<i>RET/PTC1</i>	MUTADO	NÃO MUTADO	PERDA	TOTAIS
COM TA (%)	30 (29,4)	29 (28,4)	11 (10,8)	70 (68,6)
SEM TA (%)	13 (12,7)	12 (11,8)	7 (6,9)	32 (31,4)
TOTAIS (%)	43 (42,2)	41 (40,2)	18 (17,6)	102 (100)

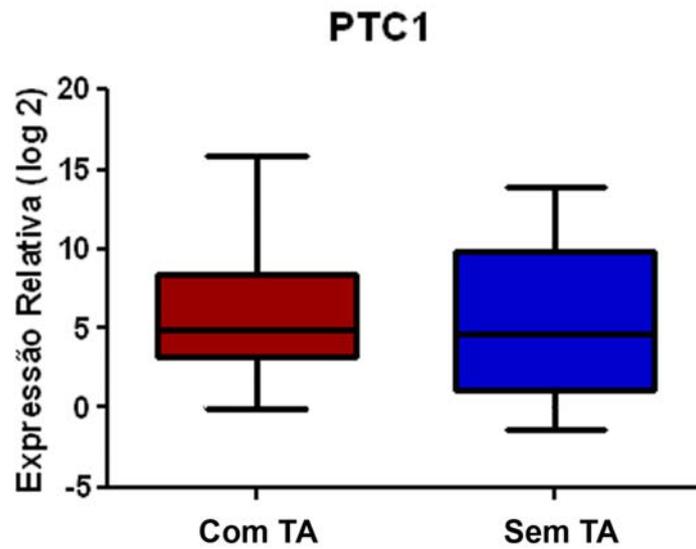
O rearranjo *RET/PTC3* foi observado em 15,6% dos casos com TA e em 6,9% das amostras de PTC sem TA, conforme a Tabela 7 (Figura 27).

**Tabela 7** - Distribuição do rearranjo *RET/PTC3* nos grupos com e sem TA.

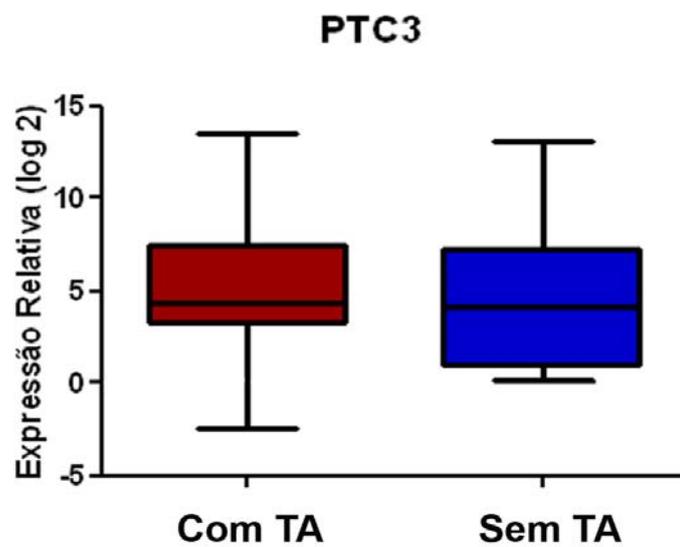
<i>RET/PTC3</i>	MUTADO	NÃO MUTADO	PERDA	TOTAIS
COM TA (%)	16 (15,6)	43 (42,2)	11 (10,8)	70 (68,6)
SEM TA (%)	7 (6,9)	18 (17,6)	7 (6,9)	32 (31,4)
TOTAIS (%)	23 (22,6)	61 (59,8)	18 (17,6)	102 (100)

A avaliação estatística para a expressão gênica de *RET/PTC1* não demonstrou diferença entre os grupos com ou sem TA. Em seguida, comparamos os pacientes sem tireoidite separadamente com cada um dos subgrupos de tireoidite, não observando diferença estatisticamente significativa entre os pacientes portadores e não portadores de tireoidite.

Procedemos da mesma forma na análise de rearranjo *RET/PTC3* e também não observamos diferenças estatísticas. Concluímos assim que também para este rearranjo nossos pacientes não evidenciaram diferença estatisticamente significativa.



**Figura 26** - Comparação da expressão relativa do rearranjo *RET/PTC1* em PTC com e sem TA.



**Figura 27** - Comparação da expressão relativa do rearranjo *RET/PTC3* em PTC com e sem TA.

## 5 DISCUSSÃO

A primeira referência que encontramos na literatura a respeito da associação entre PTC e TA foi publicada por Stewart Lindsay, patologista da Universidade da Califórnia, que definiu os critérios morfológicos característicos para identificar os 3 tipos básicos de tireoidite crônica, a saber, a tireoidite autoimune (linfocitária, Hashimoto), a tireoidite granulomatosa (de células gigantes) e a tireoidite fibrosa (de Riedel). (LINDSAY et al. 1952). Neste trabalho, foi observada uma diferença substancial na incidência de PTC em pacientes com TA (12%) quando comparados a pacientes sem TA (3%), para um  $p=0,001$ .

A partir desse artigo científico, inúmeros estudos foram publicados nos últimos 57 anos tentando explicar a natureza da associação entre TA e PTC.

Alguns autores acreditam que a célula epitelial do folículo tireoideano, já transformada pela presença da TA em célula metaplásica oxifílica (célula de Hurthle), pode transformar-se na célula neoplásica que caracteriza o PTC (PRASAD et al. 2004), possivelmente através de alguma ligação molecular ainda desconhecida (KANG et al. 2007). Essa hipótese poderia explicar a maior incidência de PTC em pacientes portadores de TA. Alguns autores não só concordam com essa idéia como até propõem um esquema especial de tratamento para os pacientes portadores de TA (WALKER e PALOYAN 1990).

Outros pesquisadores refutam essa hipótese, que parece não ter um embasamento tão consistente quando são realizados levantamentos epidemiológicos com grande número de pacientes. Tais autores acreditam que a associação PTC/TA é meramente casual (GOLDMAN et al. 1990; NIKIFOROV 2006b).

Analisando esse tema sob um ponto de vista essencialmente prático, a resposta a esta questão traria um grande benefício para os pacientes portadores de TA, principalmente pela possibilidade que hoje existe de se diagnosticar a TA através do estudo morfológico, imunoistoquímico e molecular em material obtido por uma simples punção aspirativa com agulha fina dirigida por ultrassonografia, procedimento rápido, de fácil execução, com poucos efeitos colaterais, de baixo custo e que pode evitar um ato cirúrgico desnecessário.

Com o finalidade de comparar objetivamente pacientes com e sem TA, todos portadores de PTC, do banco de tumores do hospital A.C.Camargo, foram selecionadas 102 amostras submetidas a biópsia de congelação, das quais 70 apresentavam também TA. Nesse material, tivemos 81% de pacientes do sexo feminino e 19% do sexo masculino, o que está de acordo com os dados de literatura (VANDER et al. 1968; UMPIERREZ et al. 2003). O tamanho do PTC variou de 1 a 3,5 cm, com uma média de 1,5 cm, não tendo sido encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes estudados.

Nossa preocupação, logo no início da pesquisa, foi caracterizar de uma forma mais objetiva os parâmetros histológicos que definem a TA. Na

rotina de patologia cirúrgica, tal diagnóstico é estabelecido quando os cortes histológicos demonstram algumas modificações na morfologia tireoideana, tais como infiltrado linfocitário, formação de folículos linfóides com centros germinativos proeminentes, fibrose no estroma, folículos atróficos, além de alterações no epitélio folicular, caracterizadas por metaplasia oxifílica e atipias nucleares representadas por cariomegalia, irregularidades na carioteca, clareamento da cromatina e pseudoinclusões intranucleares.

Nesse contexto, o diagnóstico de TA depende da liberalidade com que cada patologista examina os cortes histológicos da lesão, o que tem repercussão direta no estudo da incidência e de outros informes epidemiológicos importantes relacionados à TA.

Por outro lado, tendo em vista a importância da caracterização prática e objetiva da tireoidite especificamente na nossa pesquisa, cujo objetivo maior é comparar pacientes portadores de carcinoma associado a tireoidite com pacientes também com carcinoma, porém sem TA, deparamo-nos com algumas questões importantes que estavam sem resposta, tais como: de que forma diferenciar os pacientes sem TA daqueles portadores de TA leve, ou seja, a partir de que quantidade de linfócitos deveríamos incluir um paciente no grupo de TA ? Como quantificar os linfócitos representativos de TA daqueles usualmente presentes em pacientes portadores de PTC? E os pacientes cujas lâminas mostravam também folículos linfóides com centros germinativos proeminentes, mas sem células oxifílicas? E aqueles que, além dessas alterações, apresentavam também metaplasia de células oxifílicas? Em resumo, para que os resultados da nossa pesquisa tivessem maior

objetividade, sentimos a necessidade de graduar morfológicamente a intensidade do processo inflamatório, para depois comparar esses pacientes frente aos resultados fornecidos pela imunohistoquímica e pela análise molecular.

Não encontramos na literatura uma classificação de tireoidite que nos permitisse estratificar os nossos pacientes pela intensidade de TA. Assim, definimos nossos próprios parâmetros histológicos para subdivisão dos pacientes com TA em 3 gradações, de acordo com os parâmetros morfológicos descritos no item Pacientes e Métodos.

Redistribuídos os pacientes, os subgrupos T0 (sem TA), T1 (TA leve) e T3 (TA intensa) ficaram praticamente com o mesmo número de pacientes, apenas o subgrupo T2 (TA moderada) ficou com cerca da metade de casos.

Em tecidos normais, as células tendem a crescer e sofrer divisões e sua taxa de proliferação depende da disponibilidade de nutrientes e de sinais químicos estimuladores que provêm de outras células. Estes sinais atuam sobrepujando os mecanismos intracelulares de frenagem, que tendem a restringir o crescimento celular e bloquear a progressão do ciclo celular.

Usualmente, as neoplasias malignas resultam de mutações que libertam as células dos controles normais de proliferação e sobrevivência celular, tornando-as autônomas. Essas falhas no controle tanto da proliferação como da morte celular não são o único defeito das células cancerosas, porém constituem uma marca essencial dessa doença. Assim, a importância de se analisar vias responsáveis por proliferação e morte fica clara quando o assunto é neoplasia.

Antes da invenção da imunohistoquímica, o diagnóstico diferencial entre dois ou mais tumores que têm aspecto histológico semelhante era baseado tão-somente na experiência pessoal de cada patologista. Esse fato dificultava sobremaneira o tratamento de pacientes portadores desses tumores de difícil diagnóstico, pois a conduta adequada era mostrar as lâminas e aguardar a opinião do patologista especialista naquele tipo de tumor. Com a invenção e a popularização do estudo imunohistoquímico, tornou-se possível distinguir com bastante segurança tais tipos de tumores, através da expressão das proteínas que os compõem, identificadas mediante a utilização de anticorpos marcados, mono ou policlonais, que só reagem quimicamente com os antígenos (proteínas) específicos iguais àqueles a partir dos quais foram produzidos.

Com o objetivo específico de encontrar eventuais diferenças na expressão das proteínas presentes em células neoplásicas de PTC em pacientes com e sem TA, selecionamos algumas vias de sinalização relacionadas à divisão e morte celular e escolhemos 16 proteínas para representá-las.

No nosso estudo, constatamos que em pacientes portadores de PTC, a expressão de 5 dessas 16 proteínas permite diferenciar aqueles que têm TA daqueles que não têm TA associada.

Na via de sinalização das MAPKs, encontramos diferença nas proteínas Ras e Erk1/2.

A proteína Ras pertence a uma família de proteínas monoméricas diretamente ligadas à via de sinalização das MAPKs, regulando a proteína

ERK1/2, componente fundamental da maquinaria responsável pela proliferação celular normal e neoplásica (VANTAGGIATO et al. 2006). Além disso, a família de proteínas Ras regula outra via de sinalização muito importante na patogênese do carcinoma da tireóide, a via PI3K/Akt-1, que também conduz à proliferação celular. Mutações de *RAS* podem provocar a autofosforilação constitutiva destas cascatas, levando à formação de tumores benignos e malignos da tireóide (FAGIN 2002). A proteína Ras é codificada por 3 proto-oncogenes que codificam 4 isoformas proteicas (H-Ras, K-Ras4A, K-Ras4B e N-Ras), as quais funcionam como interruptores moleculares ligados a uma complexa trama de cascatas de sinalização (MITIN et al. 2005). A ligação de fatores extracelulares, por exemplo, o fator de crescimento epitelial (EGF, do inglês *Epidermal Growth Factor*), com os receptores tirosina quinases presentes na membrana celular provoca a ativação destes receptores e ao mesmo tempo a autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina, que se ligam a proteínas de sinalização, deslocando-se no interior da célula para a membrana celular onde, por proximidade, ativam a proteína Ras. Esta, por sua vez, estimula a cascata de proteínas quinases que promove a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência da célula, dentre outras funções regulatórias (MARGOLIS e SKOLNIK 1994; OMEROVIC et al. 2007). Mutações nos códons 12, 13 e 61 do gene *RAS* provocam autofosforilação da proteína Ras em cerca de 30% dos cânceres humanos (BOS 1989).

No estudo da proteína Ras, nossos dados mostram nítida superexpressão no grupo com TA, sendo essa diferença de expressão mais

intensa na marcação de citoplasma ( $p < 0,0001$ ), porém também significativa na marcação de membrana ( $p = 0,003$ ), com expressão diferencial nos diversos subgrupos de TA. O subgrupo T1 potencializa a proteína Ras para diferenciar pacientes portadores de PTC associado a TA daqueles sem TA.

As proteínas quinases reguladas por sinais extracelulares p44 (Erk1) e p42 (Erk2) são membros das MAPKs e podem mediar tanto a proliferação celular como a apoptose. A retenção de Erk1/2 no citosol potencializa a atividade catalítica de algumas proteínas proapoptóticas, tais como a Dap quinase, além de inibir a sobrevivência e a proliferação celular por não ativar fatores de transcrição de localização intranuclear (MEBRATU e TESFAIGZI 2009).

Para Erk1/2, nossos resultados evidenciam uma curva nitidamente ascendente de T0 para T3, isto é, quanto mais intensa foi a tireoidite, maior foi também a capacidade de Erk1/2 diferenciar os pacientes com e sem TA, tanto na mensuração imunoistoquímica da porcentagem de área nuclear imunocorada quanto na intensidade dessa imunocoloração em cada núcleo individualmente. O subgrupo T1 minimiza a capacidade da proteína Erk1/2 em diferenciar pacientes com TA de pacientes sem TA.

Estes achados confirmam pesquisa realizada na população coreana, que estudou o PTC e a TA através de imunoistoquímica, avaliando a expressão de Ras e Erk1/2 em células neoplásicas de PTC, em células oxifílicas características de TA e em células foliculares normais da tireóide (KANG et al. 2007). Tais autores encontraram níveis altos de ambas as proteínas no PTC e na TA e não nas células foliculares normais. Esta

conclusão está também de acordo com outros autores (MECHLER et al. 2001; NIKIFOROVA et al. 2002; HUNT et al. 2002; HWANG et al. 2004) e indica que cascatas de sinalização das quais Ras faz parte têm influência direta na tumorigênese da célula neoplásica do PTC e também na patogênese da célula oxifílica que é a marca principal da TA. Levanta-se a hipótese de que provavelmente deva existir uma ligação molecular de natureza ainda não definida entre a metaplasia de células oxifílicas característica da TA e a célula neoplásica do PTC (KANG et al. 2007).

Diferentes células possuem diferentes moléculas de adesão na sua membrana plasmática e tendem a aderir seletivamente a outras células vizinhas do mesmo tipo através de ligações homofílicas. Essa seletividade é uma propriedade celular importante, que impede a união de tipos diferentes de células, o que provocaria o aparecimento de um tecido heterogêneo, totalmente descaracterizado, com perda da sua função original.

A glicoproteína CD44 é uma molécula multiestrutural e multifuncional que faz parte de uma família de receptores transmembrana imunologicamente relacionados, associados à adesão célula-célula, à adesão célula-matriz, à ativação de linfócitos, ao crescimento tumoral e à formação de metástases. Outras funções de CD44 no metabolismo celular incluem migração celular, ativação dos linfócitos, mielopoiese, linfopoiese, angiogênese e liberação de citocinas. O principal ligante de CD44 é o ácido hialurônico ou hialuronato, glicosaminoglicana não sulfatada, componente abundante da matriz extracelular e dos tecidos epitelial e nervoso (FRASER et al. 1997). Outros ligantes de CD44 são substâncias da matriz extracelular,

tais como o sulfato de condroitina, o sulfato de heparitina, a fibronectina, a serglicina e a osteopontina (WANG e DENHARDT 2008).

A proteína CD44 é formada por 20 éxons, dos quais os 5 primeiros e os 5 últimos são constantes; os 10 éxons restantes, localizados no meio da molécula, podem sofrer *splicing* alternativo, formando pelo menos 20 isoformas da proteína, com pesos moleculares que variam de 85 a 230 kDa (NAOR et al. 1997).

A expressão de CD44 é associada à alta taxa de divisão celular e a união com seus ligantes induz a célula tumoral a produzir fatores autócrinos de crescimento (SNEATH e MANGHAM 1998). O PTC é a neoplasia da tireóide que expressa CD44 com maior frequência, o que confere às suas células habilidade para invadir linfonodos regionais e aí permanecer inativas durante anos (FIGGE et al. 1994). Células epiteliais proliferantes e linfócitos ativados constituem os locais de maior expressão de CD44, cuja isoforma v6 é a mais frequentemente encontrada no PTC, ao contrário do FTC, onde não se observa a expressão desta isoforma (RUDZKI e JOTHY 1997).

Nossos resultados indicam superexpressão de CD44 nos pacientes portadores de TA em relação àqueles sem TA, sendo a magnitude dessa diferença diretamente proporcional à intensidade da TA. Na avaliação dos subgrupos, CD44 diferencia com ampla significância estatística pacientes T0 de T1 e T0 de T3.

Estes achados estão de acordo com a literatura, que até mesmo referencia CD44 como marcador de PTC (ARCINAS et al. 2009) e como

marcador de diagnóstico diferencial entre FTC e adenoma folicular em material obtido por PAAF (MARUTA et al. 2004).

Uma reação inflamatória pode estimular a carcinogênese e potencializar o crescimento e a progressão de uma neoplasia através da instabilidade genômica que provoca na célula (PRESCOTT e FITZPATRICK 2000; PRESCOTT 2000), graças à ação das prostaglandinas que produz. Múltiplos mecanismos de ação estão envolvidos nessa ação, tais como a inibição da apoptose (TSUJII e DUBOIS 1995), o aumento da capacidade invasiva das células neoplásicas (TSUJII et al. 1997), a angiogênese tumoral (TSUJII et al. 1998) e a inibição da vigilância imunológica (HWANG et al. 1998), dentre outros.

Das moléculas de indução de interleucinas que selecionamos na nossa pesquisa, a enzima ciclo-oxigenase (COX), que corresponde à prostaglandina H2 sintase, é uma glicoproteína dimérica localizada na membrana celular, apresentando pelo menos duas isoformas, a COX-1 e a COX-2, estruturalmente distintas, com 60% de homologia na sequência de aminoácidos do seu DNA complementar. A COX-1 é constitutiva, presente em diversos tecidos e produz prostaglandinas com funções homeostáticas (DUBOIS et al. 1998). A COX-2, por sua vez, é induzida em locais de inflamação e sua superexpressão está associada a diversos tumores, tais como carcinoma colorretal (EBERHART et al. 1994), carcinoma gástrico (RISTIMAKI et al. 1997; VAN REES et al. 2002), carcinoma esofágico (ZIMMERMANN et al. 1999), carcinoma prostático (MADAAN et al. 2000), carcinoma mamário (HWANG et al. 1998) e outros.

A partir do ácido aracdônico e de outros ácidos graxos essenciais livres, COX-2 sintetiza os prostanóides, representados pelas seguintes proteínas: 1- prostaglandinas, mediadores da resposta inflamatória e da reação anafilática; 2- prostaciclina, que atua na fase resolvente da inflamação; e 3- tromboxanos, mediadores de vasoconstrição (VANE et al. 1998). Em condições normais, COX-2 não é expressa nas células foliculares da tireóide, ao contrário do que ocorre no PTC, cujas células neoplásicas apresentam 100% de expressão. A COX-2 depende de outros estimulantes, tais como fatores de crescimento, oncogenes e citocinas (LO et al. 2005).

Na nossa pesquisa, a proteína COX-2 mostrou-se, como esperado, positiva nos dois grupos de pacientes estudados mas, com uma diferença estatisticamente significativa, superexpressa nos subgrupos com TA. Em relação aos subgrupos, COX-2 consegue diferenciar T0 de T1, T0 de T2 e T0 de T3.

Este resultado está de acordo com os dados da literatura, segundo os quais há superexpressão de COX-2 em tumores da tireóide (KIM et al. 2003) e também em casos de tireoidite autoimune (CORNETTA et al. 2002).

A apoptose, um dos tipos de morte celular programada, é um processo fisiológico normal que faz parte das células de todos os organismos vivos e tem grande importância no desenvolvimento embrionário, no funcionamento do sistema imunológico e na homeostase tissular (KERR et al. 1972; ELLIS et al. 1991).

Distúrbios da apoptose constituem um elo frequente de ligação com a patogênese de diversas doenças, dentre as quais a tireoidite autoimune (BOSSOWSKI et al. 2006).

Dentre os tumores da tireóide, o PTC é aquele em que aparecem com maior frequência as células imunologicamente competentes (BAKER e FOSSO 1993), além das respostas imunológicas específicas, mediadas por células, contra antígenos tireoideanos (JUHASZ et al. 1989).

A apoptose desencadeada pela ativação de Fas dirige-se, assim, não contra as células foliculares da tireóide, mas sim contra os linfócitos invasivos, desempenhando um papel fundamental no controle do sistema imunológico através da homeostasia de linfócitos T, cuja ativação leva à maior expressão de FasL. Inicialmente, esses linfócitos são resistentes à ligação com Fas, mas quanto mais intensa for a sua ativação, mais aumenta sua sensibilidade, resultando por fim no aparecimento da apoptose.

Este efeito citotóxico contra o linfócito não é direto, concretizando-se provavelmente através de citocinas (WEETMAN e MCGREGOR 1994), das quais o interferon gama (IFN- $\gamma$ ), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e o interferon beta (IFN- $\beta$ ) são os mais importantes. Estas citocinas sensibilizam também as células foliculares, preparando-as para a apoptose mediada por Fas, caspase-8 e caspase-3 (STASSI et al. 2000), que, como acima exposto, acaba não ocorrendo. A expressão de Fas na membrana da célula neoplásica, por este motivo, torna-se cerca de 3 vezes maior do que na célula folicular normal (ARSCOTT et al. 1999).

Outro mecanismo citotóxico contra os linfócitos agressores é a ativação da via de sinalização da perforina, proteína responsável pela formação de poros na membrana celular. A perforina sai do citoplasma dos linfócitos citotóxicos e das células NK e, como o próprio nome já explica, perfura a membrana de células infectadas ou de invasores, facilitando sua destruição (HARTY et al. 2000).

Na associação de TA com PTC, a presença da resposta imunológica contra antígenos produzidos pela própria glândula tireóide tem sido relacionada a um melhor prognóstico para os pacientes, os quais têm mostrado índices melhores de sobrevida (SEGAL et al. 1985; MCCONAHEY et al. 1986; BAKER e FOSSO 1993; MANCINI et al. 1993; MATSUBAYASHI et al. 1995; KASHIMA et al. 1998).

A avaliação estatística dos nossos resultados evidenciou superexpressão significativa de Fas nos pacientes com TA em relação àqueles sem TA, com aumento progressivo dessa diferença a ponto de permitir diferenciar os subgrupos T0 de T1 e T0 de T3. Estes dados estão perfeitamente de acordo com a literatura quanto à superexpressão de Fas em pacientes portadores de PTC.

Como dito anteriormente, as neoplasias malignas representam a consequência de mutações que livram as células neoplásicas dos controles normais de proliferação e sobrevivência celular. Assim, além da análise de vias de sinalização intracelular, a busca por mutações em genes chaves tornou-se rotina nos estudos sobre o câncer. Na atualidade, os dois genes

mais estudados no PTC são o *BRAF* e o *RET/PTC* e por isso foram incluídos na nossa pesquisa.

O gene *BRAF* codifica 3 isoformas da proteína quinase RAF, ligadas à serina-treonina quinases: a Araf, a Braf e a Craf, todas essenciais à via de sinalização de MAPK. Estudos *in vitro* demonstram que Braf é a isoforma que ocupa posição central e mais importante nessa via de sinalização, estando diretamente ligada à capacidade proliferativa da célula tireoideana (MITSUTAKE et al. 2005).

A mutação ativadora do gene *BRAF*, V600E, é oncogênica e corresponde à mutação mais frequente do PTC (XING 2007). Modelos *in vivo* e *in vitro* já demonstraram que a proteína Braf ativada induz a célula folicular à transformação maligna e também a um comportamento mais agressivo do PTC (KONDO et al. 2006).

Na nossa casuística, não observamos diferença estatisticamente significativa entre os pacientes portadores de PTC com e sem tireoidite autoimune no que diz respeito à presença da mutação V600E de *BRAF*.

Outros pesquisadores avaliaram essa mesma mutação V600E, identificando-a somente em células neoplásicas de PTC e não nas células oxifílicas da TA e nem nas células foliculares normais (KANG et al. 2007).

O rearranjo do gene *RET*, descrito inicialmente por FUSCO et al. em 1987, ao avaliar 5 casos de PTC e 2 casos de metástases linfonodais, é encontrado em 1/3 dos pacientes portadores de PTC, mais comumente em crianças e jovens e também em pacientes expostos à radiação ionizante; existem já descritos pelo menos 10 tipos diferentes de *RET/PTC*, todos

resultando da fusão do domínio tirosina quinase do gene *RET* com a porção 5' de diferentes genes parceiros. Na tireoidite, a ocorrência destes rearranjos foi descrita por alguns autores mas não foi confirmada por outros, permanecendo ainda controversa (NIKIFOROV 2002).

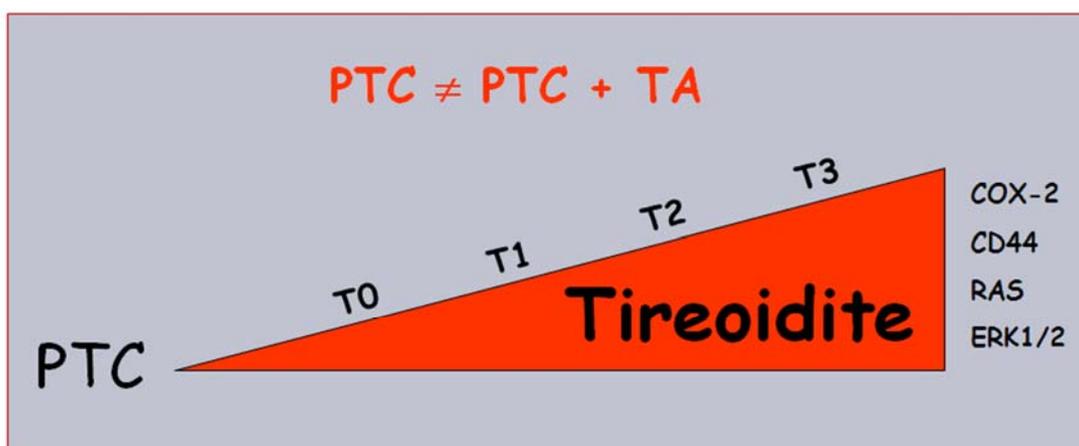
RET/PTC não parece ser um rearranjo específico da tireóide, tendo sido descrito recentemente por 3 metodologias diferentes em carcinomas peritoneais serosos (FLAVIN et al. 2009).

Nos nossos pacientes, as porcentagens de pacientes com e sem RET/PTC1 e RET/PTC3 não mostraram diferença estatisticamente significativa quando comparamos pacientes portadores de PTC associado e não associado a TA, o que está de acordo com dados recentes da literatura (KANG et al. 2007).

Finalizando, nosso trabalho demonstrou a existência de proteínas capazes de diferenciar pacientes portadores de PTC em substrato de TA daqueles que se originam em pacientes sem TA. Esta diferença mostrou-se, em alguns casos, proporcional ao grau de intensidade da TA, isto é, quanto maior foi a intensidade da TA, mais expressiva foi também a intensidade de imunomarcagem dessas proteínas, conforme indicaram os testes estatísticos (Figura 28).

Em relação às alterações genéticas (mutação V600E de *BRAF*) e cromossômicas (RET/PTC1 e RET/PTC3) que costumam ocorrer no PTC, não houve diferença estatisticamente significativa entre os mesmos grupos de pacientes estudados.

Estes resultados deverão ser analisados também através da quantificação de transcritos pela técnica de *Real-Time PCR* para cada uma das proteínas diferencialmente expressas, sendo tal estudo sequencial a esta tese.



**Legenda:** Modelo, com base estatística, propondo uma possível relação entre o nível de expressão de COX-2, CD44, RAS e ERK 1/2 e a intensidade de TA.

**Figura 28** - Esquema correlacionando imunoexpressão e intensidade da tireoidite.

## 6 CONCLUSÕES

No presente estudo, foram constatadas diferenças estatisticamente significativas entre pacientes portadores de PTC associado e não associado à TA, no tocante à expressão de proteínas relacionadas à via de sinalização das MAPKs (Ras e Erk1/2), às moléculas de adesão (CD44), às moléculas de indução das interleucinas (COX-2) e à apoptose (Fas) presentes nas células neoplásicas.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos mesmos pacientes quanto à presença da mutação V600E do gene *BRAF* e dos rearranjos RET/PTC1 e RET/PTC3 nas células neoplásicas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, et al Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. **Am J Surg Pathol** 2006; 30:216-22.

Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu Rev Immunol** 1999; 17:593-623.

Akslen LA, Haldorsen T, Thoresen SO, Glattre E. Incidence of thyroid cancer in Norway 1970-1985. Population review on time trend, sex, age, histological type and tumour stage in 2625 cases. **APMIS** 1990; 98:549-58.

Albores-Saavedra J, Henson DE, Glazer E, Schwartz AM. Changing patterns in the incidence and survival of thyroid cancer with follicular phenotype--papillary, follicular, and anaplastic: a morphological and epidemiological study. **Endocr Pathol** 2007; 18:1-7.

Anton RC, Wheeler TM. Frozen section of thyroid and parathyroid specimens. **Arch Pathol Lab Med** 2005; 129:1575-84.

Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacol Rev** 1998; 50:197-263.

Araújo Filho VJF, Moyses RA, Moyses NA, Ferraz AR. Lobo piramidal da tireóide: estudo anatômico intra-operatório. **Rev Bras Cir Cab Pesc** 2004; 33:35-7.

Arcinas A, Yen TY, Kebebew E, Macher BA. Cell surface and secreted protein profiles of human thyroid cancer cell lines reveal distinct glycoprotein patterns. **J Proteome Res** 2009; 8:3958-68.

Arif S, Blanes A, Diaz-Cano SJ. Hashimoto's thyroiditis shares features with early papillary thyroid carcinoma. **Histopathology** 2002; 41:357-62.

Arcott PL, Baker JR Jr. Apoptosis and thyroiditis. **Clin Immunol Immunopathol** 1998; 87:207-17.

Arcott PL, Stokes T, Myc A, Giordano TJ, Thompson NW, Baker JR Jr. Fas (CD95) expression is up-regulated on papillary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab** 1999; 84:4246-52.

Asa SL. The pathology of autoimmune endocrine disorders. In: Kocavs K, Asa SL, editors. **Functional endocrine pathology**. Boston: Blackwell Scientific; 1991. p.961-78.

Asa S. The pathology of thyroid cancer. In: Farid N, editor. **Molecular basis of thyroid cancer**. New York: Kluwer Academic; 2004. p.23-68.

Baker JR Jr, Fosso CK. Immunological aspects of cancers arising from thyroid follicular cells. **Endocr Rev** 1993; 14:729-46.

Baloch Z, LiVolsi VA, Jain P, et al Role of repeat fine-needle aspiration biopsy (FNAB) in the management of thyroid nodules. **Diagn Cytopathol** 2003; 29:203-6.

Baloch ZW, LiVolsi VA. Our approach to follicular-patterned lesions of the thyroid. **J Clin Pathol** 2007; 60:244-50.

Barril N, Carvalho-Sales AB, Tajara EH. Interphase cytogenetic analysis of normal tissue of thyroid gland by fluorescence in situ hybridization. **Cancer Genet Cytogenet** 1999; 114:162-4.

Benvenga S. Update on thyroid cancer. **Horm Metab Res** 2008; 40:323-8.

Biddinger PW. Normal anatomy and histology. In: Nikiforov YE, Biddinger PW, Thompson DRL, editors. **Diagnostic pathology and molecular genetics of the thyroid**. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins; 2009a. p.1-10.

Biddinger PW. Thyroiditis. In: Nikiforov YE, Biddinger PW, Thompson DRL, editors. **Diagnostic pathology and molecular genetics of the thyroid**. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins; 2009b. p.39-59.

Boikos SA, Stratakis CA. Carney complex: pathology and molecular genetics. **Neuroendocrinology** 2006; 83:189-99.

Bongarzone I, Butti MG, Coronelli S. Frequent activation of ret protooncogene by fusion with a new activating gene in papillary thyroid carcinomas. **Cancer Res** 1994; 54:2979-85.

Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Res** 1989; 49:4682-9.

Bossowski A, Moniuszko A, Bouzyk J, Urban M. [Role of apoptosis in autoimmune thyroid disorders] [abstract]. **Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw** 2006; 12:216-20.

Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic. **Adv Cancer Res** 1996; 69:135-74.

Bounacer A, Wicker R, Caillou B, et al High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation. **Oncogene** 1997; 15:1263-73.

Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, et al Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86:5658-71.

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol** 1999; 15:269-90.

Bulow S, Holm NV, Mellempgaard A. Papillary thyroid carcinoma in Danish patients with familial adenomatous polyposis. **Int J Colorectal Dis** 1988; 3:29-31.

Burgess JR, Duffield A, Wilkinson SJ, et al Two families with an autosomal dominant inheritance pattern for papillary carcinoma of the thyroid. **J Clin Endocrinol Metab** 1997; 82:345-8.

Burgess JR. Temporal trends for thyroid carcinoma in Australia: an increasing incidence of papillary thyroid carcinoma (1982-1997). **Thyroid** 2002; 12:141-9.

Burguera B, Gharib H. Thyroid incidentalomas: prevalence, diagnosis, significance, and management. **Endocrinol Metab Clin North Am** 2000; 29:187-203.

Burstein DE, Nagi C, Wang BY, Unger P. Immunohistochemical detection of p53 homolog p63 in solid cell nests, papillary thyroid carcinoma, and hashimoto's thyroiditis: A stem cell hypothesis of papillary carcinoma oncogenesis. **Hum Pathol** 2004; 35:465-73.

Bykov VL. [Solid cell nests in the human thyroid]. **Morfologiia** 1993; 104:127-42.

Carney JA, Gordon H, Carpenter PC, Shenoy BV, Go VL. The complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. **Medicine (Baltimore)** 1985; 64:270-83.

Chadwick BP, Obermayr F, Frischauf AM. FKHL15, a new human member of the forkhead gene family located on chromosome 9q22. **Genomics** 1997; 41:390-6.

Chammas MC, de Araujo Filho VJ, Moyses RA et al Predictive value for malignancy in the finding of microcalcifications on ultrasonography of thyroid nodules. **Head Neck** 2008; 30:1206-10.

Charkes ND. On the prevalence of familial nonmedullary thyroid cancer. **Thyroid** 1998; 8:857-8.

Charkes ND. On the prevalence of familial nonmedullary thyroid cancer in multiply affected kindreds. **Thyroid** 2006; 16:181-6.

Chevillard S, Ugolin N, Vielh P, et al Gene expression profiling of differentiated thyroid neoplasms: diagnostic and clinical implications. **Clin Cancer Res** 2004; 10:6586-97.

Chomczynski P, Mackey K. Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. **Biotechniques** 1995; 19:942-5.

Congdon T, Nguyen LQ, Nogueira CR, Habiby RL, Medeiros-Neto G, Kopp P. A novel mutation (Q40P) in PAX8 associated with congenital hypothyroidism and thyroid hypoplasia: evidence for phenotypic variability in mother and child. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86:3962-7.

Cooper GM. Cellular transforming genes. **Science** 1982; 217:801-6.

Cornetta AJ, Russell JP, Cunnane M, Keane WM, Rothstein JL. Cyclooxygenase-2 expression in human thyroid carcinoma and Hashimoto's thyroiditis. **Laryngoscope** 2002; 112:238-42.

Cregger M, Berger AJ, Rimm DL. Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression. **Arch Pathol Lab Med** 2006; 130:1026-30.

Crile G, Jr. Struma lymphomatosa and carcinoma of the thyroid. **Surg Gynecol Obstet** 1978; 147:350-2.

Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. **Science** 1994; 265:1582-4.

Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. **JAMA** 2006; 295:2164-7.

Davies TF. Ord-Hashimoto's disease: renaming a common disorder--again. **Thyroid** 2003; 13:317.

Dayan CM, Daniels GH. Chronic autoimmune thyroiditis. **N Engl J Med** 1996; 335:99-107.

DeLellis RA, Williams ED. **Pathology and genetics of tumors of endocrine organs**. Lyon: IARC Press; 2004. Thyroid and parathyroid tumors; p.51-6. (IARC WHO Classification of Tumours, nº 8)

Denning K, Smyth P, Cahill S et al ret/PTC-1 expression alters the immunoprofile of thyroid follicular cells. **Mol Cancer** 2008; 7:44.

DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, et al Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J** 1998; 12:1063-73.

Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. **Gastroenterology** 1994; 107:1183-8.

Eisenmann DM. Wnt signaling. **WormBook** 2005; 1-17.

Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. **Annu Rev Cell Biol** 1991; 7:663-698.

Ezzat S, Sarti DA, Cain DR, Braunstein GD. Thyroid incidentalomas. Prevalence by palpation and ultrasonography. **Arch Intern Med** 1994; 154:1838-40.

Ezzat S, Zheng L, Kolenda J, Safarian A, Freeman JL, Asa SL. Prevalence of activating ras mutations in morphologically characterized thyroid nodules. **Thyroid** 1996; 6:409-16.

Fagin JA. Perspective: lessons learned from molecular genetic studies of thyroid cancer--insights into pathogenesis and tumor-specific therapeutic targets. **Endocrinology** 2002; 143:2025-8.

Farid NR. P53 mutations in thyroid carcinoma: tidings from an old foe. **J. Endocrinol Invest** 2001; 24:536-45.

Figge J, del Rosario AD, Gerasimov G, Dedov I, Bronstein M, Troshina K, Alexandrova G, Kallakury BV, Bui HX, Bratslavsky G, Preferential expression of the cell adhesion molecule CD44 in papillary thyroid carcinoma. **Exp Mol Pathol** 1994; 61:203-11.

Fink A, Tomlinson G, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL. Occult micropapillary carcinoma associated with benign follicular thyroid disease and unrelated thyroid neoplasms. **Mod Pathol** 1996; 9:816-20.

Finley DJ, Arora N, Zhu B, Gallagher L, Fahey TJ, III. Molecular profiling distinguishes papillary carcinoma from benign thyroid nodules. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89:3214-23.

Flavin R, Jackl G, Finn S, et al. RET/PTC rearrangement occurring in primary peritoneal carcinoma. **Int J Surg Pathol** 2009; 17:187-97.

Franceschi S, Preston-Martin S, Dal ML, et al. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. IV. Benign thyroid diseases. **Cancer Causes Control** 1999; 10:583-95.

Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. **J Intern Med** 1997; 242:27-33.

Frattini M, Ferrario C, Bressan P, et al. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. **Oncogene** 2004; 23:7436-40.

Frau DV, Lai ML, Caria P, et al. Trisomy 17 as a marker for a subset of noninvasive thyroid nodules with focal features of papillary carcinoma: cytogenetic and molecular analysis of 62 cases and correlation with histological findings. **J Clin Endocrinol Metab** 2008; 93:177-81.

Fugazzola L, Pierotti MA, Vigano E, Pacini F, Vorontsova TV, Bongarzone I. Molecular and biochemical analysis of RET/PTC4, a novel oncogenic rearrangement between RET and ELE1 genes, in a post-Chernobyl papillary thyroid cancer. **Oncogene** 1996; 13:1093-7.

Fusco A, Grieco M, Santoro M, et al. A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. **Nature** 1987; 328:170-2.

Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. **Science** 1999; 285:1028-32.

Giordano C, Richiusa P, Bagnasco M, et al. Differential regulation of Fas-mediated apoptosis in both thyrocyte and lymphocyte cellular compartments correlates with opposite phenotypic manifestations of autoimmune thyroid disease. **Thyroid** 2001; 11:233-44.

Giordano TJ, Kuick R, Thomas DG, et al. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. **Oncogene** 2005; 24:6646-56.

Golbert L, Kollin JH, Leitão AH, Posser M, Lobato R, Maia AL. Aumento da expressão do proto-oncogene ras no bócio multinodular. possível envolvimento na patogênese. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2003; 47:721-7.

Goldman MB, Monson RR, Maloof F. Cancer mortality in women with thyroid disease. **Cancer Res** 1990; 50:2283-9.

Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, et al. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. **Cell** 1990; 60:557-63.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell** 1996; 86:353-64.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. **Nature** 1994; 371:257-61.

Harach HR, Escalante DA, Day ES. Thyroid cancer and thyroiditis in Salta, Argentina: a 40-yr study in relation to iodine prophylaxis. **Endocr Pathol** 2002; 13:175-81.

Harris CC. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. **Carcinogenesis** 1996; 17:1187-98.

Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. **Annu Rev Immunol** 2000; 18:275-308.

Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level: a review. **Biochemistry (Mosc)** 1997; 62:1180-90.

Hemminki K, Eng C, Chen B. Familial risks for nonmedullary thyroid cancer. **J Clin Endocrinol Metab** 2005; 90:5747-53.

Herrmann MA, Hay ID, Bartelt DH, Jr., et al. Cytogenetic and molecular genetic studies of follicular and papillary thyroid cancers. **J Clin Invest** 1991; 88:1596-604.

Hillier LW, Fulton RS, Fulton LA, et al. The DNA sequence of human chromosome 7. **Nature** 2003; 424:157-64.

Hoff AO, Cote GJ, Gagel RF. Multiple endocrine neoplasias. **Annu Rev Physiol** 2000; 62:377-411.

Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, et al. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). **J Clin Endocrinol Metab** 2002; 87:489-99.

Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, et al. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:15044-9.

Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995 [see comments]. **Cancer** 1998; 83:2638-48.

Hunt JL, Baloch ZW, Barnes L, et al. Loss of heterozygosity mutations of tumor suppressor genes in cytologically atypical areas in chronic lymphocytic thyroiditis. **Endocr Pathol** 2002; 13:321-30.

Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 1998; 90:455-60.

Hwang ES, Kim DW, Hwang JH, et al. Regulation of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and STAT1-dependent genes by RET/PTC (rearranged in transformation/papillary thyroid carcinoma) oncogenic tyrosine kinases. **Mol Endocrinol** 2004; 18:2672-84.

Irmiler M, Thome M, Hahne M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. **Nature** 1997; 388:190-5.

Ishikawa Y, Sugano H, Matsumoto T, Furuichi Y, Miller RW, Goto M. Unusual features of thyroid carcinomas in Japanese patients with Werner syndrome and possible genotype-phenotype relations to cell type and race. **Cancer** 1999; 85:1345-52.

Jonasson JG, Hrafnkelsson J. Nuclear DNA analysis and prognosis in carcinoma of the thyroid gland. A nationwide study in Iceland on carcinomas diagnosed 1955-1990. **Virch Arch** 1994; 425:349-55.

Juhasz F, Boros P, Szegedi G, et al. Immunogenetic and immunologic studies of differentiated thyroid cancer. **Cancer** 1989; 63:1318-26.

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. Glândulas endócrinas; p.390-414.

Kameda Y, Nishimaki T, Miura M, Jiang SX, Guillemot F. Mash1 regulates the development of C cells in mouse thyroid glands. **Dev Dyn** 2007; 236:262-70.

Kang DY, Kim KH, Kim JM, Kim SH, Kim JY, Baik HW, Kim YS. High prevalence of RET, RAS, and ERK expression in Hashimoto's thyroiditis and in papillary thyroid carcinoma in the Korean population. **Thyroid** 2007; 17:1031-8.

Kashima K, Yokoyama S, Noguchi S, et al. Chronic thyroiditis as a favorable prognostic factor in papillary thyroid carcinoma. **Thyroid** 1998; 8:197-202.

Kayser L, Francis D, Broholm H. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial constitutive nitric oxide synthase in neoplastic and autoimmune thyroid disorders. **APMIS** 2000; 108:785-91.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** 1972; 26:239-57.

Kim H, Piao Z, Park C, Chung WY, Park CS. Clinical significance of clonality in thyroid nodules. **Br J Surg** 1998; 85:1125-8.

Kim SJ, Lee JH, Yoon JS, et al. Immunohistochemical expression of COX-2 in thyroid nodules. **Korean J Intern Med** 2003; 18:225-9.

Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. **Cancer Res** 2003; 63:1454-7.

Kjellman P, Lagercrantz S, Hoog A, Wallin G, Larsson C, Zedenius J. Gain of 1q and loss of 9q21.3-q32 are associated with a less favorable prognosis in papillary thyroid carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2001; 32:43-9.

Kluck RM, Esposti MD, Perkins G, et al. The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. **J Cell Biol** 1999; 147:809-22.

Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:292-306.

Kotani T, Aratake Y, Hirai K, Fukazawa Y, Sato H, Ohtaki S. Apoptosis in thyroid tissue from patients with Hashimoto's thyroiditis. **Autoimmunity** 1995; 20:231-6.

Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, et al. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. **Science** 2000; 289:1357-60.

Kroll TG. Molecular events in follicular thyroid tumors. **Cancer Treat Res** 2004; 122:85-105.

Leenhardt L, Grosclaude P, Cherie-Challine L. Increased incidence of thyroid carcinoma in france: a true epidemic or thyroid nodule management effects? Report from the French Thyroid Cancer Committee. **Thyroid** 2004; 14:1056-60.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature** 1998; 396:643-9.

Levrero M, De L, V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. **J Cell Sci** 2000; 113:1661-70.

Lindsay S, Dailey ME, Friedlander J, Yee G, Soley MH. Chronic thyroiditis: a clinical and pathologic study of 354 patients. **J Clin Endocrinol Metab** 1952; 12:1578-600.

Liossis SN, Sfikakis PP, Tsokos GC. Immune cell signaling aberrations in human lupus. **Immunol Res** 1998; 18:27-39.

Little NA, Jochemsen AG. p63. **Int J Biochem Cell Biol** 2002; 34:6-9.

Liu S, Semenciw R, Ugnat AM, Mao Y. Increasing thyroid cancer incidence in Canada, 1970-1996: time trends and age-period-cohort effects. **Br J Cancer** 2001; 85:1335-1339.

Lo CY, Lam KY, Leung PP, Luk JM. High prevalence of cyclooxygenase 2 expression in papillary thyroid carcinoma. **Eur J Endocrinol** 2005; 152:545-50.

Lukashev ME, Werb Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. **Trends Cell Biol** 1998; 8:437-41.

Maciel RMB. Câncer da tiróide. In: Wajchenberg BL, editor. **Tratado de endocrinologia**. São Paulo: Roca; 1992. p.404-27

Maciel RMB. Diagnóstico e tratamento do câncer de tiróide. In: Vilar L, editor. **Endocrinologia clínica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001. p.207-18.

Machens A, Gimm O, Hinze R, Hoppner W, Boehm BO, Dralle H. Genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid carcinoma: oncological features and biochemical properties. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86:1104-9.

Madaan S, Abel PD, Chaudhary KS, et al. Cytoplasmic induction and over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate cancer: implications for prevention and treatment. **BJU Int** 2000; 86:736-41.

Magalhães PKR. **Estudo genético e imuno-histoquímico em carcinoma medular de tiróide**. São Paulo; 2002. [Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo].

Malchoff CD, Malchoff DM. Familial nonmedullary thyroid carcinoma. **Cancer Control** 2006; 13:106-10.

Mancini A, Rabitti C, Conte G, Gullotta G, De ML. [Lymphocytic infiltration in thyroid neoplasms: preliminary prognostic assessments]. **Minerva Chir** 1993; 48:1283-8.

Margolis B, Skolnik EY. Activation of Ras by receptor tyrosine kinases. **J Am Soc Nephrol** 1994; 5:1288-99.

Maruta J, Hashimoto H, Yamashita H, Yamashita H, Noguchi S. Immunostaining of galectin-3 and CD44v6 using fine-needle aspiration for distinguishing follicular carcinoma from adenoma. **Diagn Cytopathol** 2004; 31:392-6.

Matlashewski G, Lamb P, Pim D, Peacock J, Crawford L, Benchimol S. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. **EMBO J** 1984; 3:3257-62.

Matsubayashi S, Kawai K, Matsumoto Y, et al. The correlation between papillary thyroid carcinoma and lymphocytic infiltration in the thyroid gland. **J Clin Endocrinol Metab** 1995; 80:3421-4.

McConahey WM, Hay ID, Woolner LB, van Heerden JA, Taylor WF. Papillary thyroid cancer treated at the Mayo Clinic, 1946 through 1970: initial manifestations, pathologic findings, therapy, and outcome. **Mayo Clin Proc** 1986; 61:978-96.

Mebratu Y, Tesfaigzi Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? **Cell Cycle** 2009; 8:1168-75.

Mechler C, Bounacer A, Suarez H, Saint FM, Magois C, Aillet G, Gaulier A. Papillary thyroid carcinoma: 6 cases from 2 families with associated lymphocytic thyroiditis harbouring RET/PTC rearrangements. **Br J Cancer** 2001; 85:1831-7.

Medema RH, Bos JL. The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. **Crit Rev Oncog** 1993; 4:615-61.

Meier DA, Kaplan MM. Radioiodine uptake and thyroid scintiscanning. **Endocrinol Metab Clin North Am** 2001; 30:291-313.

Meinkoth JL. Biology of Ras in thyroid cells. **Cancer Treat Res** 2004; 122:131-48.

Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. **Nature** 1999; 398:708-13.

Mitin N, Rossman KL, Der CJ. Signaling interplay in Ras superfamily function. **Curr Biol** 2005; 15:R563-R74.

Mitsiades CS, Poulaki V, Fanourakis G, et al. Fas signaling in thyroid carcinomas is diverted from apoptosis to proliferation. **Clin Cancer Res** 2006; 12:3705-12.

Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C, Jr., Zhang L, Fagin JA. Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. **Cancer Res** 2005; 65:2465-73.

Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. **J Biol Chem** 1998; 273:2926-30.

Nadig J, Weber E, Hedinger C. C-cell in vestiges of the ultimobranchial body in human thyroid glands. **Virch Arch B Cell Pathol** 1978; 27:189-91.

Namba H, Rubin SA, Fagin JA. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. **Mol Endocrinol** 1990; 4:1474-9.

Namba H, Nakashima M, Hayashi T, et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. **J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88:4393-7.

Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. **Adv Cancer Res** 1997; 71:241-319.

Nikiforova MN, Stringer JR, Blough R, Medvedovic M, Fagin JA, Nikiforov YE. Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. **Science** 2000; 290:138-41.

Nikiforova MN, Caudill CM, Biddinger P, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC rearrangements in Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinomas. **Int J Surg Pathol** 2002; 10:15-22.

Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. **J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88:5399-404.

Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. **J Clin Endocrinol Metab** 2008; 93:1600-8.

Nikiforov YE. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. **Endocr Pathol** 2002; 13:3-16.

Nikiforov YE. The molecular pathways induced by radiation and leading to thyroid carcinogenesis. In: Farid N, editor. **Molecular basis of thyroid cancer**. New York: Kluwer Academic; 2004. p.191-206.

Nikiforov YE. Radiation-induced thyroid cancer: what we have learned from chernobyl. **Endocr Pathol** 2006a; 17:307-17.

Nikiforov YE. RET/PTC Rearrangement--a link between Hashimoto's thyroiditis and thyroid cancer...or not. **J Clin Endocrinol Metab** 2006b; 91:2040-2.

Nikiforov YE, Ohori NP. Papillary carcinoma. In: Nikiforov YE, Biddinger PW, Thompson DRL, editor. **Diagnostic pathology and molecular genetics of the thyroid**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2009. p.160-213.

Nunes AB. **Identificação de mutações do proto-oncogene RET associadas à forma hereditária do carcinoma medular de tiróide**. São Paulo, 2002. [Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. **Cell Res** 2005; 15:28-32.

Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:592-603.

Okayasu I, Hatakeyama S, Tanaka Y, Sakurai T, Hoshi K, Lewis PD. Is focal chronic autoimmune thyroiditis an age-related disease? Differences in incidence and severity between Japanese and British. **J Pathol** 1991; 163:257-64.

Okayasu I, Hara Y, Nakamura K, Rose NR. Racial and age-related differences in incidence and severity of focal autoimmune thyroiditis. **Am J Clin Pathol** 1994; 101:698-702.

Omerovic J, Laude AJ, Prior IA. Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. **Cell Mol Life Sci** 2007; 64:2575-89.

Ozgenç A, Loeb LA. Current advances in unraveling the function of the Werner syndrome protein. **Mutat Res** 2005; 577:237-51.

Palona I, Namba H, Mitsutake N, et al. BRAFV600E promotes invasiveness of thyroid cancer cells through nuclear factor kappaB activation. **Endocrinology** 2006; 147:5699-707.

Papanicolaou GN, Traut H. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. **Am J Obstetr Gynecol** 1941; 42:193-206.

Park SY, Park YJ, Lee YJ, et al. Analysis of differential BRAF(V600E) mutational status in multifocal papillary thyroid carcinoma: evidence of independent clonal origin in distinct tumor foci. **Cancer** 2006; 107:1831-8.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin** 2005; 55:74-108.

Parsa R, Yang A, McKeon F, Green H. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. **J Invest Dermatol** 1999; 113:1099-105.

Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE. Thyroiditis. **N Engl J Med** 2003; 348:2646-55.

Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:3156-61.

Plail RO, Bussey HJ, Glazer G, Thomson JP. Adenomatous polyposis: an association with carcinoma of the thyroid. **Br J Surg** 1987; 74:377-80.

Polakis P. Wnt signaling and cancer. **Genes Dev** 2000; 14:1837-51.

Pozniak CD, Radinovic S, Yang A, McKeon F, Kaplan DR, Miller FD. An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. **Science** 2000; 289:304-6.

Prasad ML, Huang Y, Pellegata NS, de la Chapelle A, Kloos RT. Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma (PTC)-like nuclear alterations express molecular markers of PTC. **Histopathology** 2004; 45:39-46.

Prescott SM. Is cyclooxygenase-2 the alpha and the omega in cancer? **J Clin Invest** 2000; 105:1511-3.

Prescott SM, Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. **Biochim Biophys Acta** 2000; 1470:M69-M78.

Punales MK. **Rastreamento genético do carcinoma medular de tiróide: identificação de mutações no proto-oncogene RET**. Porto Alegre; 2000. [Dissertação de Mestrado-Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul].

Puxeddu E, Fagin JA. Genetic markers in thyroid neoplasia. **Endocrinol Metab Clin North Am** 2001; 30:493-513.

Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, et al. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. **Clin Cancer Res** 2000; 6:1093-103.

Rago T, Vitti P. Role of thyroid ultrasound in the diagnostic evaluation of thyroid nodules. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab** 2008; 22:913-928.

Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marme D, Kerbel RS. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. **Cancer Metastasis Rev** 1995; 14:263-77.

Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. **Mol Carcinog** 1993; 7:139-46.

Rhoden KJ, Johnson C, Brandao G, Howe JG, Smith BR, Tallini G. Real-time quantitative RT-PCR identifies distinct c-RET, RET/PTC1 and RET/PTC3 expression patterns in papillary thyroid carcinoma. **Lab Invest** 2004; 84:1557-70.

Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. **Cancer Res** 1997; 57:1276-80.

Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. **Curr Opin Cell Biol** 1997; 9:180-6.

Rodrigues R, Roque L, Espadinha C, et al. Comparative genomic hybridization, BRAF, RAS, RET, and oligo-array analysis in aneuploid papillary thyroid carcinomas. **Oncol Rep** 2007; 18:917-26.

Ron E, Lubin JH, Shore RE, et al. Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. **Radiat Res** 1995; 141:259-77.

Roque L, Nunes VM, Ribeiro C, Martins C, Soares J. Karyotypic characterization of papillary thyroid carcinomas. **Cancer** 2001; 92:2529-38.

Rosai J. **Surgical pathology**. Philadelphia: C V Mosby; 2004. Thyroiditis; p.519-24.

Rudzki Z, Jothy S. CD44 and the adhesion of neoplastic cells. **Mol Pathol** 1997; 50:57-71.

Saad AG, Kumar S, Ron E, Lubin JH, Stanek J, Bove KE, Nikiforov YE. Proliferative activity of human thyroid cells in various age groups and its correlation with the risk of thyroid cancer after radiation exposure. **J Clin Endocrinol Metab** 2006; 91:2672-7.

Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. **Cell** 1997; 91:443-6.

Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:10964-7.

Santoro M, Dathan NA, Berlingieri MT, et al. Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. **Oncogene** 1994; 9:509-16.

Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Fusco A, Vecchio G. Molecular mechanisms of RET activation in human cancer. **Ann N Y Acad Sci** 2002; 963:116-21.

Saravanan P, Dayan CM. Thyroid autoantibodies. **Endocrinol Metab Clin North Am** 2001; 30:315-37.

Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. **Eur J Biochem** 1998; 254:439-59.

Sclafani AP, Valdes M, Cho H. Hashimoto's thyroiditis and carcinoma of the thyroid: optimal management. **Laryngoscope** 1993; 103:845-9.

Segal K, Ben-Bassat M, Avraham A, Har-El G, Sidi J. Hashimoto's thyroiditis and carcinoma of the thyroid gland. **Int Surg** 1985; 70:205-9.

Shattuck TM, Westra WH, Ladenson PW, Arnold A. Independent clonal origins of distinct tumor foci in multifocal papillary thyroid carcinoma. **N Engl J Med** 2005; 352:2406-12.

Sheils OM, O'early JJ, Uhlmann V, Lattich K, Sweeney EC. ret/PTC-1 Activation in Hashimoto Thyroiditis. **Int J Surg Pathol** 2000; 8:185-9.

Sneath RJ, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. **Mol Pathol** 1998; 51:191-200.

Soares P, Trovisco V, Rocha AS, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. **Oncogene** 2003; 22:4578-80.

Sobrinho-Simoes M, Preto A, Rocha AS, Castro P, Maximo V, Fonseca E, Soares P. Molecular pathology of well-differentiated thyroid carcinomas. **Virchows Arch** 2005; 447:787-93.

Sporn MB. The war on cancer. **Lancet** 1996; 347:1377-81.

Stassi G, Di LD, Todaro M, et al. Control of target cell survival in thyroid autoimmunity by T helper cytokines via regulation of apoptotic proteins. **Nat Immunol** 2000; 1:483-8.

Sugg SL, Ezzat S, Rosen IB, Freeman JL, Asa SL. Distinct multiple RET/PTC gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia. **J Clin Endocrinol Metab** 1998; 83:4116-22.

Suster S. Thyroid tumors with a follicular growth pattern: problems in differential diagnosis. **Arch Pathol Lab Med** 2006; 130:984-8.

Takahashi M. Structure and expression of the ret transforming gene. **IARC Sci Publ** 1988; (92):189-97.

Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. **Cell** 1985; 42:581-8.

Takami HE, Miyabe R, Kameyama K. Hashimoto's thyroiditis. **World J Surg** 2008; 32:688-92.

Tallini G, Asa SL. RET oncogene activation in papillary thyroid carcinoma. **Adv Anat Pathol** 2001; 8:345-4.

Tallini G, Santoro M, Helie M, et al. RET/PTC oncogene activation defines a subset of papillary thyroid carcinomas lacking evidence of progression to poorly differentiated or undifferentiated tumor phenotypes. **Clin Cancer Res** 1998; 4:287-94.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science** 1995; 267:1456-62.

Thornberry NA. Caspases: key mediators of apoptosis. **Chem Biol** 1998; 5:R97-103.

Trueba SS, Auge J, Mattei G, et al. PAX8, TITF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations. **J Clin Endocrinol Metab** 2005; 90:455-62.

Tsuji M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. **Cell** 1995; 83:493-501.

Tsuji M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94:3336-40.

Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell** 1998; 93:705-16.

Uchino S, Noguchi S, Kawamoto H, et al. Familial nonmedullary thyroid carcinoma characterized by multifocality and a high recurrence rate in a large study population. **World J Surg** 2002; 26:897-902.

Umpierrez GE, Latif KA, Murphy MB, et al. Thyroid dysfunction in patients with type 1 diabetes: a longitudinal study. **Diabetes Care** 2003; 26:1181-5.

Unger K, Zitzelsberger H, Salvatore G, et al. Heterogeneity in the distribution of RET/PTC rearrangements within individual post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89:4272-9.

Unger P, Ewart M, Wang BY, Gan L, Kohtz DS, Burstein DE. Expression of p63 in papillary thyroid carcinoma and in Hashimoto's thyroiditis: a pathobiologic link? **Hum Pathol** 2003; 34:764-9.

Van der Laan BF, Freeman JL, Tsang RW, Asa SL The association of well-differentiated thyroid carcinoma with insular or anaplastic thyroid carcinoma: evidence for dedifferentiation in tumor progression. **Endocr Pathol** 1993; 4:215-21.

van Rees BP, Saukkonen K, Ristimaki A, et al. Cyclooxygenase-2 expression during carcinogenesis in the human stomach. **J Pathol** 2002; 196:171-9.

Vander JB, Gaston EA, Dawber TR. The significance of nontoxic thyroid nodules. Final report of a 15-year study of the incidence of thyroid malignancy. **Ann Intern Med** 1968; 69:537-40.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 1998; 38:97-120.

Vantaggiato C, Formentini I, Bondanza A, Bonini C, Naldini L, Brambilla R. ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. **J Biol** 2006; 5:14.

Vasko VV, Gaudart J, Allasia C, et al. Thyroid follicular adenomas may display features of follicular carcinoma and follicular variant of papillary carcinoma. **Eur J Endocrinol** 2004; 151:779-86.

Viglietto G, Chiappetta G, Martinez-Tello FJ, et al. RET/PTC oncogene activation is an early event in thyroid carcinogenesis. **Oncogene** 1995; 11:1207-10.

Volante M, Collini P, Nikiforov YE, et al. Poorly differentiated thyroid carcinoma: the Turin proposal for the use of uniform diagnostic criteria and an algorithmic diagnostic approach. **Am J Surg Pathol** 2007; 31:1256-64.

Volpe R. Lymphocytic (Hashimoto's) thyroiditis. In: Werner SC, Ingbar SC, editors. **The thyroid**. New York: Harper and Row; 1978a. p.996-1008.

Volpe R. The pathology of thyroiditis. **Hum Pathol** 1978b; 9:429-38.

Walker RP, Paloyan E. The relationship between Hashimoto's thyroiditis, thyroid neoplasia, and primary hyperparathyroidism. **Otolaryngol Clin North Am** 1990; 23:291-302.

Wang C, Crapo LM. The epidemiology of thyroid disease and implications for screening. **Endocrinol Metab Clin North Am** 1997; 26:189-218.

Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. **Cytokine Growth Factor Rev** 2008; 19:333-45.

Ward LS, Brenta G, Medvedovic M, Fagin JA. Studies of allelic loss in thyroid tumors reveal major differences in chromosomal instability between papillary and follicular carcinomas. **J Clin Endocrinol Metab** 1998; 83:525-30.

Weetman AP, McGregor AM. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. **Endocr Rev** 1994; 15:788-830.

Weetman AP. Cellular immune responses in autoimmune thyroid disease. **Clin Endocrinol (Oxf)** 2004; 61:405-13.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell** 1995; 81:323-30.

Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. **J Biol Chem** 1996; 271:10079-86.

Williams ED, Doniach I. The post-mortem incidence of focal thyroiditis. **J. Pathol Bacteriol** 1962; 83:255-64.

Williams ED, Doniach I, Bjarnason O, Michie W. Thyroid cancer in an iodide rich area: a histopathological study. **Cancer** 1977; 39:215-22.

Wirtschaffter A, Schmidt R, Rosen D, et al. Expression of the RET/PTC fusion gene as a marker for papillary carcinoma in Hashimoto's thyroiditis. **Laryngoscope** 1997; 107:95-100.

Wreesmann VB, Siczka EM, Socci ND, et al. Genome-wide profiling of papillary thyroid cancer identifies MUC1 as an independent prognostic marker. **Cancer Res** 2004; 64:3780-9.

Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. **Mol Cell Biol** 1989; 9:3088-92.

Wu M, Burstein DE. Fine needle aspiration. **Cancer Invest** 2004; 22:620-8.

Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. **Endocr Rev** 2007; 28:742-62.

Yang A, Schweitzer R, Sun D, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. **Nature** 1999; 398:714-8.

Yang A, McKeon F. P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2000; 1:199-207.

Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. **Am J Clin Pathol** 2003; 120:71-7.

Zhu Z, Ciampi R, Nikiforova MN, Gandhi M, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. **J Clin Endocrinol Metab** 2006; 91:3603-10.

Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schror K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. **Cancer Res** 1999; 59:198-204.

Zitzelsberger H, Lehmann L, Hieber L, et al. Cytogenetic changes in radiation-induced tumors of the thyroid. **Cancer Res** 1999; 59:135-40.