

**ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS
CORRESPONDENTES A GENES DIFERENCIALMENTE
EXPRESSOS EM TECIDO TIREOIDIANO ATRAVÉS
DA TÉCNICA DE TISSUE ARRAY**

CÍNTIA MENDONÇA DE ABREU

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Alex Fiorini de Carvalho

**Co-Orientadores: Dr. Luiz Fernando Lima Reis e
Dra. Maria Betânia M. Araújo**

São Paulo

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Abreu, Cíntia Mendonça de

Análise do padrão de expressão de proteínas correspondentes a genes diferencialmente expressos em tecido tireoidiano através da técnica de tissue array / Cíntia Mendonça de Abreu-- São Paulo, 2005.

94p.

Dissertação(mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Alex Fiorini de Carvalho

Descritores: 1. TIREÓIDE/patogenicidade. 2. ANALISE MICROARRAY. 3. PROTEÍNA 5 DE LIGAÇÃO A FATOR DE CRESCIMENTO INSULIN-LIKE. 4. P21(RAS)/análise. 5. QUINASE CICLINA-DEPENDENTE. 6. CLATRINA. 7. 1-ANTITRIPSINA ALFA/análise. 8. CATEPSINA-B.

*Viva como se você fosse morrer amanhã.
Aprenda como se você fosse viver para sempre.*

Mahatma Ghandi

Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

FUNDAÇÃO ANTONIO
PRUDENTE

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que tanto amo e admiro.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Alex e sua família pela dedicação e paciência em relação ao meu pequeno conhecimento a respeito do universo da biologia molecular.

Aos meus co-orientadores Dr. Luiz Fernando e Dra. Betânia pela ajuda inestimável na realização deste projeto e todo o conhecimento adquirido.

Aos pacientes sem os quais este estudo não seria possível.

Aos funcionários do departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer, em especial o Carlinhos e a Sueli, que me ajudaram na seleção das amostras e confecção das lâminas e blocos de *array*.

À Dra. Gisele e Dra. Dirlei por terem cedido parte do material utilizado nas reações imunohistoquímicas realizadas neste projeto.

À Dra. Mariana pela ajuda na realização das fotografias que ilustram este projeto.

À Dra. Karina pela paciência e grande contribuição nas análises estatísticas.

Ao Departamento de cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Aos funcionários da Biblioteca, em especial a Sueli, pela ajuda nas pesquisas bibliográficas e revisão final desta tese.

Aos funcionários do SAME pela atenção e presteza durante a coleta de dados clínicos dos prontuários.

À Ana Maria e Márcia pela ajuda e esclarecimentos no decorrer da pós-graduação.

Aos professores do curso de pós-graduação da FAP pelo conhecimento adquirido.

A toda a equipe do LABRI pela ajuda e convivência agradável durante estes dois anos.

À equipe da Emergência pela compreensão e apoio.

À minha família por compreender os poucos momentos que passamos juntos nestes anos.

E, em especial, ao Agnaldo, quem mais me incentivou a realizar este projeto.

RESUMO

Abreu, CM. **Análise do padrão de expressão de proteínas correspondentes a genes diferencialmente expressos em tecido tireoidiano através da técnica de tissue array.** São Paulo; 2005 [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

Introdução: Cerca de 20% a 40% da população apresenta nódulos tireoidianos assintomáticos e, aproximadamente 30% destes nódulos apresentam malignidade ao exame anatomopatológico pós-cirúrgico. Tentativas de se estabelecer associações biológicas e diferenças entre os distúrbios benignos e malignos da tireóide mostram resultados conflitantes. Estudos prévios utilizando cDNA microarrays identificaram genes com expressão diferencial em diferentes patologias tireoidianas, incluindo IGFBP5; proteases como a catepsina B e inibidores de proteinases como a $\alpha 1$ antitripsina; componentes envolvidos nos processos de endocitose e transporte intracelular como a clatrina e; reguladores do ciclo celular como p27 e p21.

Objetivo: analisar, caracterizar e comparar o perfil de expressão proteico de seis genes diferencialmente expressos em tireóide normal, bócio, adenoma folicular e carcinomas diferenciados e, determinar a importância clínica dos fenótipos identificados.

Métodos: 172 amostras de tecido tireoidiano incluindo 18 normais, 18 bócios, 50 adenomas foliculares, 50 carcinomas papilíferos e 36 carcinomas foliculares foram coletadas em duplicata para análise e comparação dos padrões de expressão de seis proteínas (p27, p21, IGFBP5, clatrina, $\alpha 1$ -antitripsina e catepsina B) utilizando técnicas de imunistoquímica em tissue microarrays. Os casos foram avaliados de acordo com a intensidade da coloração (0 a 4) e porcentagem de células positivas (0 a 4).

Resultados: Foi observada expressão diferencial para alfa 1 antitripsina, clatrina e IGFBP5, p21 e p27 quando os tecidos foram comparados ($p < 0,0001$). Tecidos neoplásicos exibem expressão aumentada de IGFBP5 em relação aos não neoplásicos. Nenhuma diferença significativa foi observada em relação à expressão de catepsina B. Nas células foliculares normais e de bócio, a imunorreatividade para p27 e p21 foi predominantemente nuclear em comparação aos carcinomas. Este mesmo padrão foi observado em adenoma quando comparados

aos carcinomas foliculares ($p < 0,008$). Carcinomas papilíferos exibiram expressão citoplasmática aumentada de p27 e p21. **Conclusão:** Vários e novos genes detectados por técnicas de análise genômica em larga escala podem estar envolvidos na patogênese molecular e progressão tumoral. A transcrição destes genes pode resultar na superexpressão de proteínas como IGFBP5, clatrina e $\alpha 1$ antitripsina, enquanto modificações pós-transcricionais resultam em alteração da expressão de proteínas nucleares envolvidas no controle do ciclo celular e, que contribuem para o processo de malignização da tireóide. Dados obtidos em TMA são consistentes com os resultados obtidos por cDNA *microarray* mostrando expressão protéica diferencial para p27, p21, IGFBP5, clatrina e $\alpha 1$ -antitripsina em tecido tireoidiano normal, hiperplásico e neoplásico; o que poderia ser de valor diagnóstico e prognóstico.

SUMMARY

Abreu, CM. Analysis of protein expression profile of differentially expressed genes in thyroid tissue by tissue array. São Paulo; 2005 [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

Introduction: Thyroid nodules can be detected in 20%-40% of asymptomatic patients and, in 30% of them, malignant disease can be found by histopathology of post-surgical tissue samples. Attempts to establish biological links and differences between benign and malignant thyroid disorders have shown conflicting results. Previous studies using cDNA microarrays have identified genes with differential expression in thyroid diseases, including IGFBP5; proteases such as cathepsin B and proteinase inhibitors as alpha-1 antitrypsin; components involved in endocytosis and intracellular transportation such as clathrin, and; cell cycle regulators such as p27 and p21. **Purpose:** to analyze, characterize and compare the protein expression profile of six genes differentially expressed in normal thyroid, goiter, follicular adenomas, and differentiated carcinomas, and ultimately, evaluate the clinical importance of the identified phenotypes. **Methods:** Samples of 172 tissues including 18 normal thyroids, 18 goiters, 50 follicular adenomas, 50 papillary carcinomas and 36 follicular carcinomas were collected in duplicates for analysis and comparison of six proteins expression patterns (p27, p21, clathrin, IGFBP5, alpha 1 antitrypsin and cathepsin B) using immunohistochemistry and tissue microarrays techniques. Cases were scored in relation to intensity of staining (0 to 4) and number of stained cells (0 to 4). **Results:** We found differential expression for α 1-anti-trypsin, clathrin, IGFBP5, p21 and p27 when tissues were compared ($p < 0.0001$). IGFBP5 expression was elevated in all neoplastic compared to non-neoplastic tissues. No significant differences were observed for cathepsin B. In normal and goiter follicular cells, immunostaining of p27 and p21 was predominantly nuclear when compared to carcinoma cells. The same pattern of expression was noted for follicular adenomas when compared to follicular carcinomas ($p < 0.008$). Papillary carcinomas displayed a predominant diffuse cytoplasmatic p27 and p21 staining when compared to

nonmalignant tissues. **Conclusion:** Several genes and new ones detected by high-throughput genomic profiling may be involved in molecular pathogenesis and tumoral progression. Transcription of these genes may result in overexpression of proteins like IGFBP5, clathrin and alpha 1 antitrypsin, while post-transcriptional changes may result in altered expression of nuclear proteins involved in cell cycle regulation that may contribute to the thyroids carcinogenesis. TMA data are consistent with results obtained with cDNA microarray showing differential protein expression for p27, p21, IGFBP5, clathrin and α 1-AT in normal, hyperplastic and, neoplastic thyroid tissues which could be of diagnostic and prognostic value.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Comparação entre os padrões de expressão nuclear de p27	40
Figura 2	Comparações entre os padrões de expressão citoplasmática de p27	40
Figura 3	Padrão de expressão imunoistoquímica de p27 em tireóide normal. As células foliculares exibem um padrão nuclear predominante	41
Figura 4	Expressão imunoistoquímica de p27 em bócio	41
Figura 5	Expressão de p27 em adenoma folicular. A celularidade aumentada exibe coloração tanto nuclear quanto citoplasmática	42
Figura 6	A expressão de p27 em carcinoma papilífero exibe padrão predominantemente citoplasmático	42
Figura 7	As células de carcinoma folicular apresentam padrão imunoistoquímico tanto citoplasmático quanto nuclear para p27	43
Figura 8	A comparação entre os cinco tecidos mostra expressão nuclear diferencial para a proteína p21 ($p < 0,0001$)	45
Figura 9	A expressão citoplasmática de p21 nos carcinomas papilíferos foi mais intensa em comparação a todos os outros tecidos	45
Figura 10	Baixa expressão nuclear de p21 em tireócitos normais	46
Figura 11	Expressão imunoistoquímica de p21 em bócio	46
Figura 12	Imunorreatividade predominantemente nuclear de p21 em adenoma folicular	47
Figura 13	Intensa imunorreatividade citoplasmática de p21 nas células de carcinoma papilífero. Positividade nuclear também é observada	47
Figura 14	Amostra de carcinoma folicular exibindo imunorreatividade nuclear e citoplasmática semelhantes para p21	48
Figura 15	Comparação entre os padrões de expressão de alfa 1 antitripsina	49
Figura 16	Baixa imunorreatividade para alfa 1 antitripsina em tireóide normal	50
Figura 17	Expressão de alfa 1 antitripsina em bócio mostrando padrão semelhante ao tecido normal	50
Figura 18	Expressão de alfa 1 antitripsina em adenoma folicular	51

Figura 19	Intensa imunorreatividade para alfa 1 antitripsina em carcinoma papilífero	51
Figura 20	No carcinoma folicular, a expressão imunoistoquímica para $\alpha 1$ antitripsina é semelhante à observada no carcinoma papilífero	52
Figura 21	Expressão de IGFBP5 e comparações entre os pares de tecidos	53
Figura 22	Expressão imunoistoquímica de IGFBP5 em tireóide normal	54
Figura 23	Expressão imunoistoquímica de IGFBP5 em bócio	54
Figura 24	Expressão imunoistoquímica de IGFBP5 em adenoma folicular	55
Figura 25	Intensa imunorreatividade para IGFBP5 em carcinoma papilífero	55
Figura 26	Expressão imunoistoquímica de IGFBP5 em carcinoma folicular	56
Figura 27	Comparação entre os padrões de expressão de clatrina	57
Figura 28	Expressão imunoistoquímica de clatrina em tireóide normal	58
Figura 29	Expressão imunoistoquímica de clatrina em bócio	59
Figura 30	Expressão imunoistoquímica de clatrina em adenoma folicular	59
Figura 31	Expressão imunoistoquímica de clatrina em carcinoma papilífero	60
Figura 32	Expressão imunoistoquímica de clatrina em carcinoma folicular	60
Figura 33	Comparação dos padrões de expressão de catepsina	61
Figura 34	Expressão imunoistoquímica de catepsina B em tireóide normal	62
Figura 35	Expressão imunoistoquímica de catepsina B em bócio	62
Figura 36	Expressão imunoistoquímica de catepsina B em adenoma folicular	63
Figura 37	Expressão imunoistoquímica de catepsinaB em carcinoma papilífero	63
Figura 38	Expressão imunoistoquímica de catepsina B em carcinoma folicular	64
Figura 39	A) Sobrevida global (n=84). B) Sobrevida global por diagnóstico	65
Figura 40	Sobrevida global por idade (n=84)	66
Figura 41	Sobrevida global de acordo com a recidiva (n=84)	66
Figura 42	Sobrevida global de acordo com o estágio clínico (n=84)	67
Figura 43	Sobrevida global de acordo com a expressão de p21 (n=84)	67
Figura 44	Sobrevida global dos pacientes com carcinoma folicular de acordo com a idade (n=34)	68
Figura 45	SG dos pacientes com carcinoma folicular de acordo com o estadiamento (n=34)	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Relação de anticorpos primários utilizados nas reações imunoistoquímicas	32
Tabela 2 Características clínicas, patológicas e imunoistoquímicas dos pacientes com carcinoma de tireóide (n=84)	37
Tabela 3 Sobrevida global de acordo com a recidiva e diagnóstico histológico	38

LISTA DE ABREVIATURAS

cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CDK	Cyclin dependent kinase
CDKI	Cyclin dependent kinase inhibitor
cDNA	Complimentary deoxyribonucleic acid
CLTC	Clathrin heavy chain gene
CLTCL	Clathrin heavy chain polypeptide-like gene
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGF	Epidermal growth factor
Gsp	Stimulatory G protein subunit alpha
IGF-1	Insulin growth factor 1
IGFBP-5	Insulin growth factor binding protein 5
KIP	Kinase inhibitor protein
MAP	Mitogen activating protein
ORESTES	Open reading frame expressed sequence tags
PI3K	Phosphoinositol 3-kinase
PKA	Protein kinase A
PKB	Protein kinase B
PLC	Phospholipase C
PTC	Papillary thyroid cancer
PPARγ1	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse-transcriptase polymerase chain reaction
SPI	Serine proteinase inhibitors
Skp2	S-phase kinase-interacting protein 2
TGF-β1	Transforming growth factor beta 1
TSH	Thyroid stimulating hormone
VEGF	Vascular endothelial growth factor

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A tireóide e suas patologias	1
1.2	Carcinomas diferenciados da tireóide	4
1.2.1	Tumorigênese	6
1.2.2	Diagnóstico e tratamento	10
1.2.3	Estadiamento e fatores prognósticos	11
1.3	Identificação de marcadores moleculares	14
1.3.1	P27	16
1.3.2	Alfa 1 antitripsina	17
1.3.3	Catepsina B	18
1.3.4	P21	20
1.3.5	Clatrina	20
1.3.6	IGFBP5	22
1.4	<i>Tissue microarray</i>	24
2	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Amostras	27
3.2	Construção de <i>tissue microarrays</i>	28
3.3	Reações imunoistoquímicas e anticorpos	30
3.4	Leitura das reações e interpretação dos resultados	33
3.5	Coleta de dados clínicos	34
3.6	Análises estatísticas	35
5	RESULTADOS	36
5.1	Características dos pacientes	36
5.2	Expressão de p27	39

5.3	Expressão de p21	44
5.4	Expressão de alfa 1 antitripsina	49
5.5	Expressão de IGFBP5	53
5.6	Expressão de clatrina	57
5.7	Expressão de catepsina B	61
5.8	Análises de sobrevida	64
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	77
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

ANEXOS

Anexo 1 - Ficha de dados clínicos

1 INTRODUÇÃO

1.1 A TIREÓIDE E SUAS PATOLOGIAS

Doenças tireoidianas são freqüentes na população e, geralmente, benignas, mas a relação entre elas, bem como seus aspectos moleculares, ainda são pouco compreendidos.

A tireóide surge a partir de uma invaginação do epitélio faríngeo, que cresce inferiormente, ocupando uma posição anterior à traquéia e cartilagem tireóidea. É dividida em 2 lobos maiores unidos por um istmo na linha média e, em cerca de 50% dos indivíduos, pode haver um lobo extranumerário chamado de piramidal. Cada lobo é composto por folículos de tamanhos variados, constituídos por colóide (tireoglobulina) circundado por uma camada de células foliculares (epitélio colunar cuboidal), que concentram iodo e estão envolvidas na produção dos hormônios tireoidianos (COTRAN et al. 1999).

A produção dos hormônios tireoidianos triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) é controlada por um mecanismo de *feedback* negativo. Níveis baixos de hormônios tireoidianos estimulam a liberação de TRH (hormônio de liberação da tireotropina) no hipotálamo e TSH (hormônio tireoestimulante) na hipófise anterior, elevando os níveis de T3 e T4. Por sua vez, o aumento dos níveis dos hormônios tireoidianos leva à supressão da secreção de TRH e TSH. A maior parte dos hormônios tireoidianos se liga, de modo reversível, a proteínas plasmáticas circulantes, como a tireoglobulina de ligação da tiroxina (TBG). No interior das células, os hormônios tireoidianos se

ligam a receptores nucleares, como o receptor de T3, modificando a expressão gênica e regulando a síntese de várias proteínas (REED-LARSEN 1993).

Uma característica da tireóide é sua capacidade de adaptação a diferentes estímulos através da modificação do seu padrão histológico, caracterizada por hiperplasia e involução do epitélio folicular. Falhas neste processo constante de adaptação se traduzem em distúrbios arquiteturais, como o bócio. Diversos agentes químicos chamados em conjunto de bociogênicos, como tiocinatos e flavonóides, presentes em determinados alimentos (repolho, nabo, amendoim, mandioca, soja) assim como cálcio e fluoretos presentes no fornecimento de água são capazes de inibir a síntese dos hormônios tireoidianos, aumentando os níveis de TSH. A hipersecreção de TSH promove um aumento difuso da glândula por hiperplasia celular (bócio) com conseqüente acúmulo de tireoglobulina (colóide). Durante este processo, pode ocorrer formação de nódulos de tamanho e atividade variados (COTRAN et al. 1999).

O bócio é uma das patologias mais freqüentes da tireóide e o grau de aumento da glândula é proporcional ao nível e duração da deficiência hormonal. O bócio multinodular (BMN) corresponde ao aumento da tireóide com modificação de sua arquitetura pela formação de nódulos e áreas de fibrose. Esses nódulos podem variar tanto em tamanho, forma e capacidade funcional. Para a formação dos nódulos são necessárias três etapas: 1) hiperplasia difusa por deficiência de iodo, presença de bociógenos nutricionais ou doença autoimune; 2) proliferação aumentada associada a danos no DNA, com aumento na carga mutacional e surgimento de um grande número de células portadoras de mutação. E, por último, o aumento da expressão de fatores de crescimento (IGF-I, TGF- β 1 ou EGF). Como resultado da co-estimulação

dos fatores de crescimento todas as células se dividem e formam pequenos clones. Quando a estimulação dos fatores de crescimento é interrompida, os clones de células com mutações de ativação, que adquiriram a capacidade de auto-estimulação, começam a se proliferar, formando pequenos nódulos tireoidianos (COTRAN et al. 1999). Esses nódulos, por sua vez, podem crescer de modo proeminente e indistinguível clinicamente de um câncer.

Nódulos tireoidianos são comuns e sua incidência depende da população em estudo, sexo, idade, método diagnóstico e exposição a determinados fatores ambientais (MAHOONEY et al. 2004). Em cerca de 10% a 37% dos pacientes assintomáticos, existe a presença de malignidade (DEGROOT et al. 1983).

A partir das células foliculares surgem os tumores bem diferenciados e, provavelmente os carcinomas anaplásicos. As neoplasias foliculares respondem pela maioria absoluta dos casos de câncer de tireóide (JOSSART e CLARK 1994). Além das células foliculares, o parênquima tireoidiano é composto por células parafoliculares ou células C, que produzem calcitonina e, são responsáveis pela formação dos carcinomas medulares. Os sarcomas e linfomas surgem a partir das células estromais e linfócitos, respectivamente.

As neoplasias epiteliais da tireóide podem ser classificadas em benignas, como o adenoma folicular, ou malignas.

O adenoma folicular manifesta-se como um nódulo firme, encapsulado, geralmente com folículos mais diferenciados na porção central. Na periferia da lesão, o padrão histológico é mais atípico e variado, provavelmente decorrente do crescimento expansivo (COTRAN et al. 1999). Os mecanismos que colaboram na patogênese dos adenomas seriam os mesmos descritos na formação do BMN. A

principal importância clínica dos adenomas é a diferenciação destes com os carcinomas foliculares; além de sintomas locais e hiperfuncionamento (tireotoxicose) em alguns casos.

Dentro do grupo de neoplasias malignas diferenciadas da tireóide, existem os carcinomas papilíferos (80% a 85% dos casos), os carcinomas foliculares (10% a 15%) e os carcinomas de células de Hürthle (3% a 5%) (JOSSART e CLARK 1994).

Pouco se conhece sobre a seqüência de eventos implicados no processo de carcinogênese da tireóide. Tentativas de se estabelecer associações biológicas e determinar as diferenças moleculares entre os distúrbios benignos e malignos da tireóide demonstraram, até o momento, resultados conflitantes. Sabe-se ainda muito pouco sobre como os genes interagem com os diferentes fatores ambientais (HEGEDUS et al. 2003).

1.2 CARCINOMAS DIFERENCIADOS DA TIREÓIDE

O câncer de tireóide, apesar de ser a neoplasia maligna endócrina mais freqüente (KARAYAN et al. 2000), representa apenas 1% de todos os tumores malignos. Embora pouco freqüentes na população geral e com excelente prognóstico, são de interesse prático pelos problemas de diagnóstico diferencial que suscitam, principalmente em relação às afecções benignas; pelo comportamento biológico que, apesar de indolente na maioria dos casos, pode evoluir com disseminação local e sistêmica rapidamente e; pela morbidade associada ao tratamento cirúrgico.

Entre os tumores esporádicos, o câncer de tireóide é o que apresenta o maior risco relativo (8,6) para os parentes em primeiro grau do paciente (GOLDGAR et al. 1994).

Os carcinomas diferenciados da tireóide (papilífero e folicular) acometem principalmente adultos, em idade mediana de 45 a 50 anos, com incidência preferencial no sexo feminino (SCHLUMBERGER 1998).

Desconhece-se a causa básica dos tumores tireoidianos, mas dois fatores são considerados importantes na indução da tumorigênese: a exposição à radiação ionizante (RON et al. 1995; MIZUNO et al. 1997; MAHOONEY et al. 2004) e a estimulação de TSH (RIVAS e SANTISTEBAN 2003). Outros fatores envolvidos na patogênese do carcinoma diferenciado de tireóide incluem a expressão de oncogenes (KIM et al. 2003) e; a associação com determinadas síndromes genéticas (BELL e MAZZAFERRI 1993).

Estudos epidemiológicos observaram uma maior incidência de carcinoma de tireóide em populações que consomem dietas pobres em iodo, ou ricas em vegetais que bloqueiam a absorção de iodo, provavelmente por elevação dos níveis de TSH (GALANTI et al. 1997).

Todas as formas de exposição à radiação parecem predispor ao desenvolvimento de carcinoma papilífero, principalmente em associação a rearranjos do gene *RET*. Os efeitos da radioterapia são dose-dependente e associados à exposição em idade precoce. O período de latência mínimo para o desenvolvimento de carcinoma papilífero é de dois a cinco anos, com pico em torno dos 20 anos (TUCKER e BOICE 1995; SCHNEIDER et al. 1993; MAHOONEY et al. 2004).

1.2.1 Tumorigênese

Até o momento, nenhum estudo conseguiu provar, de forma inequívoca, que o modelo de progressão tumoral em tireóide segue uma seqüência linear e previsível de eventos (benigno pré-maligno maligno metastático), mas a existência de fenótipos intermediários como os adenomas foliculares sugere esta possibilidade.

Estudos sugerem que os estágios iniciais do desenvolvimento do câncer de tireóide possam ser consequência da ativação de proto-oncogenes ou de receptores de fatores de crescimento. Por outro lado, alterações nos genes supressores de tumor como *P53* ou *Rb*, são observadas em formas pouco diferenciadas de câncer de tireóide, sugerindo que elas representariam eventos genéticos relativamente tardios (SEGEV et al. 2003).

Duas famílias de oncogenes estão associadas com os carcinomas diferenciados de tireóide: *RET* e *RAS*, enquanto mutações de ativação constitutiva do receptor de TSH e das proteínas G (*gsp*) estão associadas à formação de neoplasias benignas (adenomas). O conceito atual estabelece que adenomas com mutações do receptor de TSH não progridem para carcinoma a menos que um segundo evento ocorra dentro de um contexto de pressão de proliferação como na deficiência grave de iodo (KÖRLE 2004).

Mutações dos genes *RAS* com ganho de função são freqüentes em adenomas e carcinomas foliculares, sugerindo um possível evento precoce na tumorigênese da tireóide (CHALLETON et al. 1995). Mutações em *K-ras*, um dos três genes da família *RAS*, estão associadas à perda de diferenciação tumoral, comportamento clínico agressivo e pior prognóstico (GINESA et al. 2003). O efeito da ativação

constitutiva da proteína p21^{ras} decorrente das mutações de *RAS* leva à instabilidade genômica, mutações adicionais e transformação maligna (BOS 1989).

A associação entre a superexpressão de fatores que estimulam a proliferação celular e, a baixa expressão de fatores que regulam o crescimento celular confere vantagem proliferativa e expansão clonal de um ou vários focos celulares. O acúmulo de mutações com ganho de função e, a superação dos mecanismos de controle de morte celular levam à imortalização e capacidade de disseminação do tumor.

Os fatores que promovem a proliferação tumoral (ganho de função) incluem oncogenes e hormônios, enquanto os reguladores da diferenciação e progressão do ciclo celular dificultam a proliferação tumoral (perda de função). Já os fatores que controlam a imortalização e morte celular (telomerase e reguladores de apoptose) podem representar mecanismos tanto de ganho quanto de perda de função no processo de tumorigênese da tireóide (SEGEV et al. 2003).

Uma característica marcante dos carcinomas de tireóide é a elevada taxa de rearranjos gênicos e translocações cromossômicas, eventos relativamente raros na maioria dos tumores epiteliais. Rearranjos cromossômicos que levam à expressão inapropriada de uma proteína de fusão, contendo um domínio tirosina-quinase, parece ser um mecanismo comum e importante no desenvolvimento dos carcinomas diferenciados da tireóide (KIM et al. 2003). A presença do gene de fusão PAX8/PPAR γ 1, aparentemente é uma característica exclusiva dos carcinomas foliculares, não sendo detectada em adenomas (KROLL et al. 2000)

A presença de múltiplos focos ao diagnóstico é uma característica freqüente dos carcinomas papilíferos de tireóide que, aparentemente, surgem a partir de diferentes rearranjos de *ret*/PTC (SUGG et al. 1998).

Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

Na tireóide, o proto-oncogene *RET* é expresso normalmente pelas células parafoliculares; contudo, rearranjos do oncogene *ret/PTC* são observados em mais de 50% dos carcinomas papilíferos em adultos, não associados à radiação (WILLIAMS et al. 1996) e, em até 80% dos casos após exposição à radiação (ELISEI et al. 2001; MAHOONEY et al. 2004).

TSH controla a função tireoidiana através da sua ligação com o receptor de TSH (TSH-R), localizado na superfície das células foliculares (POSTIGLIONE et al. 2002). A ativação de TSH-R induz a ligação de diferentes proteínas G e ativação de diferentes vias de sinalização (LAUGWITZ et al. 1996).

Pelo menos dois mecanismos mediam as atividades de TSH nos processos de diferenciação e proliferação dos tireócitos normais: o aumento dos níveis de cAMP intracelular e a ativação da cascata de PLC-Ca². A ativação constitutiva da cascata de cAMP causa aumento na proliferação mas não parece ser suficiente para promover a transformação celular. É provável que as mutações no receptor de TSH sejam um evento iniciador na tumorigênese da tireóide, mas o desenvolvimento tumoral parece depender de mutações adicionais dos genes responsáveis pelo controle do crescimento celular e; da presença de outros fatores de crescimento, principalmente, insulina/IGF-1, EGF e outros (RIVAS e SANTISTEBAN 2003).

Em tireócitos humanos, a atividade da proteína quinase dependente de cAMP (PKA) é necessária para a estimulação mitogênica de TSH (KIMURA et al. 2001). A ativação de PKA ocorre quando o cAMP citoplasmático se liga às subunidades regulatórias de PKA (PKA-R), liberando as subunidades catalíticas (PKA-C) para localização nuclear e ativação dos mecanismos dependentes de PKA (RIVAS e SANTISTEBAN 2003).

Recentemente, KATO et al. (2004), desenvolveram um modelo animal que mimetiza o desenvolvimento completo do carcinoma folicular, obtido a partir de manipulação genética da expressão do receptor de hormônio tireoidiano TR β . A isoforma TR β é um dos dois principais alvos do hormônio T3. No modelo desenvolvido, os animais são heterozigotos para TR β . Eles possuem um alelo inativado de TR β , incapaz de criar um transcrito e; uma forma mutante do receptor de T3, o TR β^{PV} , identificado em um paciente portador de síndrome de resistência ao hormônio tireóideo. TR β^{PV} atua como um dominante negativo incapaz de se ligar a T3; demonstrando a atividade supressora de tumor de TR β

Baixa expressão de PTEN, um gene supressor de tumor, também é evento freqüente nas neoplasias foliculares, sugerindo que a haploinsuficiência e/ou fatores epigenéticos participariam no processo de carcinogênese. PTEN codifica uma fosfatase que desfosforila Akt provocando apoptose e/ou parada do ciclo celular em G1. A disfunção de PTEN leva ao aumento de Akt que, conseqüentemente, inibe a apoptose (SEGEV et al. 2003).

Akt/PKB é uma serina/treonina quinase homóloga a PKA associada à estimulação da proliferação celular via TSH e cAMP. Em linhagens celulares de rato, expressão constitutiva de Akt/PKB induz tanto à sobrevivência quanto ao crescimento insensível à inibição por contato (DE VITA et al. 2000).

Em resumo, a ativação inapropriada de diferentes vias de sinalização intracelulares, envolvidas na proliferação celular mediada por TSH parece levar à iniciação tumoral, mas alterações adicionais em outros mecanismos reguladores do crescimento celular são necessárias para completa transformação tumoral.

1.2.2 Diagnóstico e Tratamento

A avaliação de pacientes com nódulos tireoidianos é norteada por dois objetivos principais: exclusão de malignidade e definição dos aspectos funcionais do nódulo.

Clinicamente, pacientes com carcinomas bem diferenciados apresentam-se com nódulo tireoidiano de desenvolvimento assintomático. Os testes de função tireóidea, via de regra, são normais. Qualquer nódulo palpável, ou lesão maior que 1,5 cm identificada por exames de imagem, deve ser submetido à biópsia aspirativa por agulha fina (HAMBURGER 1994). As decisões terapêuticas são determinadas a partir dos resultados da biópsia, associados à história clínica do paciente.

Outros métodos comumente utilizados na investigação diagnóstica de uma alteração morfológica da tireóide são a cintilografia, utilizada para a determinação funcional de um nódulo palpável ou, para a pesquisa de tecido remanescente após realização de tireoidectomia e; a ultra-sonografia com ou sem Doppler colorido, capaz de determinar as características estruturais e hemodinâmicas das lesões, com índices de acurácia diagnóstica em torno de 90% nos casos de carcinoma papilífero (SHERMAN e GILLENWATER 2000; FUKUNARI et al. 2004).

O diagnóstico de malignidade é definido por aspectos histopatológicos, mas pode ser sugerido clinicamente pela presença de crescimento rápido de um nódulo, adenomegalias cervicais e rouquidão de início súbito. A citologia obtida por punção aspirativa por agulha é ainda o método mais eficaz para estabelecer o diagnóstico pré-operatório de malignidade (OGAWA et al. 2001). Entretanto, em até 20% dos casos, este procedimento pode não ser diagnóstico ou indicar apenas que a lesão é suspeita (GHARIB 1994). Nestes casos, a existência de marcadores tumorais poderia

ser de grande ajuda, principalmente no que se refere ao diagnóstico diferencial entre adenoma e carcinoma folicular; carcinoma folicular e variante folicular de carcinoma papilífero e, distinção entre adenoma e carcinoma de células de Hürthle (BALOCH e LIVOLSI 2002). Entretanto, a presença de nódulos de tamanho e função distintos na mesma glândula dificulta a determinação de um marcador exclusivo tanto para benignidade quanto malignidade. Dos vários candidatos descobertos e propostos que pareciam promissores (Galectin-3, Tiroperoxidase, PAX-8/PPAR γ , etc), nenhum foi incorporado à rotina diagnóstica até o momento (RAPHAEL 2002)e, apesar da discriminação entre nódulos benignos e malignos (FINLEY et al. 2004) ou entre adenomas e carcinomas foliculares (BARDEN et al. 2004) ser possível através de técnicas de cDNA *microarray*; tempo, custos e aparelhagem limitam sua aplicabilidade.

A partir dos resultados obtidos pela biópsia aspirativa e dos dados clínicos, as opções de tratamento incluem observação clínica aliada à supressão hormonal; utilização de métodos diagnósticos complementares, repetição da biópsia (OGAWA et al. 2001) ou ressecção cirúrgica. Não existe consenso sobre a extensão da ressecção cirúrgica. Lesões consideradas suspeitas ou sem diagnóstico definido geralmente são ressecadas (BURCH 1995).

Cerca de 30% dos casos de bócio apresentam câncer de tireóide associado e; a presença de calcificações detectadas por ultra-sonografia e/ou radiografia é indicação de ressecção cirúrgica (YAMASHITA et al. 1997).

1.2.3 Estadiamento e fatores prognósticos

A classificação TNM proposta pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) e American Joint Committee on Cancer (AJCC), atualmente utilizada, foi estabelecida em 1997 e revisada em 2002. Destina-se apenas aos casos de carcinomas e, utiliza os dados obtidos pelo exame anatomopatológico para a classificação pTNM. (GREENE et al. 2002; SOBIN e WITTEKIND 2002). Essa classificação avalia a extensão do tumor primário (T), a ausência ou presença de metástases em linfonodos regionais (N) e, a ausência ou presença de metástases à distância (M). Uma característica da classificação TNM em câncer de tireóide é a utilização do fator idade. Independente das categorias T e N, todos os pacientes com menos de 45 anos sem metástases à distância (M0) são classificados como estágio I, enquanto aqueles com metástases distantes (M1) pertencem ao estágio II. Os pacientes com 45 anos ou mais são classificados em quatro estágios (I a IV). Nos estágios I e II, o tumor encontra-se restrito à glândula e sem metástases linfonodais. Na revisão de 2002, o agrupamento de estágios para pacientes com 45 anos ou mais e, carcinomas papilífero e folicular foi revisado. O estágio III inclui tumores com mínima extensão além da tireóide e/ou metástases linfonodais (nível VI), o estágio IV foi subdividido em três subgrupos: IVA inclui tumores com metástases linfonodais cervicais ou mediastinais superiores ou, tumores de qualquer tamanho com extensão além da cápsula tireoidiana, invadindo partes moles do subcutâneo, laringe, traquéia, esôfago ou nervo laríngeo recorrente; IVB inclui tumores que invadem a fáscia prevertebral, artéria carótida ou vasos mediastinais; IVC inclui tumores avançados com metástases distantes. Outras modificações incluem a subdivisão de T4 em T4a e T4b, revisão do estadiamento linfonodal e, subdivisão da categoria T4 para carcinomas anaplásicos em T4a (ressecável) e T4b (irressecável).

As neoplasias diferenciadas têm comportamento indolente e, apresentam um prognóstico melhor em relação a outros tumores, com sobrevida em 10 anos de 80% a 95%; taxas de recidiva locorregional de até 20% e metástases à distância em 10% - 15% dos casos. Entre os fatores de risco para a recidiva estão: idade abaixo de 16 ou acima de 45 anos, extensão do tumor e o subtipo histológico (SCHLUMBERGER 1998). Pacientes com carcinoma papilífero apresentam sobrevida global (SG) significativamente melhor que aqueles com carcinoma folicular pouco diferenciado. A taxa de mortalidade do câncer diferenciado de tireóide é inferior a 10%, mas pode variar significativamente de acordo com o estágio pTNM, oscilando de 1,7% no estágio I a 60,9% no estágio IV (LOH et al. 1996).

As variáveis usadas no sistema de estadiamento TNM (tamanho do tumor, presença de invasão além da tireóide e, metástase linfonodais ou distantes ao diagnóstico) são fatores prognósticos importantes para recidiva e morte pelo câncer.

Ao contrário de outras neoplasias sólidas, o acometimento linfonodal parece não influenciar a sobrevida global, mas sim a recidiva local. Acometimento linfonodal é freqüente nos carcinomas papilíferos (HARNES et al. 1998) e, relativamente incomum nos carcinomas foliculares (45% versus 10%, respectivamente).

Em carcinomas papilíferos, a baixa expressão de p27, a superexpressão de ciclina D1 e extensão além da cápsula tireóidea são fatores preditivos independentes para o desenvolvimento de metástases linfonodais. Em microcarcinomas papilíferos de tiróide (< 1 cm) a diminuição da expressão de p27 também é fator preditivo de agressividade (KHOO et al. 2002).

Recidivas ocorrem em sua maioria, na região cervical (linfonodos e/ou leito cirúrgico). Cerca de 10% a 30% dos casos que apresentam recidiva local morrem pela doença e; 50% dos pacientes com metástases à distância apresentam também recorrência local concomitante. Destes, 50% a 90% morrem pela doença (JOSSART e CLARK 1994). A maioria dos casos de recorrência, excluindo aqueles com metástases distantes ao diagnóstico, ocorre nos primeiros 5 anos após o diagnóstico; demonstrando a necessidade de exames clínicos freqüentes neste período, independente da categoria de risco (LOH et al. 1996).

1.3 IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES

Modificações no padrão de expressão gênica em determinado tecido geralmente resultam de exposição ambiental e alterações fisiológicas ou patológicas intrínsecas. Atualmente, a partir de amostras obtidas de um tecido é possível realizar a análise da expressão gênica através de técnicas de detecção de DNA, RNA ou da proteína correspondente.

A heterogeneidade dos pacientes tem sido descrita como uma das grandes dificuldades para o estabelecimento de perfis gênicos para várias doenças. Por esta razão, a identificação de genes diferencialmente expressos que possam ser utilizados como marcadores específicos exige a comparação de um grande número de genes em amostras de múltiplos indivíduos. A técnica de cDNA *microarrays* (SCHENA et al. 1995) permite a análise da expressão de centenas a milhares de genes em um único ensaio, e o resultado combinado de experimentos distintos permite o estabelecimento de perfis gênicos para cada condição patológica, identificando genes muito ou pouco

expressos. O agrupamento de genes em classes de expressão, por sua vez, fornece pistas sobre a função biológica e a relevância de genes desconhecidos (QUACKENBUSH 2001).

Visando a identificação de marcadores moleculares nas neoplasias tireóideas, nosso grupo, utilizando duas diferentes técnicas de análise de expressão gênica, DDRT-PCR (*differential display* RT-PCR) e cDNA *microarray*, comparou os padrões de expressão de centenas de genes em amostras de tecido tireoidiano normal, adenoma folicular, bócio e carcinoma papilífero (STOLF et al. 2003). Dois tipos de *array* foram utilizados: *arrays* em membranas de nylon, com 213 clones obtidos por DDRT-PCR e; *arrays* de vidro, com 3800 clones ORESTES. Experimentos utilizando o primeiro tipo de *array* identificaram três genes diferencialmente expressos, cuja expressão foi analisada por RT-PCR em 10 amostras de cada tipo de tecido. Dentre esses genes, observou-se pela primeira vez que o gene IGFBP-5 encontrava-se significativamente mais expresso em carcinomas papilíferos que nos demais tecidos (STOLF et al. 2003).

A partir desta observação, os *arrays* em vidro foram, então, utilizados para avaliar o perfil de expressão de 3800 genes em aproximadamente 10 amostras de cada tipo de tecido tireoidiano (normal, bócio, adenoma folicular e carcinoma papilífero). Foram identificados 160 clones diferencialmente expressos entre quaisquer dois tipos de tecido, cujas seqüências foram determinadas e comparadas com as dos bancos de dados. Deste universo, um grupo de cinco genes diferencialmente expressos e associados a carcinogênese de outras neoplasias foi selecionado (P27, P21, Clatrina, Catepsina B e Alfa 1 Antitripsina), juntamente com o gene IGFBP5 para a realização deste projeto. Dentre as abordagens disponíveis, foi

optado pela utilização de imunistoquímica e *tissue microarray* (TMA) para analisar se a expressão protéica dos seis genes selecionados é consistente com a expressão do RNA.

1.3.1 P27

P27 (KIP1) é considerado um gene supressor de tumor e, a perda de sua expressão está associada a um pior prognóstico em diferentes neoplasias malignas (ITO et al. 1999).

A progressão do ciclo celular é facilitada por quinases dependentes de ciclina, as cdks (MORGAN 1995). A capacidade das cdks de fosforilar substratos específicos é regulada pela fosforilação e defosforilação da subunidade catalítica e pela associação com subunidades ativadoras, as ciclinas (DRAETTA 1994). A inibição da função de cdk é controlada pela ligação de subunidades reguladoras negativas, os inibidores de cdk (cdkis) aos complexos ciclina-cdk. P27 foi inicialmente identificado como um inibidor de cdk por sua capacidade de bloquear a atividade dos complexos de ciclinaE/cdk2 e ciclina A/cdk2. Duas famílias de Cdkis já foram caracterizadas. Os membros da família Ink4 de cdkis (p15, p16, p18, e p20), inibem a atividade de cdk4 e cdk6, enquanto os membros da família Kip/Cip (p21, p27, e p57) inibem especificamente a atividade de cdk2 (HENGST 1994).

A ligação da proteína nuclear p27 com as Cdkis promove a parada do ciclo celular na fase G1 por bloqueio da fosforilação das ciclinas. Os complexos ativados ciclina-cdkis, fosforilam alvos específicos, facilitando a progressão através das diferentes fases do ciclo celular. Crescimento descontrolado ou neoplásico está associado tanto a superexpressão de ciclinas (WANG et al. 1998), que são

reguladores positivos dos ciclos celulares, quanto a baixa expressão dos Cdkis, que são inibidores da progressão do ciclo celular. Portanto, a perda de função de p27 pode resultar no desenvolvimento e / ou progressão tumoral (HEDBERG et al. 2003).

Nos carcinomas de tireóide, os padrões de expressão imunoistoquímica de p27 estão relacionados com a transformação neoplásica e, variam de acordo com o fenótipo tumoral (RESNICK et al. 1998).

1.3.2 Alfa 1 antitripsina

A regulação de enzimas proteolíticas por inibidores endógenos é um pré-requisito para a manutenção da homeostase no organismo. O principal inibidor responsável pela atividade anti-proteolítica é a α 1-antitripsina.

A α 1-antitripsina é um inibidor de serina proteinase superexpresso em algumas neoplasias como o carcinoma papilífero de tireóide (POBLETE et al. 1996) e carcinoma de pâncreas (TRACHTE et al. 2002). Os inibidores de serina proteinases são considerados reguladores negativos de vários fenômenos fisiopatológicos.

Várias proteases secretadas por células tumorais, como o ativador de plasminogênio e as catepsinas, estão envolvidas na invasão tumoral e formação de metástases (DODWELL 1993). A inibição de qualquer etapa da cascata de reações proteolíticas que inclua a participação de serina proteases, necessárias para a lise de elementos estruturais importantes da membrana basal, poderia reduzir a capacidade de invasão das células tumorais. Portanto, inibidores de proteases como a α 1-antitripsina, poderiam suprimir em algum grau a atividade das proteases e, proteger o hospedeiro da invasão e disseminação tumoral.

Entretanto, existem evidências de que alguns destes inibidores de serina proteinases podem agir como reguladores positivos para otimização de algumas reações. Em tumores, os inibidores de serina proteinases celulares conferem o comportamento maligno das células tumorais através da modulação da resposta imune do hospedeiro; regulação da angiogênese; inibição de apoptose; alteração da cascata de sinalização intracelular e ativação de fatores de crescimento. Além disso, um equilíbrio crítico entre proteinases e seus inibidores parece ser necessário para a invasão das células tumorais *in vivo*, em que o inibidor de proteinases protegeria os componentes do estroma necessários durante a invasão tumoral e angiogênese (KARASHIMA et al. 1990).

As células malignas são caracterizadas por sua capacidade de disseminação e invasão dos tecidos normais. Esse dois processos envolvem atividades proteolíticas das células malignas que degradam a matriz extracelular. Entre as proteinases envolvidas neste processo estão as metaloproteinases (MMPs), produzidas tanto pelas células tumorais como pelas células do tecido adjacente. Existe evidência experimental de que o fragmento C-terminal de α 1-antitripsina gerado pelas MMPs aumenta o crescimento tumoral e a capacidade de invasão *in vivo* (KATAOKA et al. 1999). Além disto, análises comparativas entre os tumores e tecidos normais mostram uma correlação entre a expressão local de α 1-antitripsina e crescimento tumoral mais agressivo (HUANG et al. 2004).

1.3.3 Catepsina B

A catepsina B é uma cisteína protease envolvida na degradação intralisossômica de proteínas celulares e endocitadas. Na tireóide, a liberação

extracelular de tiroxina depende do processamento da tireoglobulina armazenada no lúmen dos folículos tireoidianos. A secreção de catepsina B induzida por estímulo de TSH, é responsável pela proteólise da tireoglobulina (LINKE et al. 2002).

A catepsina B sofre regulação transcricional, pós-transcricional e pós-traducional. Os mecanismos de regulação incluem transcrição aumentada, diferentes sítios de início da transcrição, presença de diferentes variantes de *splicing* do mRNA da catepsina B em cada tecido e, modificação pós-transcricional da proteína por processamento proteolítico, glicosilação, tráfico e inibição (RAO 2003).

A progressão maligna é freqüentemente associada com aumento na produção e/ou atividade de uma ou mais das várias proteinases de degradação de matriz extracelular (MEC). A catepsina B tem sido proposta como mediadora da disseminação das células tumorais por degradação dos componentes da matriz extracelular ou por ativação de outras proteases que são capazes de degradar a matriz extracelular (SPIESS et al. 1994). Além da participação direta na destruição tecidual, a catepsina B pode ser prejudicial por outras duas razões: ela aumenta a atividade de metaloproteinases (MMPs) também na ausência de mecanismos que aumentam a regulação destas enzimas e, estimula a angiogênese (KOSTOULAS et al. 1999).

A catepsina B tem sido associada a vários tumores. A inibição da expressão de catepsina pode suprimir a neovascularização induzida por tumor (YANAMANDRA et al. 2004). Ela também facilita a progressão tumoral indiretamente através da ativação de outras proteases latentes e/ou degradação dos inibidores de proteína de outras proteases. Portanto, a catepsina B pode ser um componente importante da cascata proteolítica associada à progressão tumoral (YAN et al. 1998).

Investigações com catepsinas e seus inibidores endógenos em câncer de mama, pulmão e cabeça e pescoço demonstraram o elevado impacto prognóstico na sobrevida dos pacientes (LAH e KOS 1998).

1.3.4 P21

O gene P21^{Cip1/WAF1} foi identificado através da interação de seu produto com Cdk2 (HARPER et al. 1993). P21 inibe a progressão do ciclo celular por ligação com complexos ciclina-Cdk na fase G1 e exerce importante função na parada do crescimento celular após a ocorrência de dano no DNA (BRUGAROLAS et al. 1995).

A proteína p21 também se liga ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), bloqueando a síntese de DNA pela DNA polimerase δ (CHEN et al. 1995); promove a associação de Cdk4 e ciclina D1, (LABAER 1997) e; é capaz de inibir a apoptose (POLYAK et al. 1996).

As diferentes funções de p21 são determinadas de acordo com sua distribuição intracelular e, são dependentes do estágio de diferenciação da célula. A atividade como inibidor do ciclo celular está associada com sua localização nuclear (STEINMAN et al. 1994), mas sua capacidade de inibir a apoptose está relacionada com a localização citoplasmática (ASADA et al. 1999), através da inibição da ativação da cascata de MAP quinase. Fosforilação de p21 por Akt, resulta em sua localização citoplasmática e supressão de sua atividade inibidora de crescimento.

A capacidade de P21 em inibir a proliferação celular contribui para seu papel como gene supressor de tumor; entretanto, sua atividade anti-apoptótica pode contribuir para seu potencial como oncogene (GARTEL e TYNER 2002).

1.3.5 Clatrina

Em organismos eucarióticos, o transporte intracelular entre as membranas de diferentes organelas é realizado através de vesículas formadas por invaginações especializadas da membrana plasmática, recobertas por proteínas recrutadas a partir do citoplasma. Essas proteínas reconhecem as membranas-alvo e determinam tanto a formação quanto a carga das vesículas envolvidas no processo de endocitose, que ocorre basicamente por duas vias: a dependente de clatrina e a independente de clatrina. Descrita inicialmente por PEARSE em 1976, a clatrina é a principal proteína que se liga às membranas (GOLDSTEIN et al. 1979) através de complexos adaptadores. A presença de clatrina no fuso mitótico sugere sua participação também no processo de mitose (OKAMOTO et al. 2000).

A molécula de clatrina possui uma estrutura com três prolongamentos, denominada triskelion, composta por cadeias pesadas e leves (SMITH et al. 1998). Rearranjos entre um dos genes de cadeia pesada de clatrina (*CLTC*) e o gene *ALK*, dão origem ao oncogene de fusão *CLTC-ALK* capaz de transformar, *in vivo*, linhagens celulares de origem mesenquimal e linfóide. A molécula de clatrina presente na proteína de fusão *CLTC-ALK* promove a ativação constitutiva e relocalização do domínio quinase *ALK* a partir de sua posição normal na superfície interna da membrana celular dentro do citoplasma. A expressão da proteína *ALK* é um fator preditivo independente de sobrevivência e, funciona como um marcador biológico de um tipo específico de linfoma anaplásico de células foliculares (BRIDGE et al. 2001). Em linhagens celulares de câncer de próstata, andrógenos parecem estimular a expressão aumentada do gene da cadeia pesada da clatrina. Neste modelo, a clatrina poderia estar envolvida na exocitose de PSA e calicreína

(PRESCOTT e TINDALL 1998).

Pequenas seqüências lineares de aminoácidos, chamadas '*trafficking motifs*', encontradas nas porções citoplasmáticas das proteínas transmembrana que estão sendo transportadas, determinam as rotas entre as membranas ao longo das quais a proteína é transportada (ARIDOR e TRAUB 2002). Em eucariontes superiores a ubiquitina funciona como um desses arranjos endocíticos (HAGLUND et al. 2003). A ubiquitinação de receptores de fator de crescimento parece induzir a sua internalização a partir da membrana celular, assim como, a incorporação nas vesículas intraluminais do endossoma. Este último fato resulta no desligamento da sinalização do receptor e, conseqüentemente na sua degradação (OWEN 2004). Portanto, distúrbios no funcionamento dos mecanismos de transporte intracelular, causados por mutações ou expressão alterada das proteínas envolvidas no processo de endocitose, poderiam interferir com a proliferação celular controlada por cascatas de sinalização (FLOYD e DE CAMILLI 1998).

1.3.6 IGFBP5

As proteínas de ligação do fator de crescimento do tipo insulina (IGFBPs) foram descobertas durante as tentativas de purificação de IGF-1 (ZAPF et al. 1975). As IGFBPs foram nomeadas de acordo com a ordem histórica de identificação. Elas compreendem uma família de proteínas que interagem com IGFs (IGF 1 e 2), exercendo um papel importante na regulação da proliferação, diferenciação, transformação e apoptose celular (SHIMASAKI et al. 1991). Os principais determinantes da distribuição tecidual de IGFs são os fatores que regulam a síntese de IGFBPs nos diferentes tipos celulares (JENNISCHE et al. 1987).

As IGFbps são capazes de se ligar à superfície celular ou à matriz extracelular, têm múltiplas funções tanto dependentes quanto independentes de IGF, como por exemplo inibir ou intensificar a ação de IGFs resultando assim em supressão ou estimulação da proliferação celular, respectivamente (JENNISCHE et al. 1987).

A regulação da transcrição gênica de IGFbp está sob o controle de vários hormônios e é específica em cada tecido. Uma vez ligadas aos IGFs, as IGFbps exercem três importantes efeitos: transporte de IGFs, proteção de IGFs da degradação e regulação da interação entre IGFs e o receptor 1 de IGF (KELLEY et al. 1996).

Em função da maior afinidade que IGF-1 possui pelas IGFbps em relação a seu receptor (IGF-1R), a ligação de IGFbps com IGF-1 é capaz de suprimir a ação de IGF. Por outro lado, esta mesma ligação também é capaz de proteger IGF-1 da degradação proteolítica, favorecendo sua ação por aumento da biodisponibilidade tecidual (COLLETT-SOLBERG e COHEN 1996).

IGFBP-5 libera IGFs por redução da afinidade entre eles ao se ligar a receptores específicos na membrana celular e, ao se aderir à superfície celular ou à matriz extracelular (KELLEY et al. 1996).

Modificações nas condições fisiológicas podem influenciar processo de proteólise de IGFbps (JONES E CLEMONS, 1995). Como os efeitos de IGF podem ser tanto suprimidos quanto potencializados por IGFbps, a proteólise destas pelas proteases de IGFbps exerce um importante papel na regulação da ação de IGF. Um exemplo é a capacidade que o PSA, uma protease, tem de clivar IGFbp3 e 5, reduzindo a afinidade por IGF-1 e, conseqüentemente, restaurando a atividade

mitogênica de IGF-1 (COHEN et al. 1994). Outras proteases capazes de clivar IGFBPs são a catepsina-D (CLAUSSEN et al. 1997), as metaloproteinases de matriz (FOWLES et al. 1994), a plasmina (LALOU et al. 1994) e a trombina (ZHENG et al. 1998).

1.4 TISSUE MICROARRAY

A tecnologia de cDNA microarray permite a determinação simultânea do nível de expressão de milhares de genes em uma amostra de tecido tumoral (FREEMAN et al. 2000), possibilitando a subclassificação de determinadas neoplasias de acordo com o perfil de expressão gênica e, revelando novos e potencialmente importantes oncogenes. Entretanto, essa tecnologia só permite a análise de uma amostra tumoral por experimento.

A identificação de genes diferencialmente expressos em uma amostra tumoral requer a confirmação de que o perfil encontrado reflete uma alteração molecular característica da neoplasia e não apenas da amostra em questão. Isto se tornou factível através do desenvolvimento de técnicas de hibridização em *tissue arrays*.

Levando-se em consideração que são as proteínas, e não o DNA ou RNA, os responsáveis pela realização da maioria das funções celulares; a avaliação direta da expressão e da atividade das proteínas dentro da célula é o melhor determinante da função dos genes e suas respectivas vias de sinalização.

A tecnologia de *tissue microarray* (TMA), descrita inicialmente por KONONEN et al. (1998) foi concebida para a realização da análise simultânea da expressão gênica em múltiplas amostras tumorais, com o objetivo de determinar a

importância diagnóstica, prognóstica e terapêutica dos genes e vias de sinalização envolvidos no desenvolvimento do câncer que estavam sendo descobertos por novas técnicas de análise genômica por cDNA *microarray*.

Na construção de TMAs, centenas de biópsias cilíndricas milimétricas obtidas de tecidos conservados em blocos de parafina, são transferidas para novos blocos e, os cortes depositados em seguida em lâminas de vidro para análise (SIMON e SAUTER 2002).

Várias técnicas podem ser utilizadas nas análises em TMA, incluindo a imunohistoquímica (HOOS et al. 2001). TMAs são úteis na investigação de diferentes moléculas potencialmente envolvidas no desenvolvimento e/ou progressão tumorais e; na determinação de fatores preditivos/prognósticos.

Taxas de discordância e perda de amostra tecidual podem chegar a 10% e 30%, respectivamente, quando são utilizadas uma ou duas amostras. A utilização de amostras com maior número de réplicas mantém o número de casos perdidos mais baixo e, as taxas de concordância, mais elevadas (HOOS et al. 2001).

Amostras de diferentes blocos de tumor do mesmo paciente podem melhorar a eficácia dos TMAs além da obtida em apenas uma área do tumor (KALLIONIEMI et al. 2001).

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Estudo retrospectivo que tem como objetivo principal, complementar por técnica de *tissue microarray*, a análise do padrão de expressão de proteínas correspondentes a um grupo de seis genes diferencialmente expressos em tecidos tireoidianos, utilizando amostras de tecido normal, bócio multinodular, adenomas foliculares e carcinomas diferenciados de tireóide (papilíferos e foliculares).

Como objetivo secundário, será avaliada a existência de alguma relação entre o padrão de expressão diferencial das proteínas analisadas e a evolução clínica dos casos de carcinomas.

É importante salientar que este projeto não foi desenhado com o intuito de determinar o valor prognóstico de possíveis marcadores tumorais. Nosso objetivo é analisar as informações obtidas a partir de análises de expressão do RNA e; se possível, identificar possíveis marcadores de malignidade que possam ser incorporados à rotina diagnóstica dos nódulos tireoidianos; uma vez que os aspectos histológicos do adenoma folicular são muito semelhantes aos do carcinoma folicular e, a distinção entre os dois se baseia principalmente na presença de invasão capsular, detectada apenas após a realização de cirurgia.

Embora os trabalhos com cDNA *microarray* tenham identificado genes capazes de distinguir entre tecido normal, bócio, adenoma folicular e carcinoma papilífero, esta tecnologia implica em custos elevados e necessidade de centros especializados, dificultando desta forma a sua aplicação como método de rastreamento e/ou diagnóstico em larga escala.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Para a realização deste estudo foram utilizadas amostras teciduais de pacientes submetidos a tireoidectomias no Hospital do Câncer de São Paulo. As amostras foram selecionadas com o objetivo de avaliar, por imunohistoquímica, a expressão protéica de seis genes selecionados com base nos resultados das análises por cDNA *microarray* e DDRT-PCR.

Primeiro foi realizada uma pesquisa no banco de dados do Departamento de Anatomia Patológica para identificar casos registrados com diagnóstico anatomopatológico de bócio, adenoma folicular, carcinoma papilífero e carcinoma folicular. Foram selecionados apenas aqueles casos que, após a confirmação do diagnóstico (revisão histopatológica), dispunham de material biológico (blocos) no arquivo de tumores do hospital. As amostras de tecido normal foram selecionadas entre estes casos, assim distribuídas: bócio (n=4), adenoma (n=4), carcinoma papilífero (n=6) e carcinoma folicular (n=4); mas a coleta do material foi realizada em blocos que continham apenas áreas de tireóide normal.

As lâminas selecionadas representativas de cada tecido correspondem ao material biológico de 152 pacientes submetidos a tireoidectomia no período entre janeiro de 1984 a dezembro de 2002.

Foram coletadas 18 amostras de tecido tireoidiano normal, 18 amostras de bócio multinodular (BMN), 50 amostras de adenoma folicular, 50 amostras de

carcinoma papilífero e 36 amostras de carcinoma folicular.

No projeto inicialmente proposto, foram estabelecidos números iguais de amostras para cada tipo de distúrbio tireoidiano. Entretanto, alguns fatores contribuíram para modificação do número inicialmente proposto de amostras. Em relação aos casos de bócio, a presença de grandes quantidades de colóide determinou a necessidade de biópsias com maior diâmetro (2 mm). Este por sua vez, determinou o número de amostras que poderiam ser colocadas nos blocos receptores de TMA.

Quanto aos carcinomas foliculares, o motivo de redução do número de amostras foi a falta de material biológico suficiente no arquivo de tumores do hospital. Quatro amostras foram obtidas de dois pacientes, mas de focos diferentes do tumor (casos 137/138 e 145/153) como sugerido por KALLIONIEMI et al. (2001).

Novos cortes de 4 μ m dos blocos de parafina dos casos selecionados foram obtidos e corados pela técnica de hematoxilina/eosina (HE) para delimitar as áreas doadoras e, confirmar se o material biológico não havia sido totalmente utilizado durante a confecção das lâminas utilizadas no diagnóstico pós-operatório. Foi utilizado microscópio ótico Labophot-Nikon.

3.2 CONSTRUÇÃO DE *TISSUE MICRO ARRAYS* (TMA)

Foram construídos três blocos de TMA para a realização do estudo imunoistoquímico. Dois blocos receberam as amostras (2mm de diâmetro) de tecido normal e bócio, cada bloco com 36 amostras (normal = 18 e bócio = 18). No terceiro bloco, foram colocadas as amostras (1mm de diâmetro) de adenoma folicular (50),

carcinoma papilífero (50) e carcinoma folicular (36), nesta ordem.

Após a delimitação das áreas doadoras nos blocos parafinados, de acordo com a marcação feita previamente nas lâminas submetidas à revisão histopatológica, foram obtidas biópsias cilíndricas com 1 e 2 mm de diâmetro utilizando um *tissue microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, MD). Todas as amostras foram coletadas em duplicata, transferidas para os 3 blocos de parafina receptores e dispostas em fileiras paralelas. No bloco nº 1 foram colocadas as amostras de tireóide normal e bócio (nesta ordem), dispostas ao longo de seis fileiras paralelas, contendo seis casos cada. No bloco nº 2 foram colocadas, seguindo a mesma ordem, as duplicatas destas 36 amostras. A separação em dois blocos foi necessária em função do diâmetro das amostras (2mm). No bloco nº 3 foram dispostas, todas as amostras (1mm) de adenoma folicular, carcinoma papilífero e carcinoma folicular, nesta ordem

O primeiro *spot* nos três blocos de TMA foi preenchido por uma biópsia de fígado humano normal, apenas para marcar a fileira inicial de cada *array*.

Em seguida, foram obtidos cortes de 4 µm de cada bloco de TMA, que foram transferidos para lâminas de vidro e corados pelo método HE para revisão patológica. Após a confirmação da representatividade de cada tipo histológico, os três blocos foram totalmente seccionados (4 µm) e o material transferido para lâminas de vidro para a realização das reações imunoistoquímicas com os anticorpos selecionados (Tabela 1).

O maior diâmetro das amostras dos blocos 1 e 2 foi escolhido para se obter uma quantidade maior de células epiteliais e, evitar a obtenção de amostras de bócio que contivessem apenas colóide.

3.3 REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS E ANTICORPOS

Todas as reações de imunistoquímica foram realizadas por funcionária do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer de São Paulo, conforme o protocolo de reações descrito a seguir.

Para cada anticorpo analisado, foram utilizadas duas lâminas distando em média 150- μ m em profundidade uma da outra, de tal forma a se obter resultados em quadruplicata.

Protocolo de reações:

Desparafinização dos cortes de 4 μ m de espessura, do material incluído em parafina, em lâminas previamente tratadas com 3-Aminopropyltriethoxy-silano (Sigma, A-3648, USA), e deixadas por 24 horas em estufa a 60°C:

- 1 Xilol a 60°C por 20 minutos;
- 2 Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos;
- 3 Etanol 100% por 30 segundos;
- 4 Etanol 95% por 30 segundos;
- 5 Etanol 70% por 30 segundos;

Lavar as lâminas em água corrente e destilada;

Ferver a solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 em panela de pressão (Eterna®, Nigro) destampada, mergulhar as lâminas e lacrar a panela com a válvula de segurança aberta;

Após a saída do vapor saturado, abaixar a válvula de segurança e aguardar a pressurização total. Contar 4 minutos após esse sinal;

Deixar a panela fechada sob água corrente por 10 minutos. Destampar a panela com as lâminas e deixar por mais 10 minutos à temperatura ambiente;

Incubar as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido (Tabela 1) em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A-9647, USA) e azida sódica (NaN_3) 0,1% por 18 horas a 4°C em câmara úmida;

Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;

Proceder ao bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 3% (água oxigenada 10 vol) com trocas de 5 minutos cada; 1

Lavar as lâminas em água corrente e destilada;

Incubar com o anticorpo secundário biotinizado-reagente C (Biotinylated goat anti-mouse/rabbit/goat Ig) do kit StreptABComplex/HRP Duet (mouse/rabbit/goat) (Dako A/S, K492, Denmark) no título pré-estabelecido de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C ou, anti-sheep biotinizado 1:2000 (Vector BA6000);

Incubar com o complexo-reagente A (Streptavidin) no título pré-estabelecido de 1:200 e reagente B (Biotinylated peroxydase) no título pré-estabelecido de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C;

Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;

Incubar as lâminas em solução substrato: 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) 60mg% (Sigma, D-5637, USA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H_2O_2 6% (água oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz;

Observar ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação;

Lavar em água corrente e destilada por 3 minutos;

Contracorar com Hematoxilina de Harris por 1 minuto;

Lavar bem em água corrente e destilada;

Imergir 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%),

lavando em seguida em água corrente e destilada;

Desidratar as lâminas em:

Etanol 80% por 30 segundos;

Etanol 95% por 30 segundos;

Etanol 100% 2 vezes por 30 segundos cada;

Xilol 4 vezes por 30 segundos cada;

Montagem das lâminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Germany).

Tabela 1 - Relação de anticorpos primários utilizados nas reações imunoistoquímicas.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
Rabbit anti-human alpha-1 antitrypsin	Policlonal	1:1000	Dako A/S, Denmark
Monoclonal mouse anti-human p27 ^{kip1}	SX53G8	1:200	Dako A/S, Denmark
Sheep anti-human cathepsin B	Policlonal	1:5000	The Binding Site, UK
Monoclonal mouse anti-human p21 ^{WAF1/Cip1}	SX118	1:100	Dako A/S, Denmark
Goat anti-human IGFBP5 (C18)	Policlonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
Mouse anti-human Clathrin Heavy Chain	23	1:250	BD Transduction Laboratories

3.4 LEITURA DAS REAÇÕES E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

As reações de imunohistoquímica foram realizadas em quadruplicatas e, foi determinado um score para cada caso, considerando a intensidade da reação e o número de células positivas. Para cada reação foram adotados os seguintes critérios:

Intensidade:

0 = nenhuma célula positiva

1 = fraco

2 = moderado

3 = forte

4 = muito forte

Positividade:

0 = nenhuma célula positiva.

1 = < 10% células positivas.

2 = >10% e < 50% células positivas.

3 = > 50% e < 90% células positivas.

4 = > 90% células positivas.

As reações imunohistoquímicas foram submetidas à leitura em microscópio óptico com cabeçote duplo, em conjunto com a Dra. Maria Betânia M. Araújo, patologista cirúrgica do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer.

Para cada amostra, foi obtido um *score* final, somando-se o *score* da intensidade da reação ao *score* da porcentagem de células positivas (ALLRED et al. 1998), dividido pelo número de leituras efetuadas (máximo de 4 leituras - quadruplicata), conforme descrito por MEIRELES et al. 2004.

$\text{Score final} = \frac{\Sigma \text{ dos scores (valor de intensidade + valor de porcentagem)}}{\text{Número de leituras (1 a 4)}}$
--

3.5 COLETA DE DADOS CLÍNICOS

Após a obtenção dos resultados imunoistoquímicos, foram coletados os dados clínicos registrados em prontuário dos casos utilizados para coleta de material biológico; com o intuito de avaliar a existência de alguma relação entre os resultados obtidos na análise imunoistoquímica e as características clínicas dos pacientes portadores de carcinoma papilífero e folicular.

É importante ressaltar novamente que este projeto não foi desenhado com a intenção de avaliar o valor prognóstico dos marcadores analisados e, sim, analisar e validar os dados obtidos na análise genômica.

Os dados clínicos coletados incluíram:

- Diagnóstico histológico (carcinoma papilífero *versus* carcinoma folicular);
- Sexo
- Idade ao diagnóstico
- Raça
- Estádio clínico
- Data e tipo de cirurgia realizada (Tireoidectomia total x parcial x linfadenectomia associada);
- Tratamento complementar à cirurgia (Iodo radioativo, Radioterapia, Quimioterapia);
- Recidiva (data, local e tratamento realizado);
- Coexistência de outras patologias tireoidianas (tireoidite linfocitária, bócio);
- Data do último seguimento e status clínico (vivo *versus* morto).

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a comparação dos padrões de expressão das seis proteínas analisadas foram utilizados testes de Kruskal-Wallis e one-way ANOVA. A comparação entre os grupos (normal, bócio, adenoma, carcinoma papilífero e carcinoma folicular) que apresentaram padrão de expressão diferencial foi realizada pelo método de Tukey-Kramer, para determinação da diferença entre os pares de grupos. O intervalo de confiança estipulado para todos os testes foi de 95%, com erro α menor que 5%.

As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier e, considerados significativos os resultados com erro $\alpha \leq 5\%$. O tempo de sobrevida global (SG) foi definido como o período entre o diagnóstico e o óbito. O tempo de SG dos pacientes vivos foi determinado a partir da data da última avaliação clínica (KAPLAN e MEIER 1958). Para as análises de sobrevida, os estádios IVA, IVB e IVC (GREENE et al. 2002; SOBIN e WITTEKIND 2002) são considerados em conjunto como estágio IV. Diferenças entre as curvas de sobrevida foram analisadas pelo teste de *log-rank*. Foram realizadas análises univariadas com os fatores prognósticos já conhecidos para câncer de tireóide: idade (< 45 anos *versus* 45 anos); tipo histológico (carcinoma papilífero *versus* carcinoma folicular), e estadiamento clínico (EC I, II, III e IV)e; com os dados obtidos nas análises imunoistoquímicas. O software estatístico SPSS 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) foi utilizado para a realização dos cálculos e gráficos.

A análise de SG de acordo com a expressão de p21 e p27 foi realizada considerando a expressão das proteínas como uma variável dicotomizada classificada como negativo (score final = 0) ou positivo (score final > 0).

4 RESULTADOS

As análises estatísticas mostraram diferenças significativas no padrão de expressão das proteínas p27, p21, clatrina, IGFBP5 e alfa1-antitripsina. Ao contrário do que foi demonstrado nos estudos prévios com cDNA *microarray*, não foi observada expressão protéica diferencial em relação à catepsina B ($p = 0,305$).

A existência de evidências na literatura sobre a importância da localização celular de p21 e p27 (ASADA et al. 1999; ZHOU et al. 2002; BALDASSARE et al. 1999) e a observação inicial de um padrão distinto de coloração entre as amostras de tecido normal e carcinoma, motivaram a análise em separado do padrão de expressão imunohistoquímica nuclear e citoplasmática destas proteínas.

4.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

As características clínico-patológicas dos pacientes encontram-se resumidas na Tabela 2. Todos os pacientes foram incluídos nas análises de sobrevida. Nove pacientes não mantiveram o seguimento clínico adequado (8 com carcinoma folicular e 1 com carcinoma papilífero). Esses pacientes foram considerados como vivos na data da última consulta registrada em prontuário. Entre os antecedentes patológicos, 13 pacientes tinham história prévia ou concomitante de carcinoma basocelular de face (4), câncer de mama (4), câncer de colo de útero (2), câncer de pulmão (2), sarcoma (2) e linfoma não-Hodgkin (1). Um paciente foi exposto à radioterapia externa para tratamento de câncer de mama 14 anos antes do diagnóstico de

carcinoma papilífero de tireóide. Em relação aos antecedentes familiares, onze pacientes com carcinoma papilífero relataram outros casos de câncer na família; sendo que apenas um era câncer de tireóide.

Tabela 2 - Características clínicas, patológicas e imunoistoquímicas dos pacientes com carcinoma de tireóide (n=84).

Características dos pacientes	P*	Tipo Histológico do Carcinoma		P**
		Papilífero (n=50) / SG (n) / (%)	Folicular (n=34) / SG (n) / (%)	
Idade	0,0002			0,005
< 45 anos		30 / 100%	11 / 90,9%	
45 anos		20 / 95%	23 / 47,8%	
Sexo	0,959			NS
Feminino		42 / 100%	27 / 59,2%	
Masculino		8 / 87,5%	7 / 71,4%	
Raça	0,683			NS
Branca		43 / 97,6%	29 / 62%	
Negra		7 / 100%	4 / 50%	
Asiática		0	1 / 100%	
Estadiamento	0,00001			0,0001
I		39 / 100%	13 / 92,8%	
II		1 / 100%	4 / 50%	
III		6 / 100%	4 / 75%	
IV		4 / 75%	13 / 25%	
Cirurgia	0,212			NS
TT		19 / 100%	25 / 64%	
TP		6 / 100%	6 / 50%	
T + L		25 / 96%	3 / 66%	
Recidiva	0,00001			0,0014
Sim		3 / 66,6%	13 / 23%	
Não		47 / 100%	21 / 85,7%	
Tireoidite	0,128			NS
Sim		15 / 100%	2 / 100%	
Não		35 / 97,1%	32 / 59,3%	
Bócio	0,757			NS
Sim		19 / 100%	14 / 71,4%	
Não		31 / 96,7%	20 / 55%	
P21	0,0094			NS
Positivo		41 / 97,5%	13 / 84,6%	
Negativo		9 / 100%	21 / 47,6%	
P27	0,770			NS
Positivo		32 / 96,8%	18 / 66,6%	
Negativo		18 / 100%	16 / 56,2%	
Status				
Vivo		49 / 98%	21 / 61,7%	0,0014
Morto		1	13	

Legenda: Cirurgia: TT, tireoidectomia total; TP, tireoidectomia parcial; T + L, tireoidectomia + linfadenectomia. SG: sobrevida global. n: número de pacientes. NS: não significativo.

Os pacientes com carcinoma folicular apresentaram maior recorrência do tumor após o tratamento cirúrgico quando comparados aos pacientes com carcinoma papilífero (13 *versus* 3, respectivamente), sendo que a maioria (10/13 pacientes) evoluiu para o óbito (Tabela 3). A sobrevida mediana dos pacientes com carcinoma folicular recidivado foi de 113, 53 meses (0,00–245,21; IC 95%). Os sítios de metástases à distância foram ossos, pulmão e SNC. O único óbito registrado entre os casos de carcinoma papilífero ocorreu em um paciente com idade superior a 45 anos e estágio clínico (EC) avançado ao diagnóstico (EC IV).

Entre os casos diagnosticados em idade inferior a 45 anos, apenas um óbito foi observado. Neste caso específico, a paciente desenvolveu recidiva local e à distância oito anos após o diagnóstico inicial e, evoluiu para o óbito cerca de cinco anos após o diagnóstico da recidiva.

A maioria dos 84 pacientes não apresentava tireoidite linfocitária ou bócio associados ao câncer de tireóide (80% e 60%, respectivamente). Óbitos foram observados em quatro casos de carcinomas foliculares associados a bócio, mas nenhum óbito ocorreu em pacientes com tireoidite associada. Contudo, nenhuma destas co-morbidades foi considerada fator prognóstico na amostra examinada (Tabela 2).

Tabela 3 - Sobrevida global de acordo com a recidiva e diagnóstico histológico.

Diagnóstico	Recidiva						P
	Sim			Não			
	n	Óbito	SG(%)	n	Óbito	SG(%)	
Ca Papilífero	3	1	66%	47	0	100%	0,0014
Ca Folicular	13	10	23%	21	3	85%	0,00001
Total	16	11	31,5%	68	3	95,5%	

Legenda: n: número de pacientes; SG: sobrevida global; Ca: carcinoma.

4.2 EXPRESSÃO DE P27

Foi observada expressão diferencial para p27 ($p < 0,0001$) entre os diferentes tipos de tecido tireoidiano, principalmente ao se comparar tecidos com e sem malignização (Figuras 1 e 2).

Nas comparações entre os pares de tecidos, as diferenças entre os padrões de expressão nuclear no tecido normal e nos carcinomas papilífero e folicular foram significativas (Figura 1). A comparação entre bócio e carcinoma papilífero também mostrou resultado significativo (Figura 2).

A expressão de p27 foi caracteristicamente nuclear nos tireócitos normais (Figura 3). A maioria das células malignas, tanto papilíferas quanto foliculares, apresentou expressão de p27 predominantemente citoplasmática (Figuras 6 e 7).

Não foi observada diferença significativa entre a expressão, tanto nuclear quanto citoplasmática, nas comparações entre tireóide normal, bócio e adenoma folicular.

Entre os tecidos neoplásicos (adenomas e carcinomas), a expressão nuclear, mas não citoplasmática, de p27 foi significativamente maior nos adenomas foliculares quando comparados aos carcinomas foliculares ($p < 0,008$); e não houve diferença entre os dois tipos de carcinoma ($p = 0,809$).

Em relação à localização citoplasmática de p27, ela foi significativamente diferente entre carcinoma papilífero e todos os outros tecidos, incluindo carcinoma folicular ($p < 0,023$).

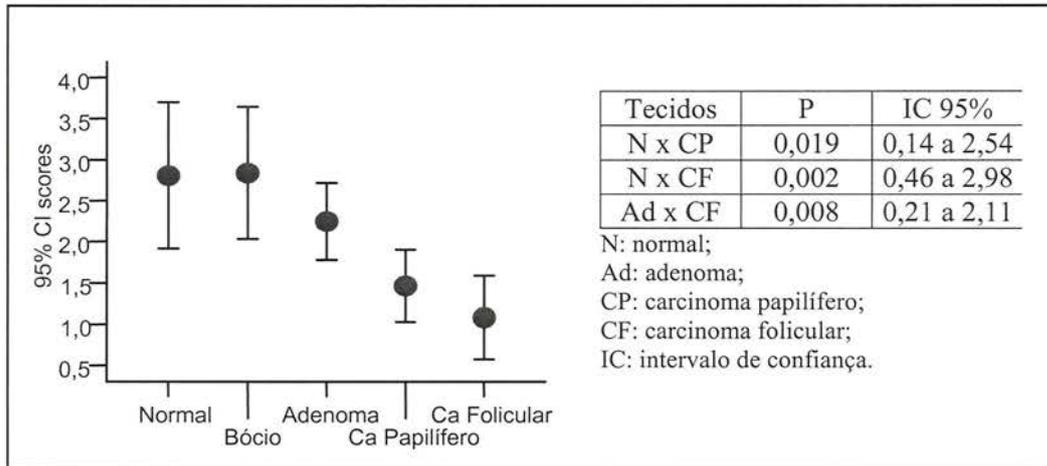


Figura 1 - Comparação entre os padrões de expressão nuclear de p27.

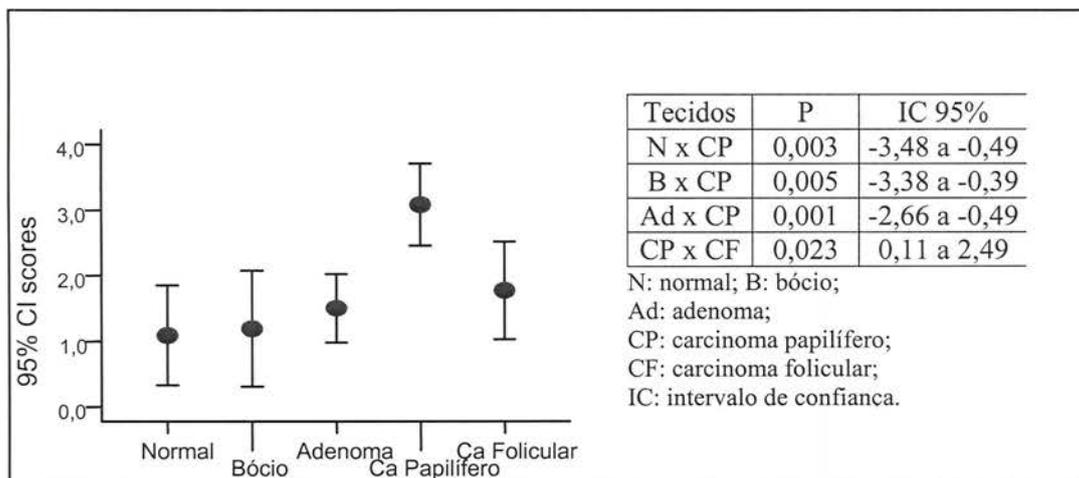


Figura 2 - Comparações entre os padrões de expressão citoplasmática de p27.

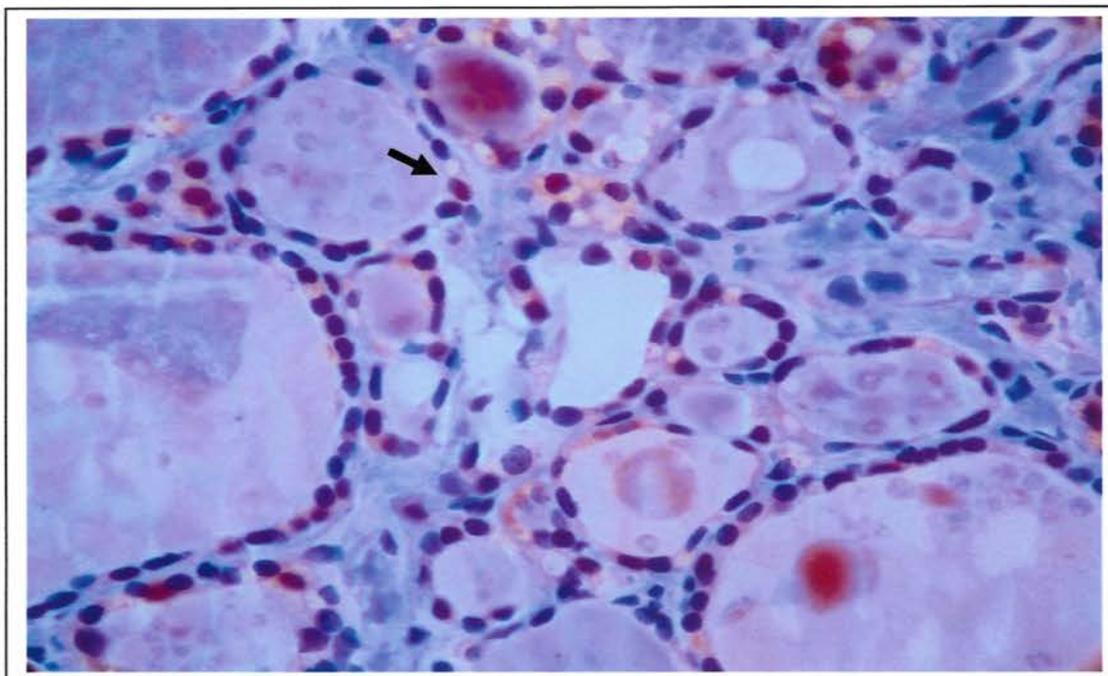


Figura 3 - Padrão de expressão imunoistoquímica de p27 em tireóide normal. As células em torno dos folículos exibem um padrão predominantemente nuclear (seta).

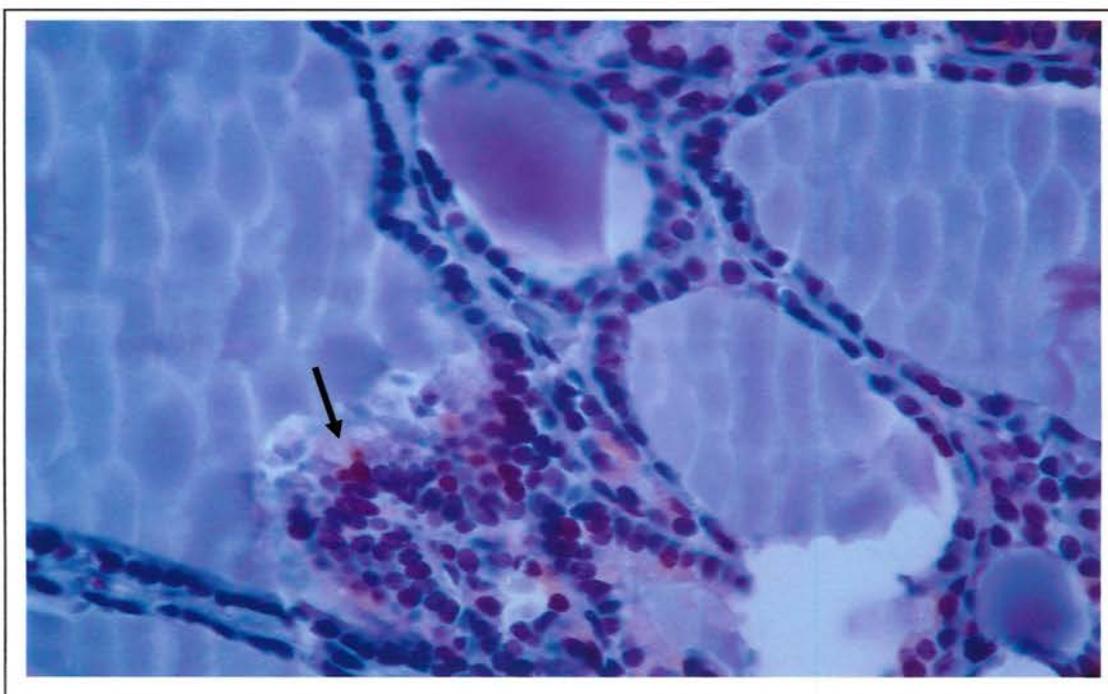


Figura 4 - Expressão imunoistoquímica de p27 em bócio, com reatividade nuclear (seta).

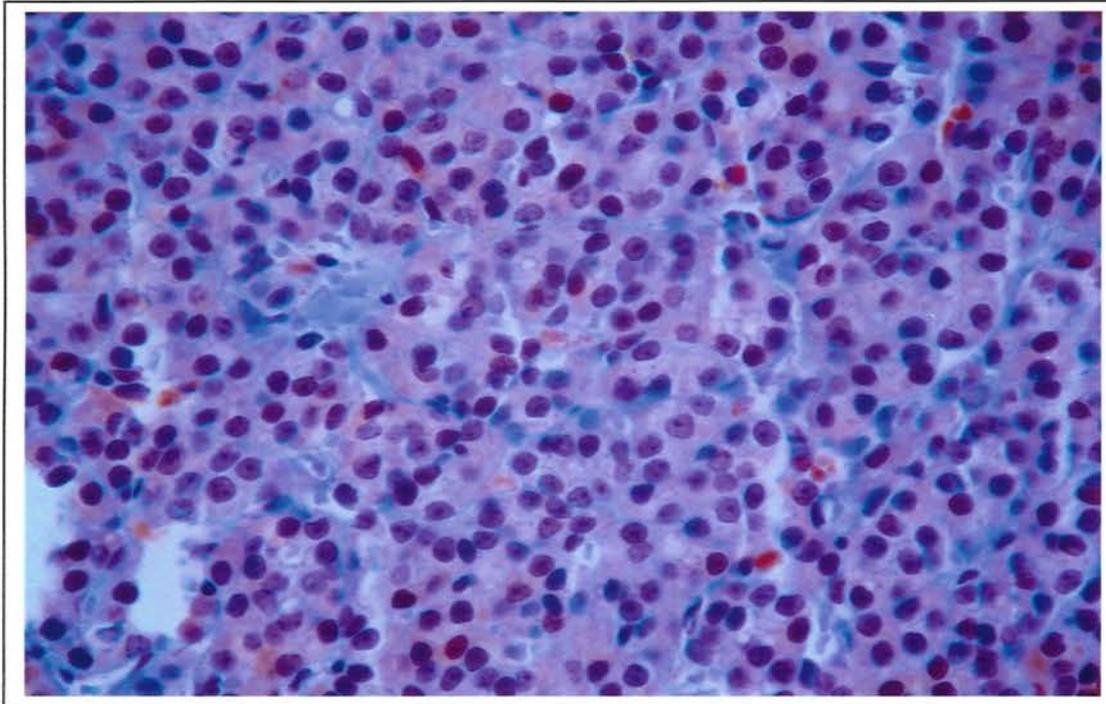


Figura 5 - Expressão de p27 em adenoma folicular. A celularidade aumentada exibe coloração nuclear mais evidente em relação à coloração citoplasmática.

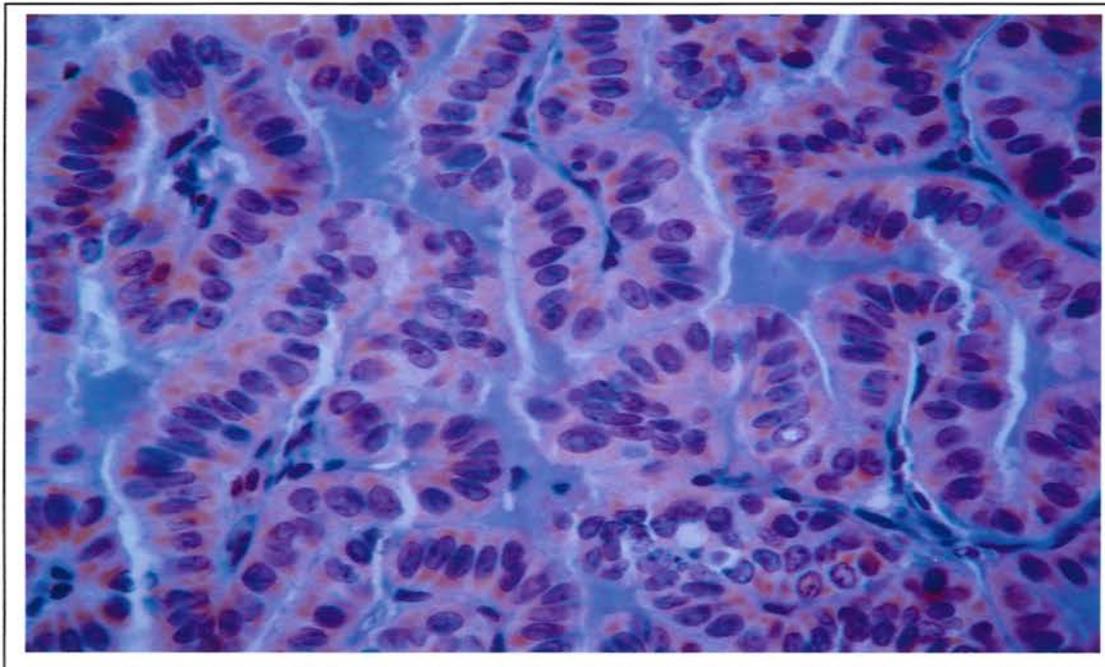


Figura 6 - A expressão de p27 em carcinoma papilífero exibe padrão predominantemente citoplasmático.

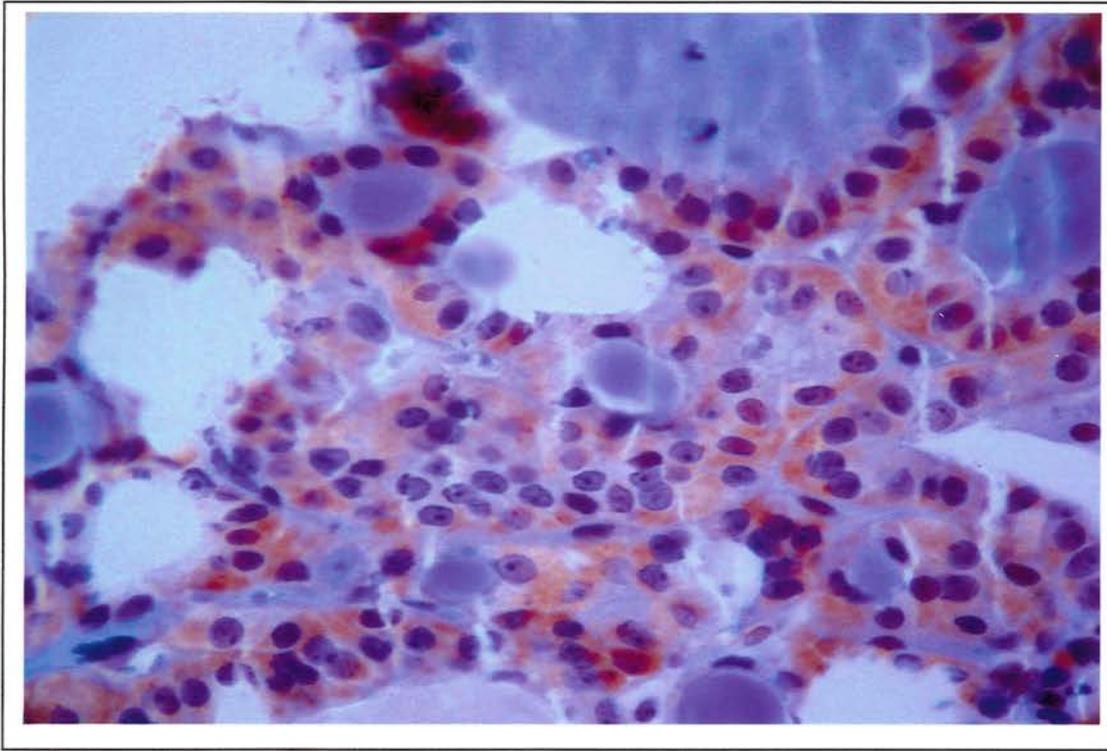


Figura 7 - As células de carcinoma folicular apresentam padrão imunoistoquímico tanto citoplasmático quanto nuclear para p27.

4.3 EXPRESSÃO DE P21

Foram observados padrões distintos em relação à p21 quando analisamos separadamente a expressão nuclear e a citoplasmática da proteína, de modo semelhante ao realizado com p27.

A expressão nuclear de p21 foi mais intensa nos adenomas e carcinomas papilíferos quando comparados aos carcinomas foliculares (Figura 8). Não foi observado diferença significativa entre tecido normal ou bócio e carcinoma folicular ($p = 0,514$ e $p = 0,737$; respectivamente).

Em relação à expressão citoplasmática, p21 exibe um padrão citoplasmático diferencial nas amostras de carcinoma papilífero ($p < 0,0001$). Carcinomas papilíferos apresentaram imunorreatividade mais intensa quando comparados aos outros tecidos analisados (Figura 9).

Adenomas e carcinomas foliculares exibem diferença significativa em relação à expressão nuclear, mas não citoplasmática, de p21 (Figuras 8 e 9). Os dois tipos de carcinoma também exibem imunorreatividade diferenciada entre si (Figuras 8 e 9). Tireóide normal e bócio apresentam baixa expressão de p21 (Figuras 10 e 11).

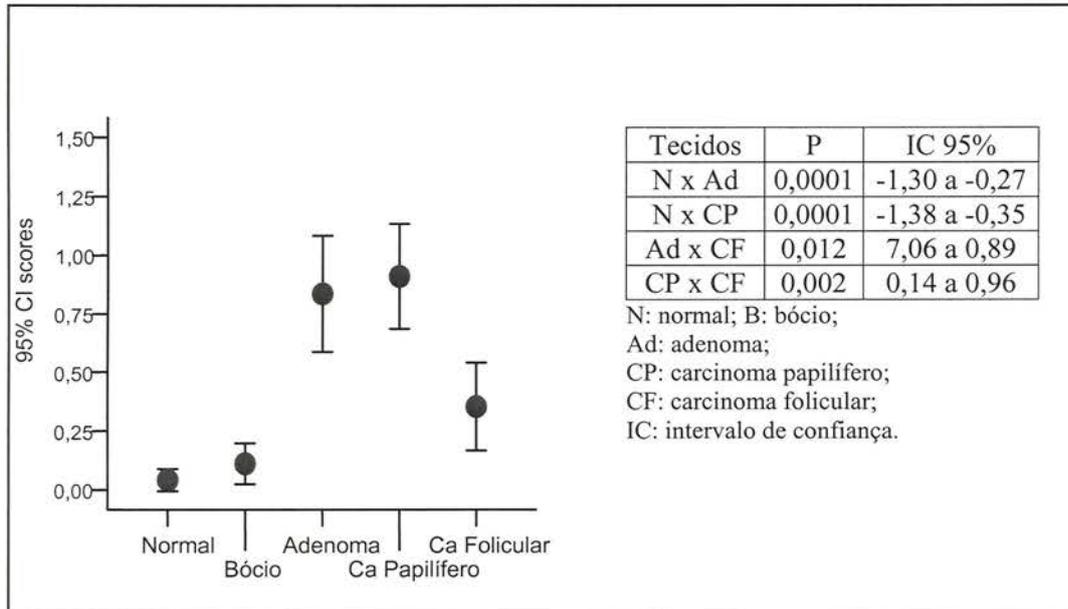


Figura 8 - A comparação entre os cinco tecidos mostra expressão nuclear diferencial para a proteína p21 ($p < 0,0001$).

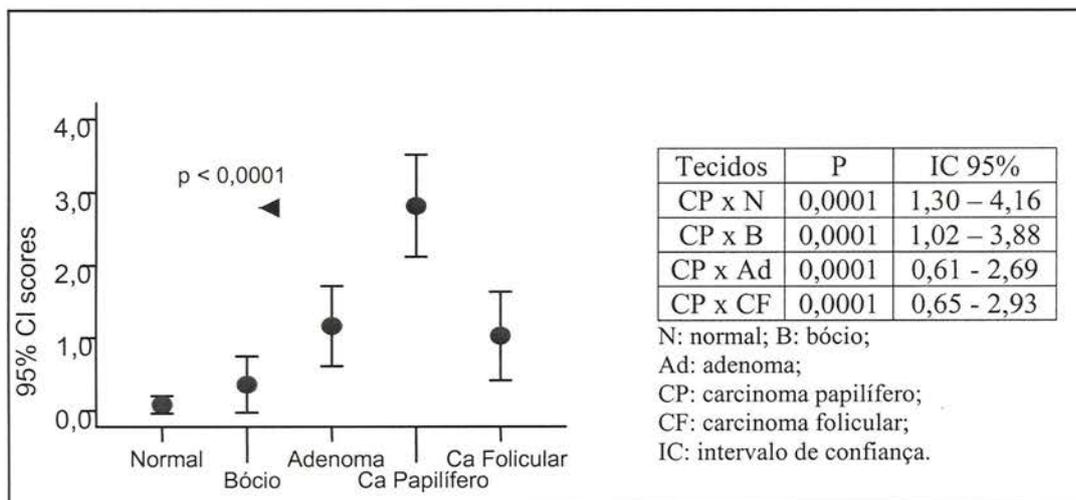


Figura 9 - A expressão citoplasmática de p21 nos carcinomas papilíferos foi mais intensa em comparação a todos os outros tecidos.

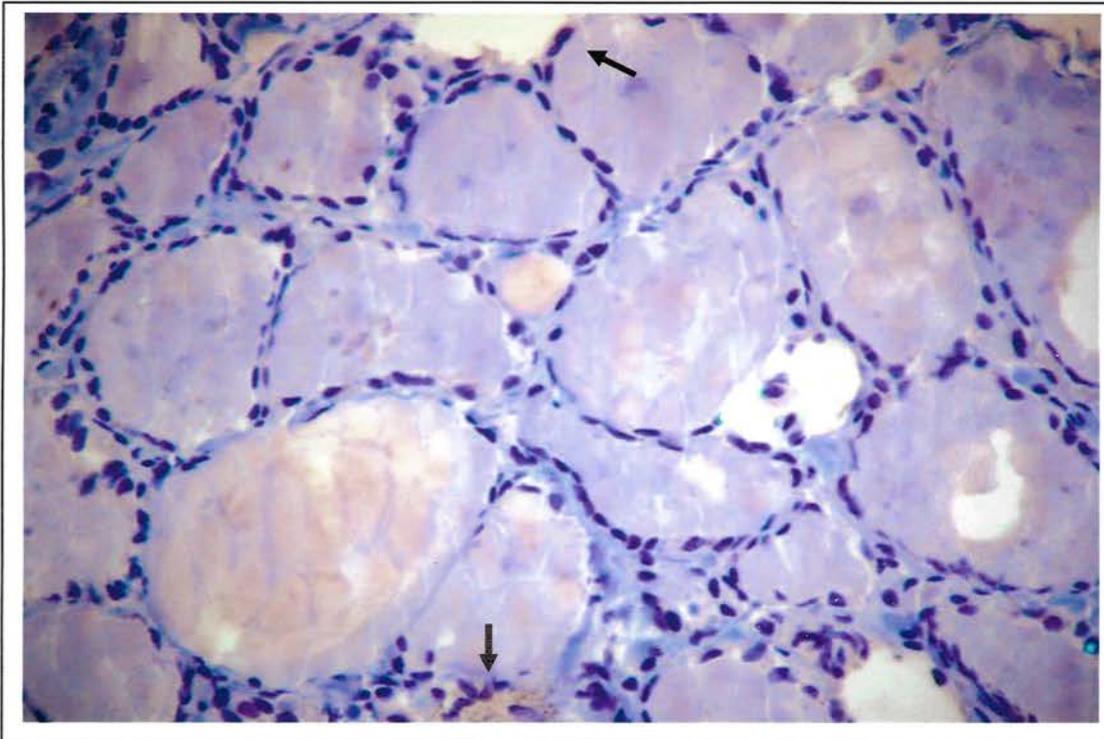


Figura 10 - Baixa expressão nuclear de p21 em tireócitos normais. Raros tireócitos exibem imunorreatividade fraca (setas)

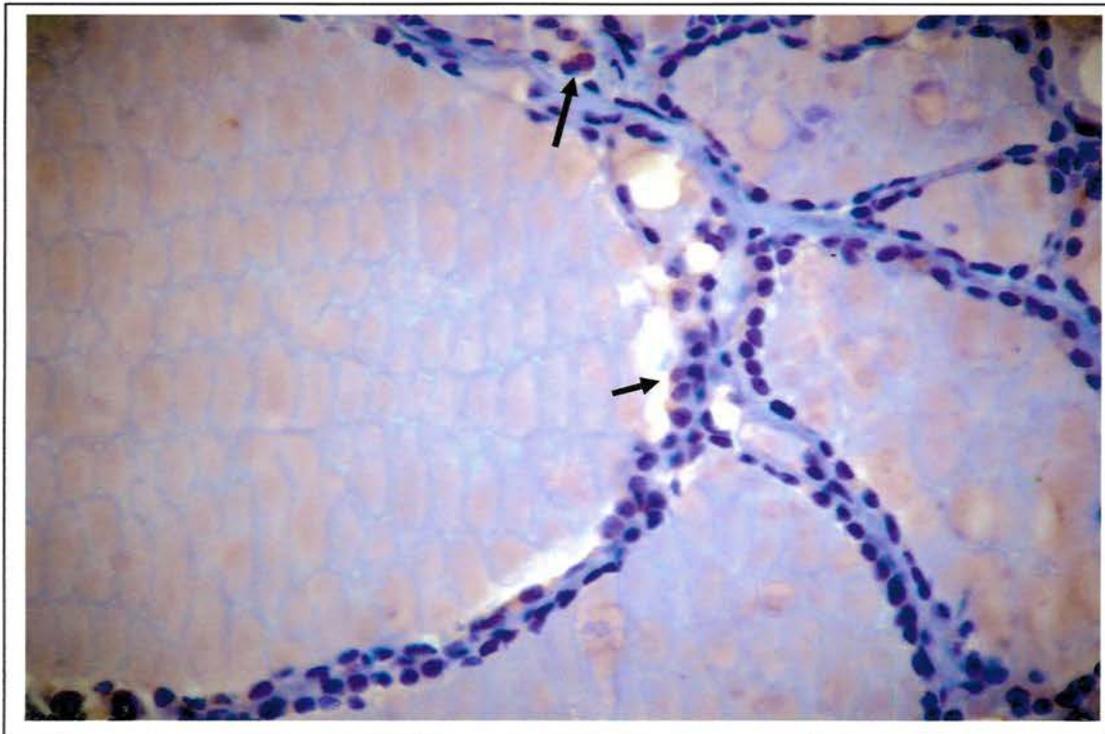


Figura 11 - Bócio. Raras células exibem fraca reatividade para p21 (setas).

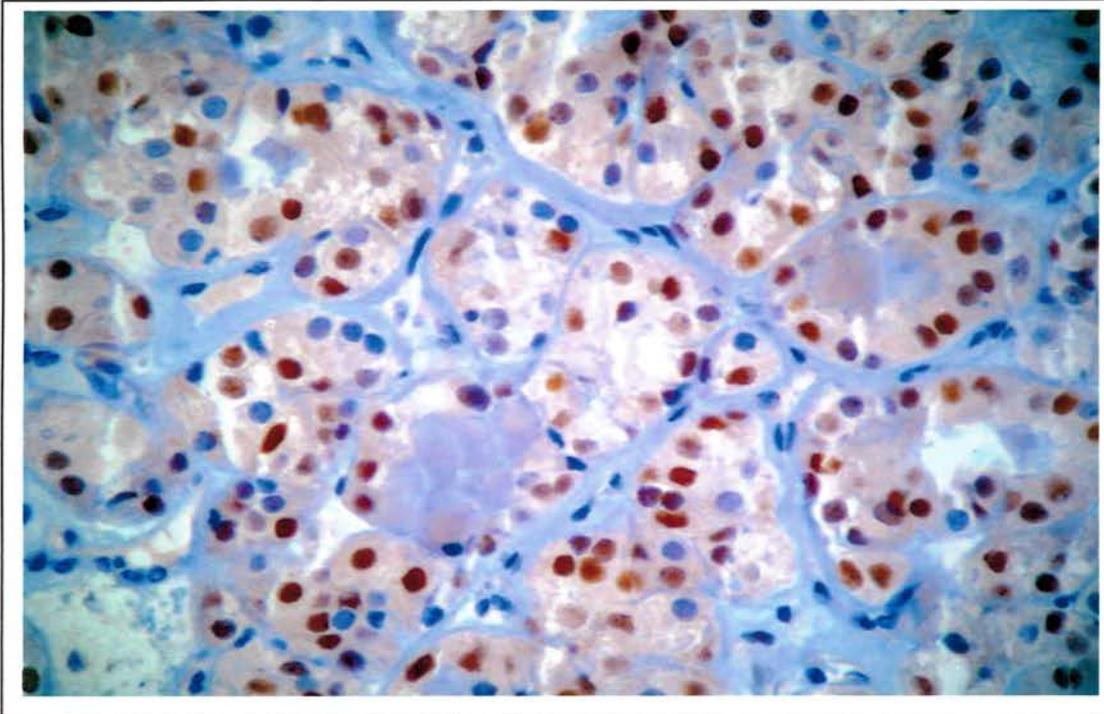


Figura 12 - Imunorreatividade predominantemente nuclear de p21 em adenoma folicular.

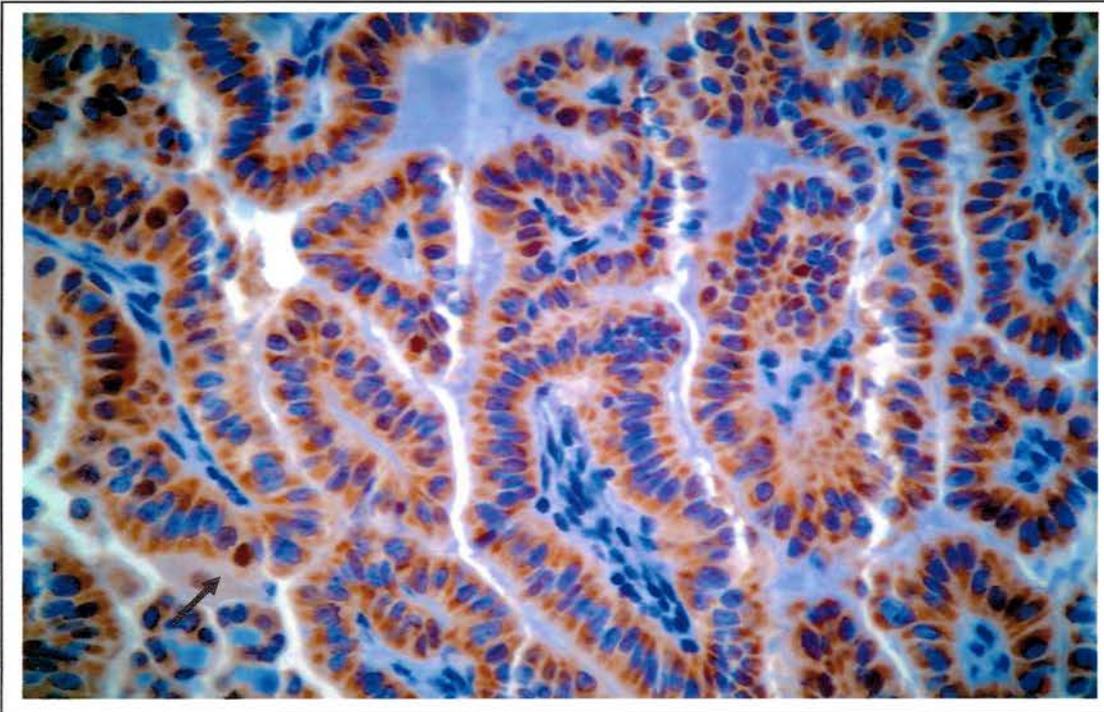


Figura 13 - Intensa imunorreatividade citoplasmática de p21 nas células de carcinoma papilífero. Positividade nuclear também é observada (seta).

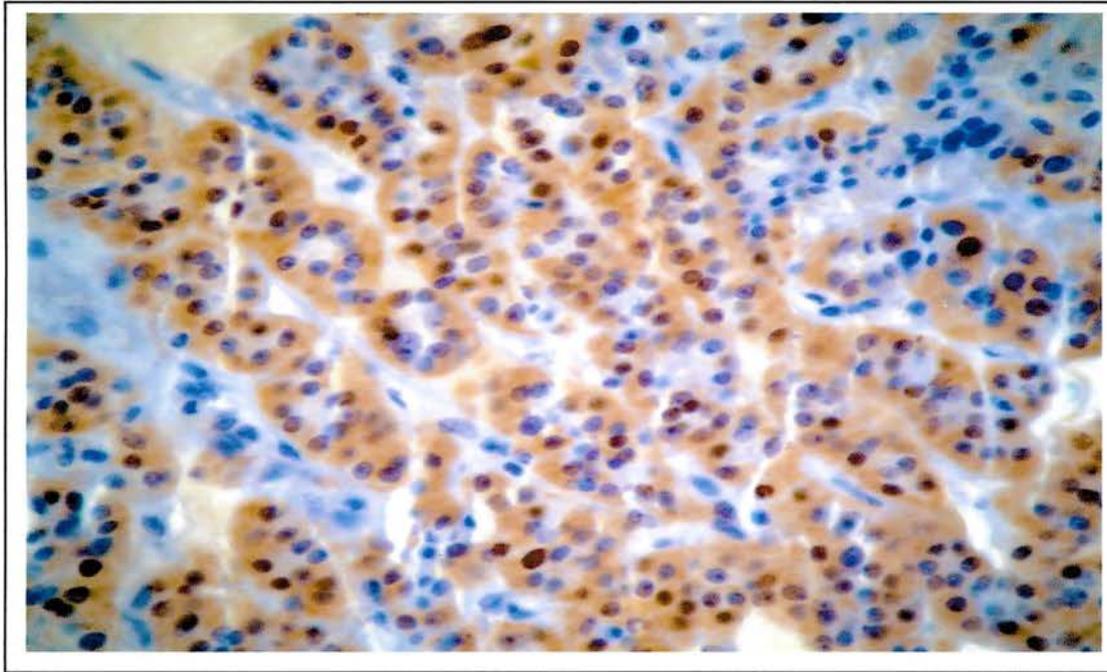


Figura 14 - Amostra de carcinoma folicular exibindo imunorreatividade nuclear e citoplasmática semelhantes para p21.

4.4 EXPRESSÃO DE ALFA1 ANTITRIPSINA

A análise imunoistoquímica mostrou reatividade mais intensa para alfa 1 antitripsina nas células malignas, principalmente em relação ao tecido normal (Figura 15). Em todos os tecidos, a imunorreatividade ficou restrita ao citoplasma (Figuras 16 - 20).

Observou-se uma tendência para a maior expressão de alfa1 antitripsina nos adenomas em relação à tireóide normal ($p < 0,08$). Não houve diferença entre os carcinomas papilífero e folicular ($p = 0,994$).

Carcinomas foliculares exibem expressão imunoistoquímica diferencial quando comparados aos adenomas foliculares (Figura 15), mais intensa nas células malignas (Figuras 20 e 18, respectivamente).

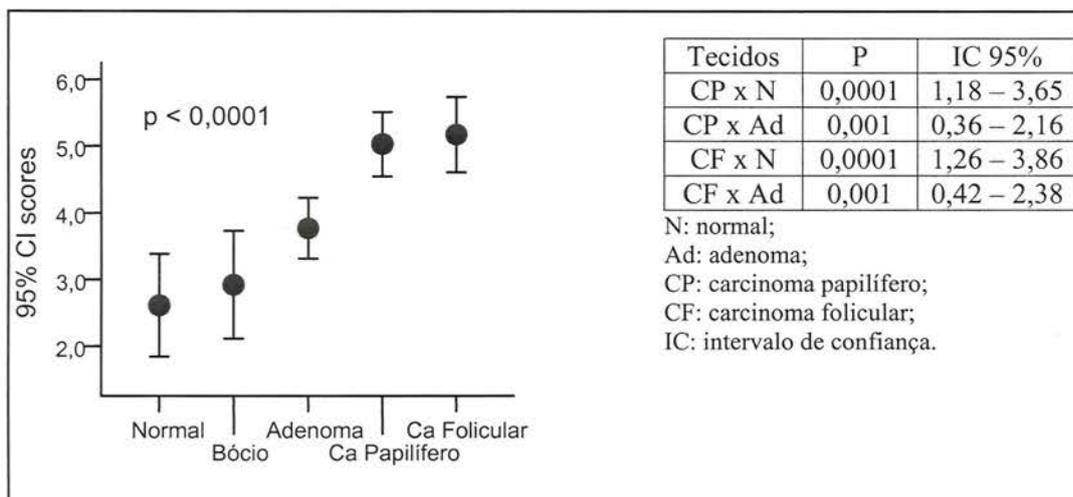


Figura 15 - Comparação entre os padrões de expressão de alfa 1 antitripsina.

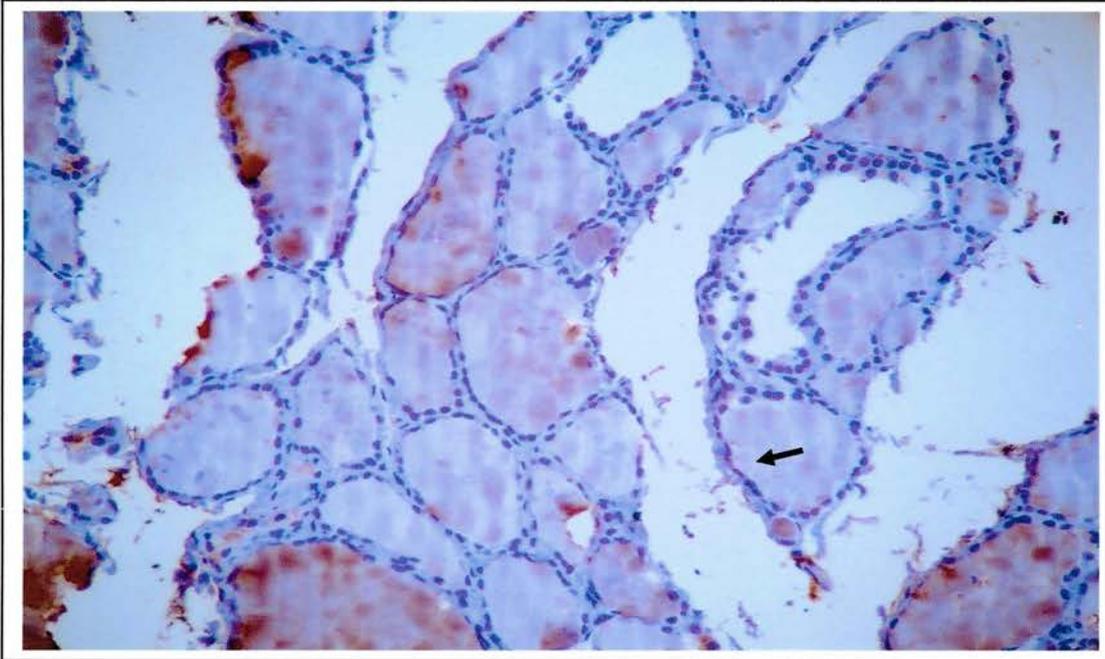


Figura 16 - Baixa imunorreatividade citoplasmática para alfa 1 antitripsina em tireóide normal (seta).

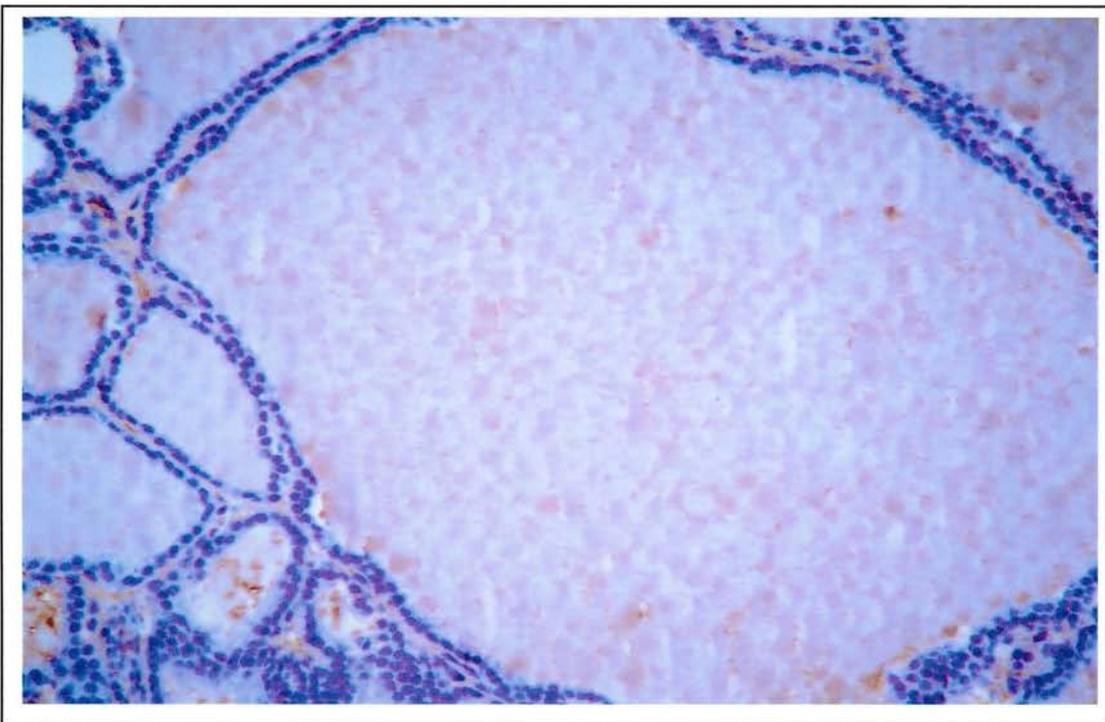


Figura 17 - Expressão de alfa 1 antitripsina em bócio mostrando padrão semelhante ao tecido normal.

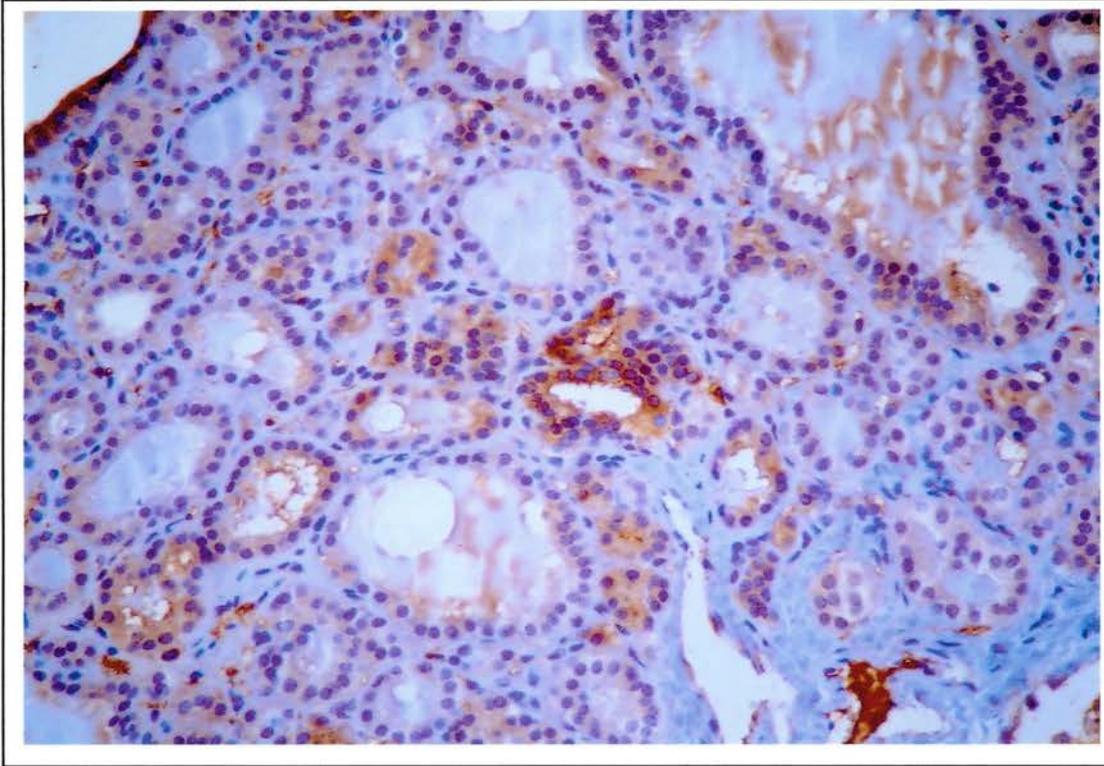


Figura 18 - Expressão citoplasmática de alfa 1 antitripsina em adenoma folicular.

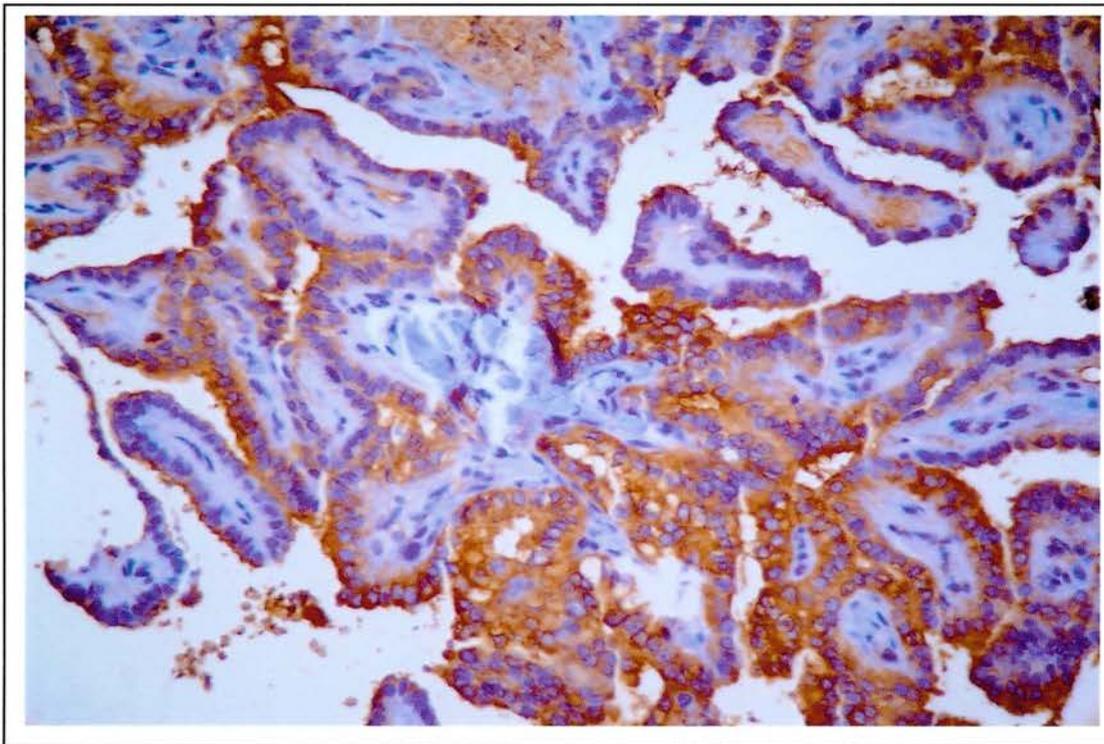


Figura 19 - Intensa imunorreatividade citoplasmática para alfa 1 antitripsina em carcinoma papilífero.

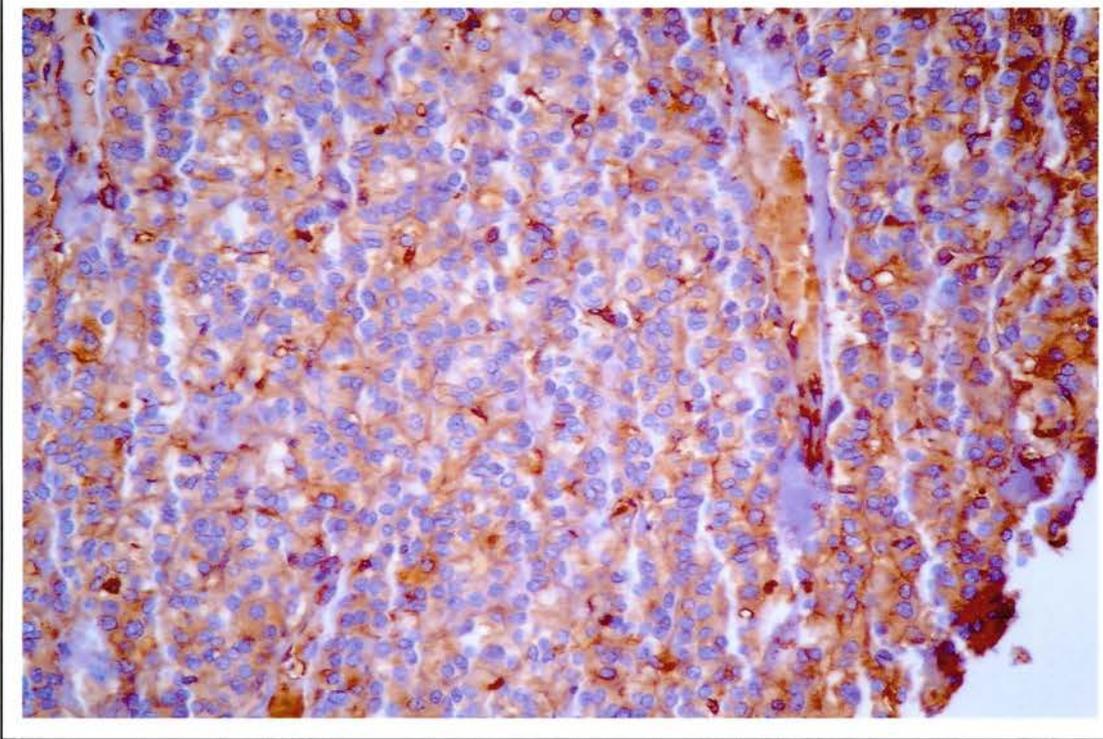


Figura 20 - No carcinoma folicular, a expressão imunoistoquímica para $\alpha 1$ antitripsina é semelhante à observada no carcinoma papilífero.

4.5 EXPRESSÃO DE IGFBP5

A diferença observada no padrão de expressão de IGFBP5 foi significativa entre os tecidos não neoplásicos (normal e bócio) e as neoplasias (adenomas e carcinomas).

Nas comparações entre os pares de tecido, a expressão de IGFBP5 em adenomas foliculares é significativamente diferente de todos os outros tecidos (Figura 21).

Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os tipos de carcinoma e, entre tireóide normal e bócio ($p = 0,998$ e $p = 0,887$, respectivamente).

As Figuras mostram que a localização citoplasmática da proteína IGFBP5 (Figuras 22-26).

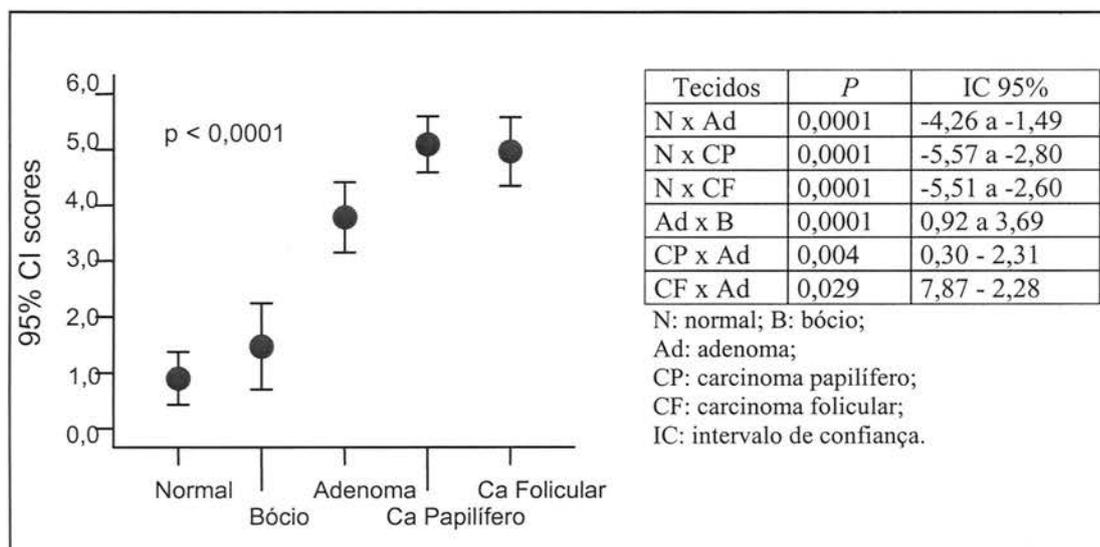


Figura 21 - Expressão de IGFBP5 e comparações entre os pares de tecidos.

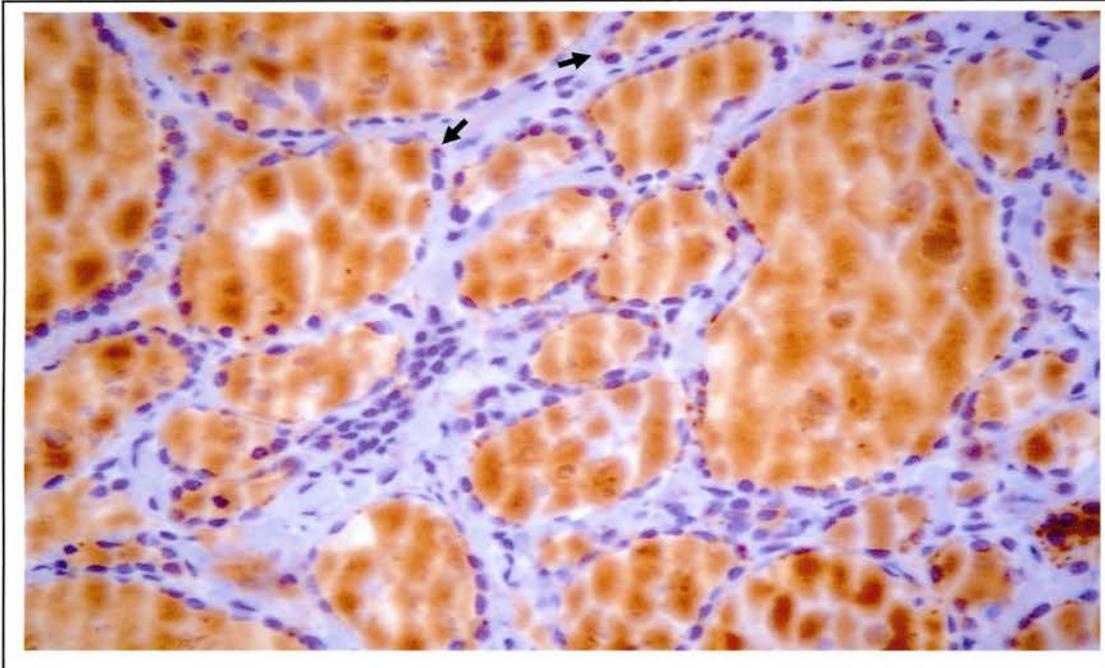


Figura 22 - Expressão imunoistoquímica de IGFBP5 em tireóide normal. Houve intensa concentração do reagente no material colóide. Os tireócitos exibem pouca reatividade citoplasmática (setas).

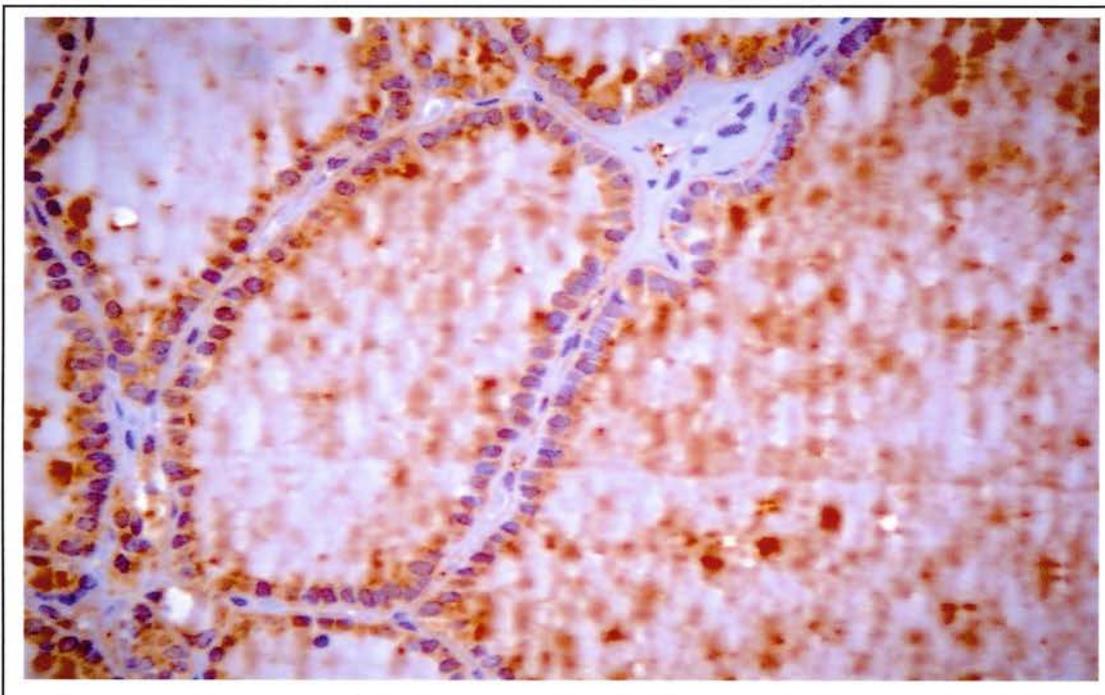


Figura 23 - Expressão imunoistoquímica de IGFBP5 em bócio, mostrando coloração citoplasmática mais evidente em relação à tireóide normal.

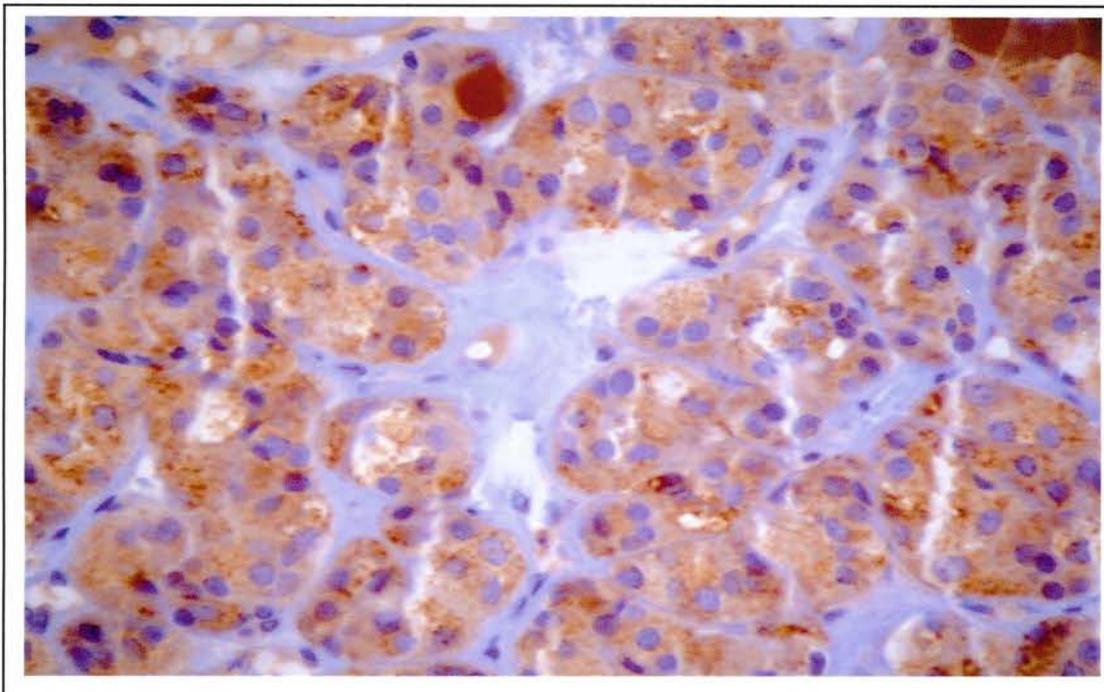


Figura 24 - Expressão imunoistoquímica citoplasmática de IGFBP5 em adenoma folicular.

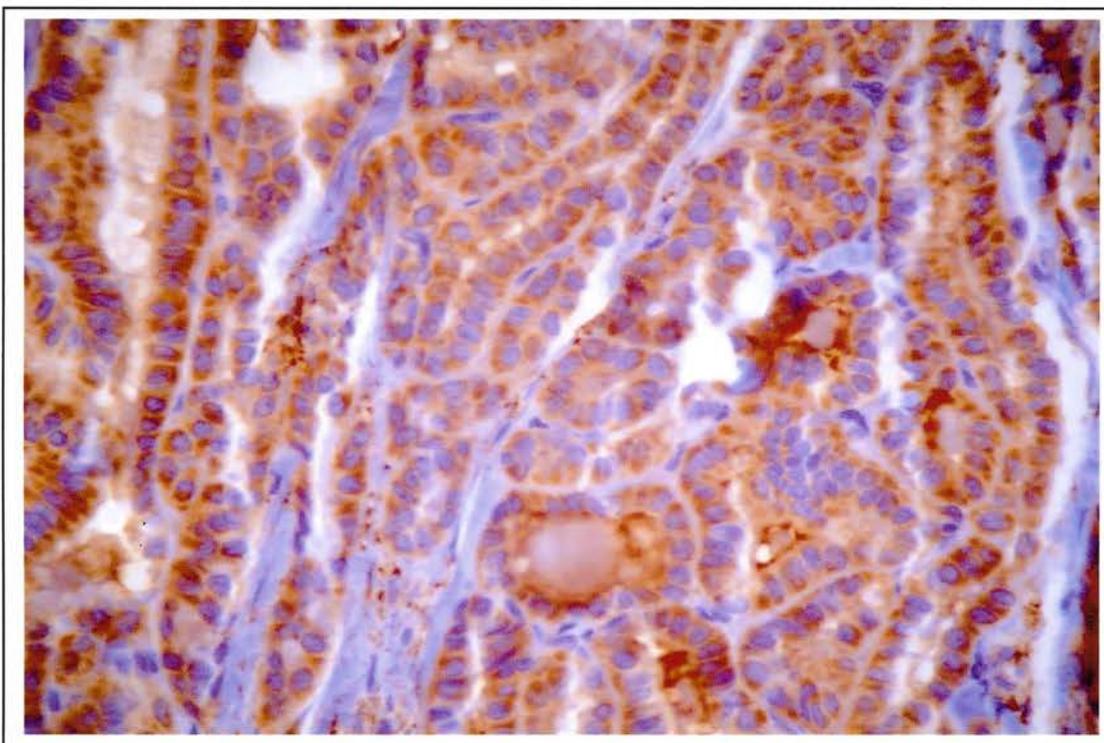


Figura 25 - Intensa imunorreatividade citoplasmática para IGFBP5 em carcinoma papilífero.

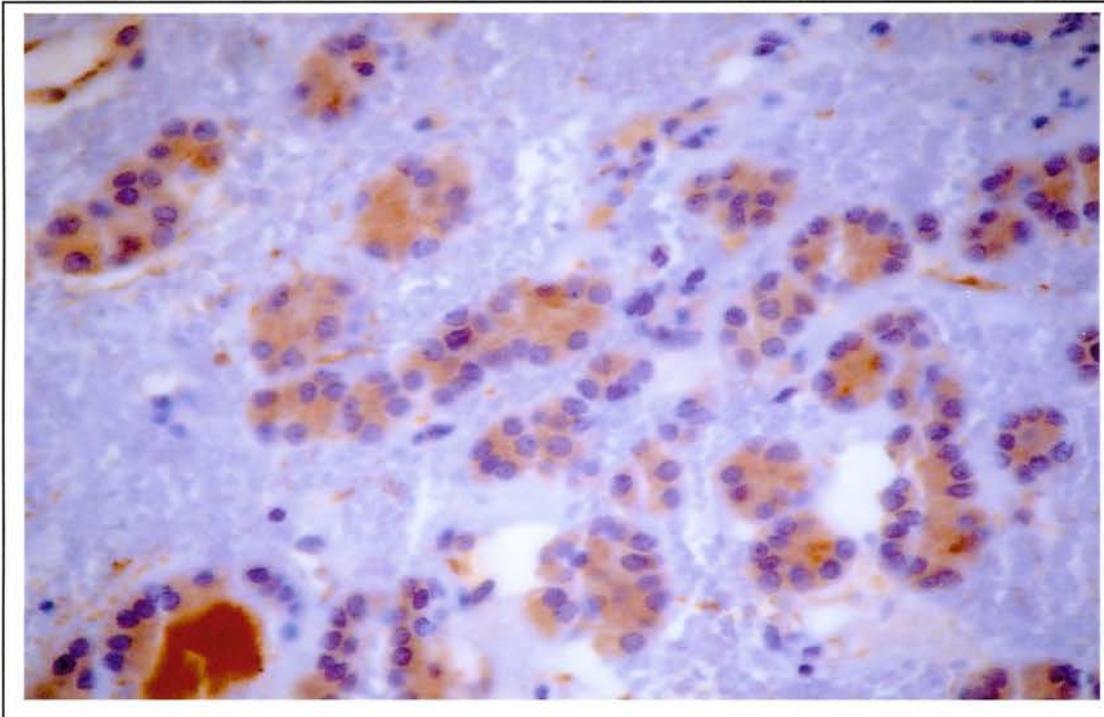


Figura 26 - Expressão imunoistoquímica de IGFBP5 em carcinoma folicular com padrão citoplasmático.

4.6 EXPRESSÃO DE CLATRINA

A análise da expressão de clatrina mostra um padrão distinto entre tecidos não neoplásicos e os neoplásicos (Figura 27). A diferença foi estatisticamente significativa em todas as comparações: normal *x* adenoma, normal *x* carcinoma papilífero, normal *x* carcinoma folicular, bócio *x* adenoma, bócio *x* carcinoma papilífero e bócio *x* carcinoma folicular ($p < 0,0001$ em todas as comparações). Não houve diferença entre adenoma folicular e carcinoma folicular ($p = 0,988$).

O padrão de imunorreatividade foi exclusivamente citoplasmático (Figuras 28 - 32), sendo mais intenso nos tecidos neoplásicos.

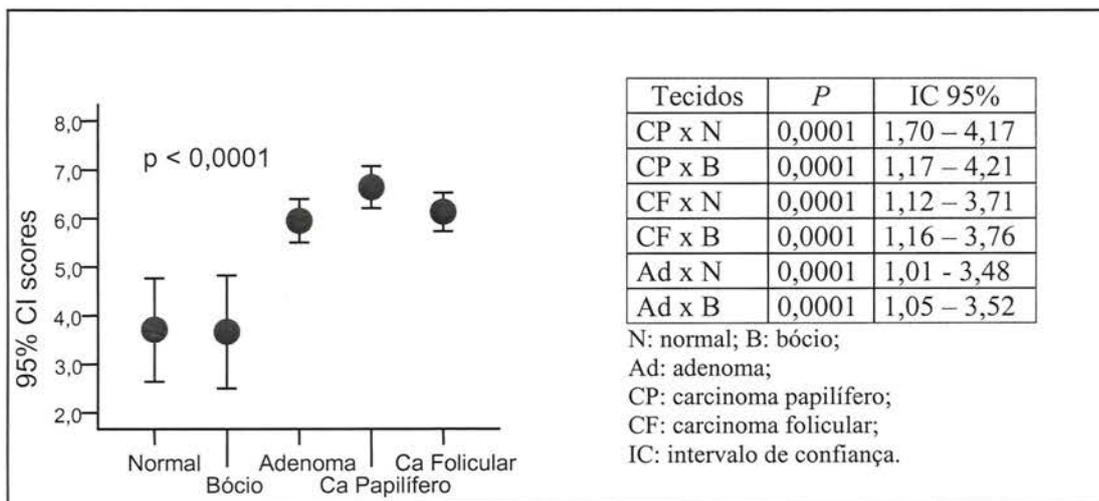


Figura 27 - Comparação entre os padrões de expressão de clatrina.

Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora de Pós-Graduação

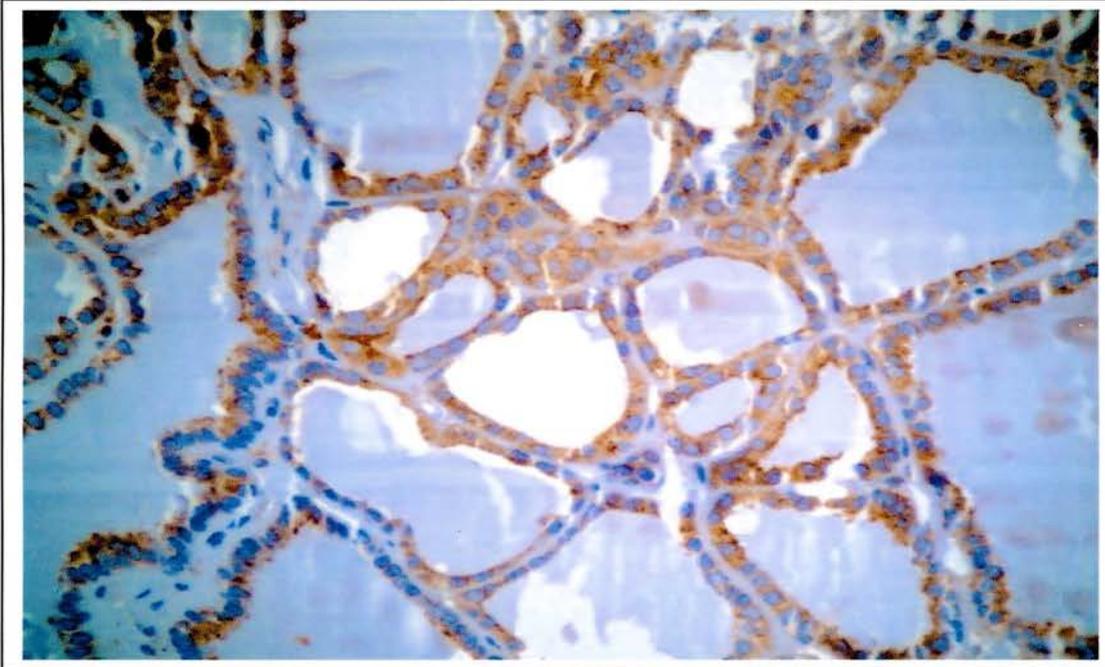


Figura 28 - A expressão imunoistoquímica de clatrina em tireóide normal exibe padrão citoplasmático.

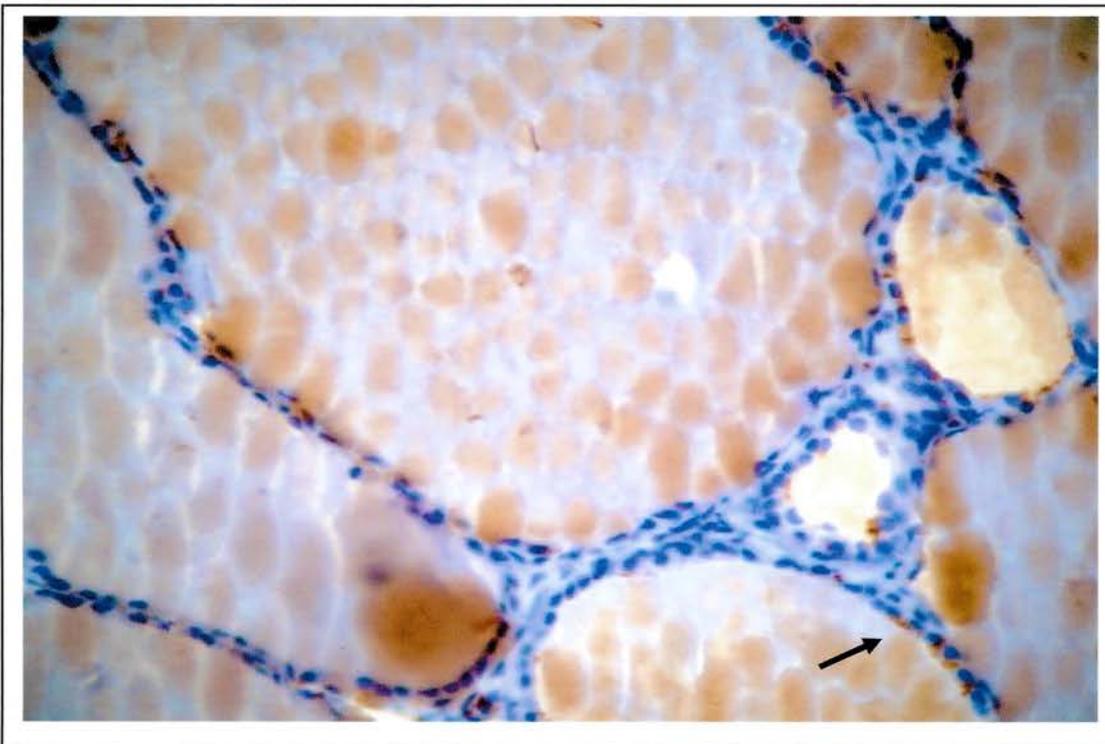


Figura 29 - Baixa expressão citoplasmática de clatrina em bócio (seta).

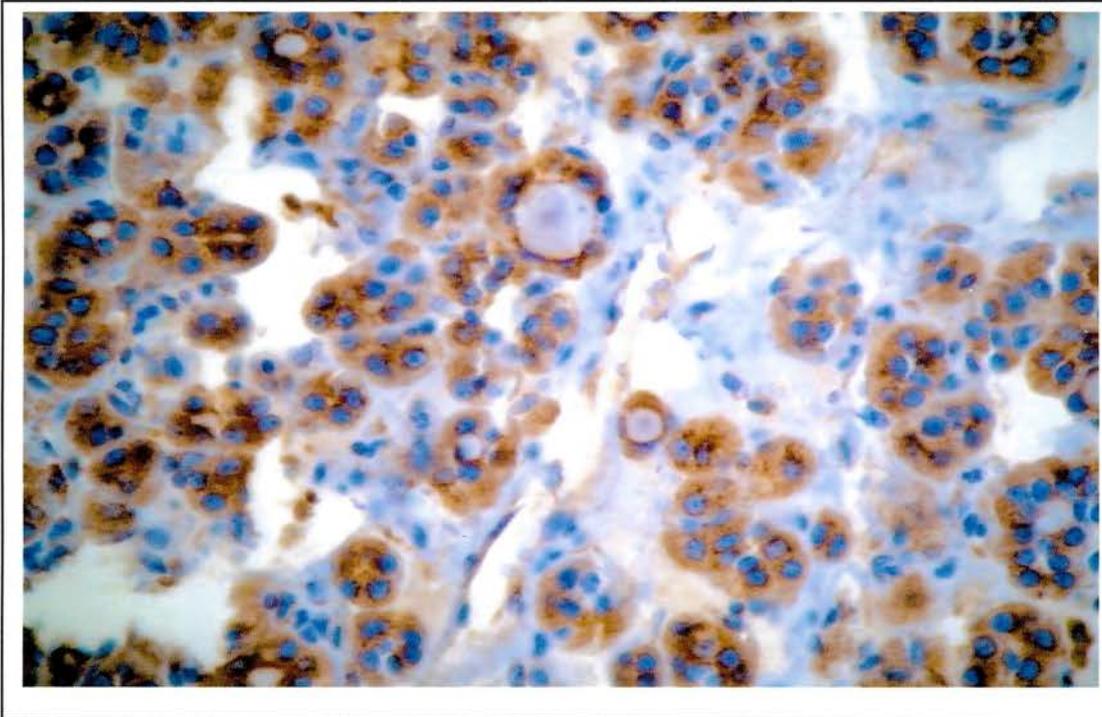


Figura 30 - Forte expressão citoplasmática de clatrina em adenoma folicular.

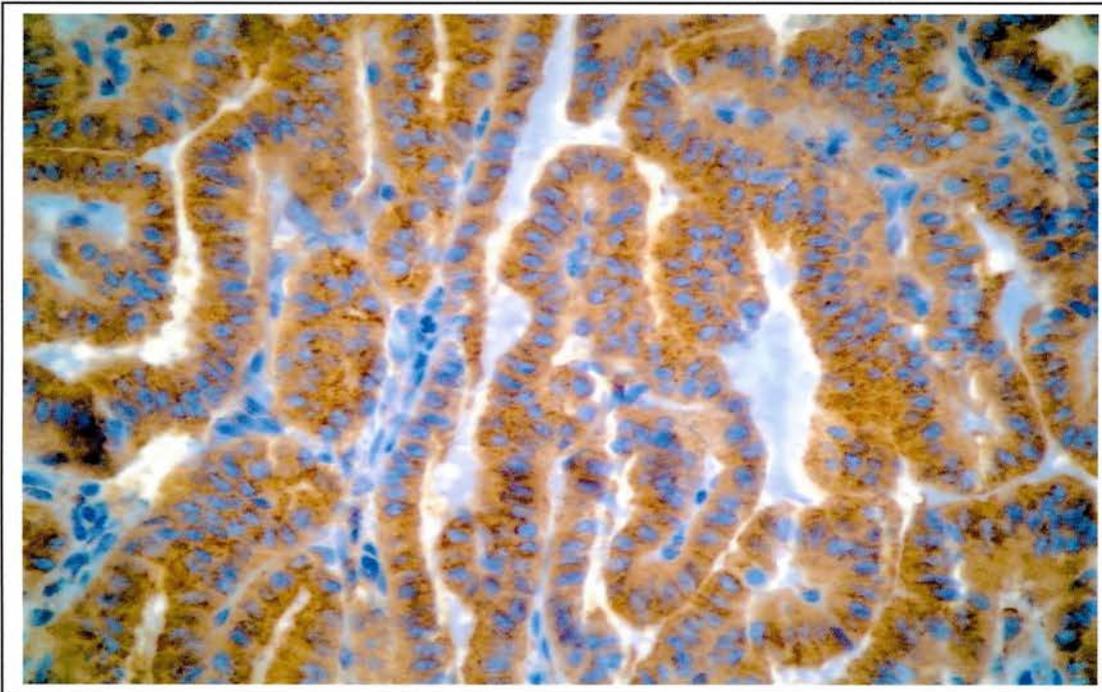


Figura 31 - Expressão imunoistoquímica de clatrina em carcinoma papilífero com padrão citoplasmático intenso.

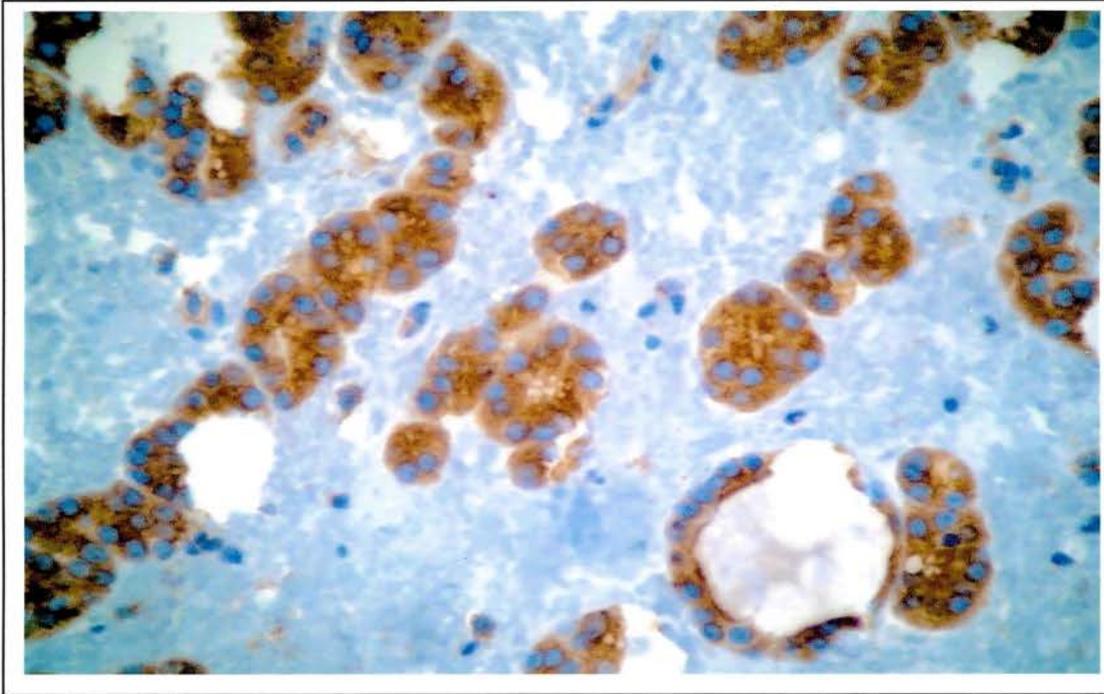


Figura 32 - Expressão imunoistoquímica de clatrina em carcinoma folicular, com padrão semelhante ao observado em carcinoma papilífero.

4.7 EXPRESSÃO DE CATEPSINA B

Não foi detectada expressão diferencial de catepsina B nas amostras analisadas (Gráfico 33), ao contrário dos resultados obtidos nos estudos em cDNA *microarray* (STOLF et al. 2003). As Figuras 25-30 mostram a coloração citoplasmática para catepsina B.

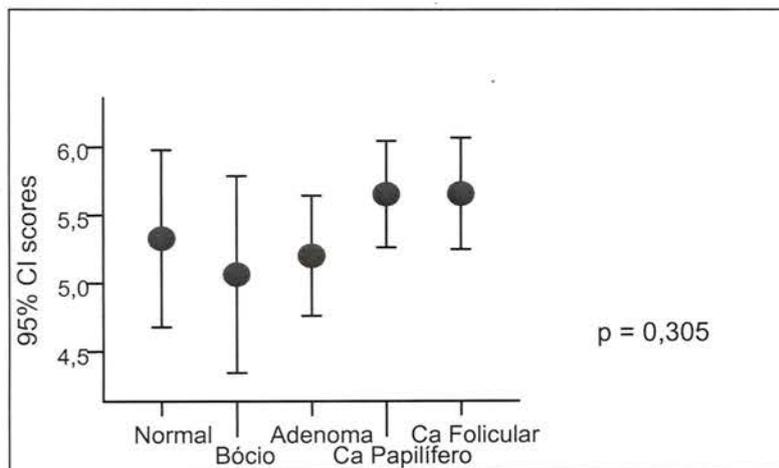


Figura 33 - Comparação dos padrões de expressão de catepsina.

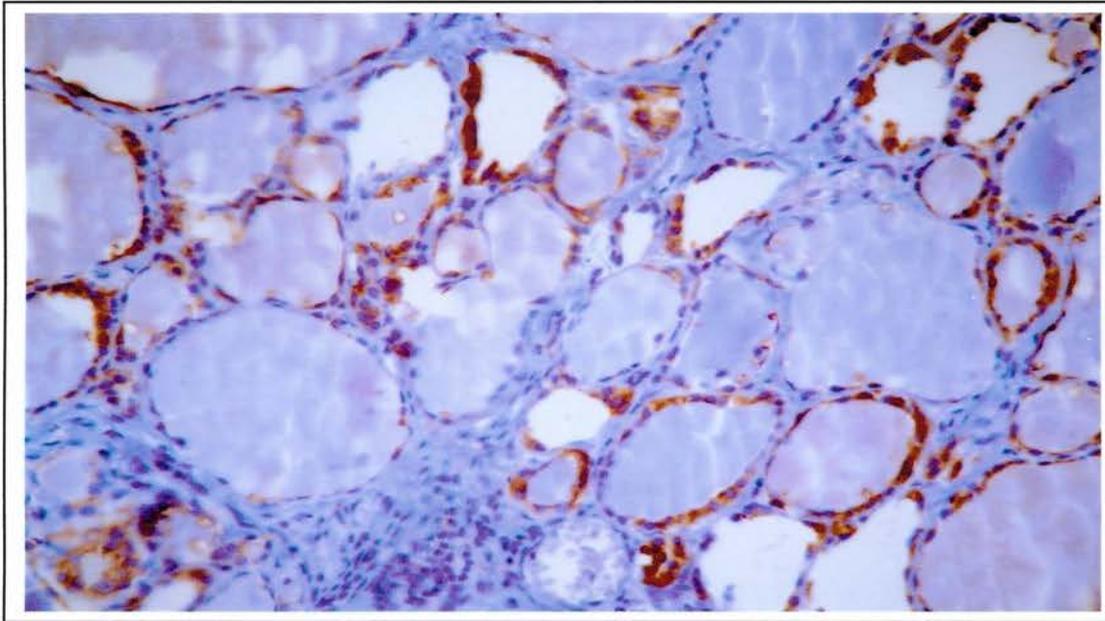


Figura 34 - Expressão imunoistoquímica de catepsina B em tireóide normal, com padrão citoplasmático.

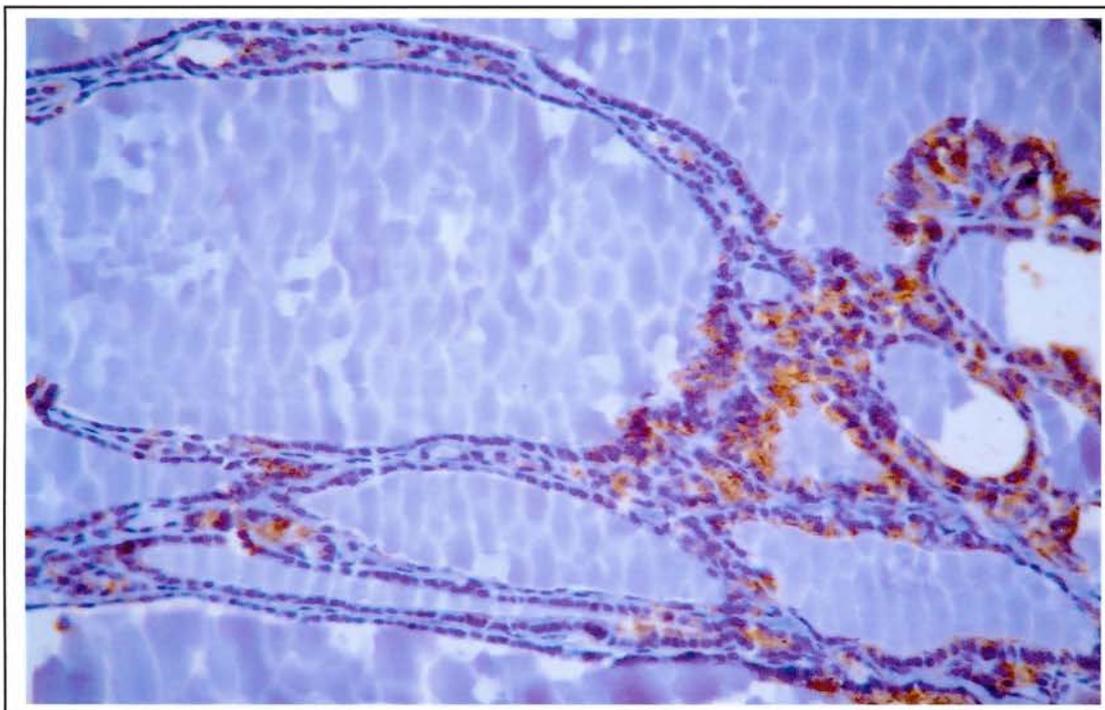


Figura 35 - Expressão imunoistoquímica de catepsina B em bócio.

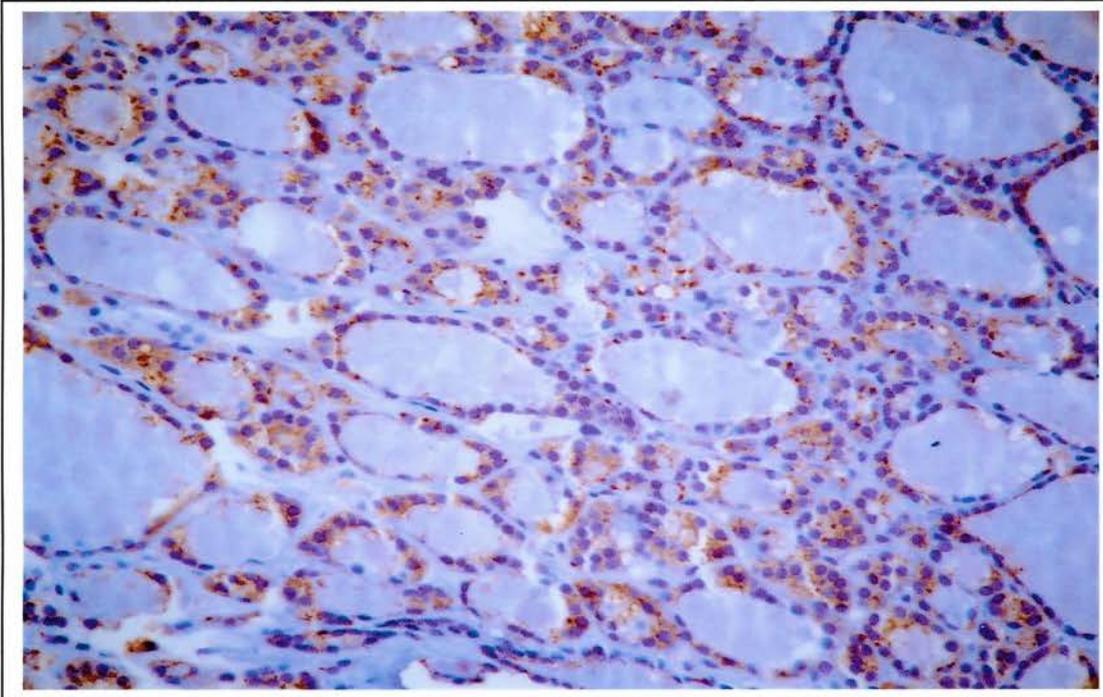


Figura 36 - Expressão citoplasmática de catepsina B em adenoma folicular.

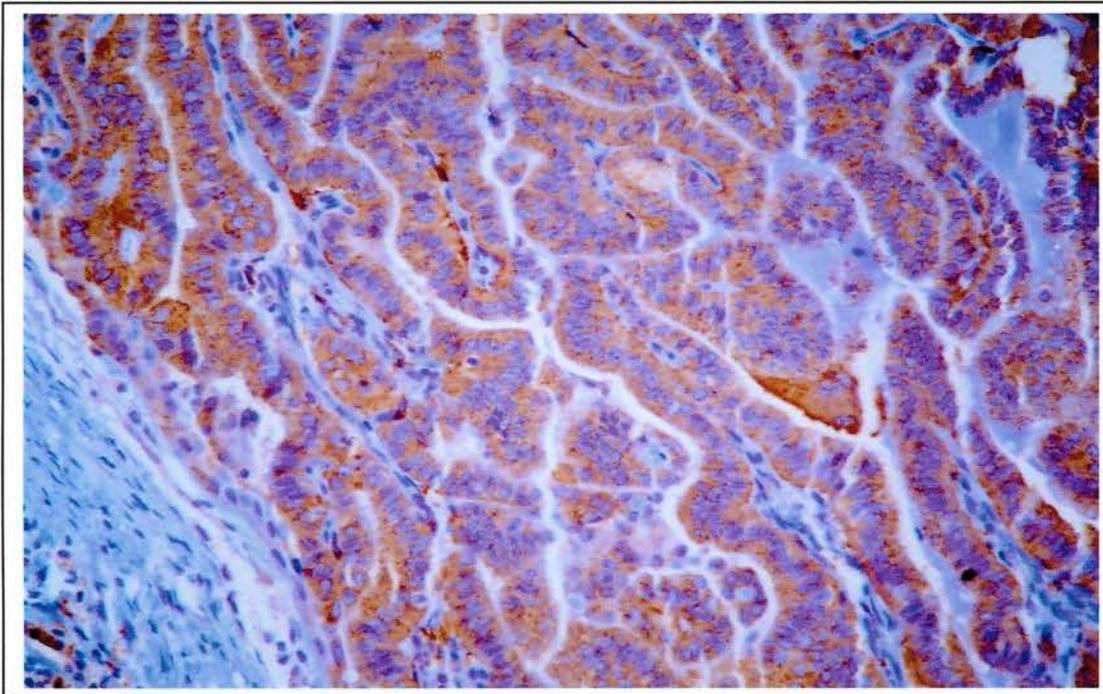


Figura 37 - Expressão imunoistoquímica de catepsina B em carcinoma papilífero.

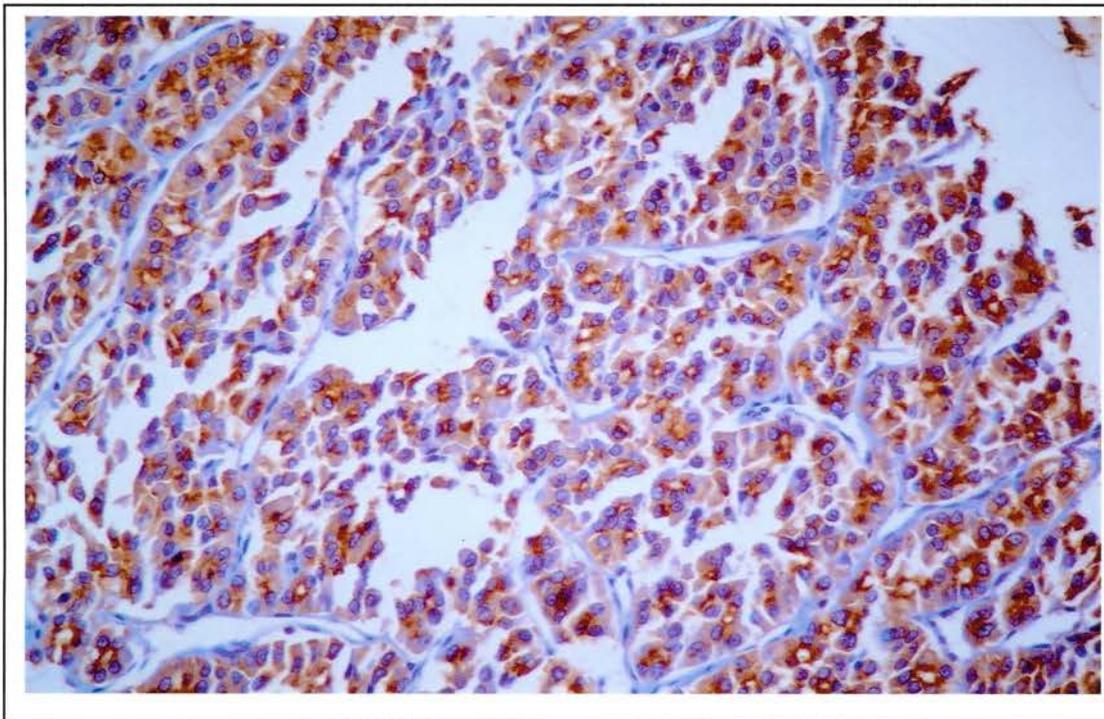


Figura 38 - Expressão imunoistoquímica de catepsina B em carcinoma folicular.

4.8 ANÁLISES DE SOBREVIDA

A sobrevida mediana foi de 158 meses (0,1 a 219,33 meses) com uma taxa de sobrevida global (SG) de 83% em 5 anos e 65% em 10 anos (Figura 39 A). Em relação ao tipo histológico do tumor, as taxas de SG para carcinoma papilífero e folicular foram 98% *versus* 61%, respectivamente (Figura 39B).

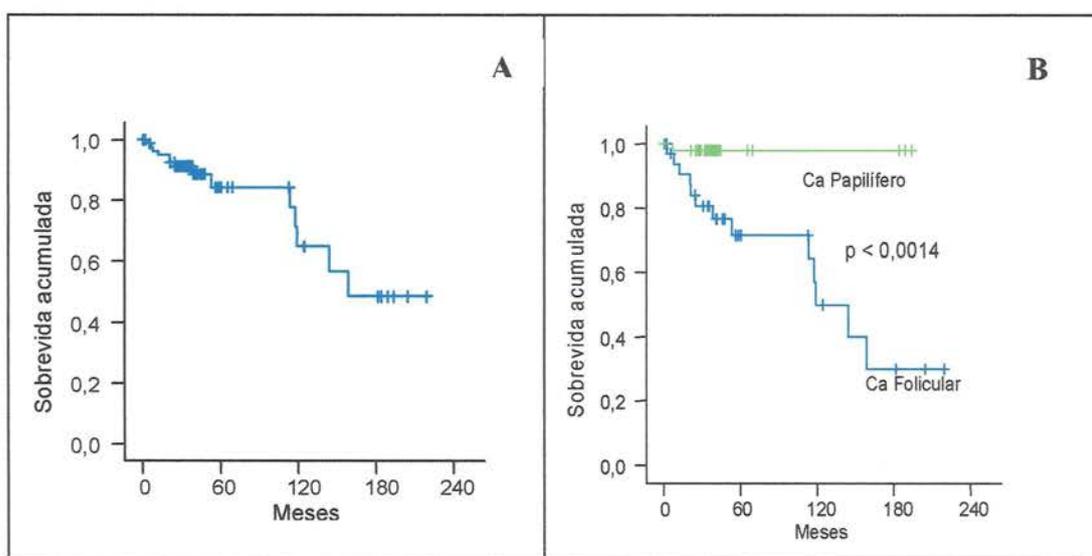


Figura 39 - A) Sobrevida global (n=84). B) Sobrevida global por diagnóstico.

Neste estudo, os fatores que influenciaram negativamente a SG da população geral foram o diagnóstico histológico de carcinoma folicular ($p < 0,0014$; *log rank*), idade ≥ 45 anos ($p < 0,0002$; *log rank*), a presença de recidiva ($p < 0,00001$; *log rank*), estágio clínico avançado ao diagnóstico ($p < 0,00001$; *log rank*) e a positividade na expressão de p21 ($p < 0,0094$; *log rank*) (Figuras 39B, 40 - 44; respectivamente). Sexo, raça, tipo de cirurgia, presença de tireoidite e/ou bócio não

influenciaram a sobrevida global na amostra analisada; assim como a expressão de p27, clatrina, IGFBP5, alfa 1 antitripsina e catepsina B (dados não exibidos).

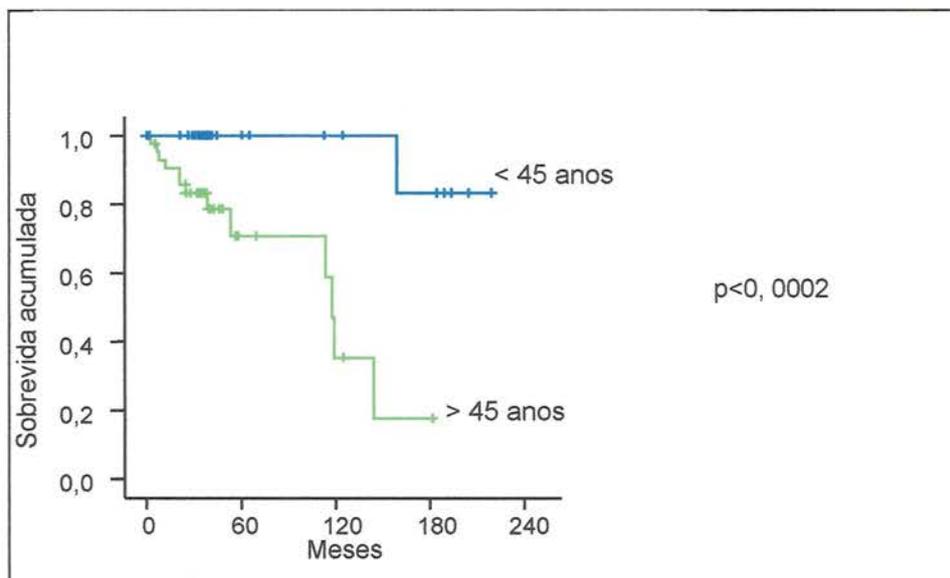


Figura 40 - Sobrevida global por idade (n=84).

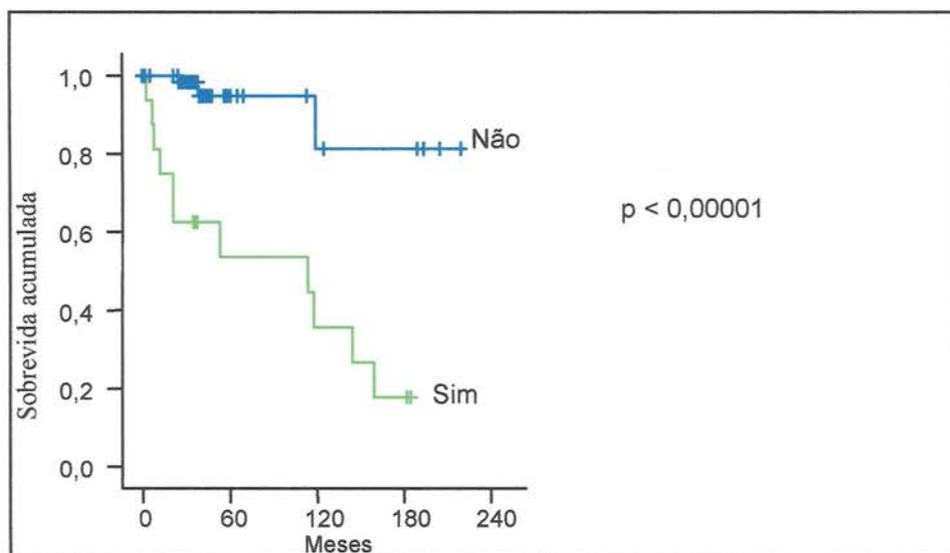


Figura 41 - Sobrevida global de acordo com a recidiva (n=84).

Entre os nove pacientes que não mantiveram o seguimento clínico adequado, quatro apresentavam doença em estágio clínico avançado (EC III/IV), e cinco em estádios iniciais, o que poderia ter influenciado as curvas de sobrevida. Isto talvez explique a melhor sobrevida dos pacientes em EC III quando comparados aos pacientes em EC II observada nesta população (Figuras 42 e 45).

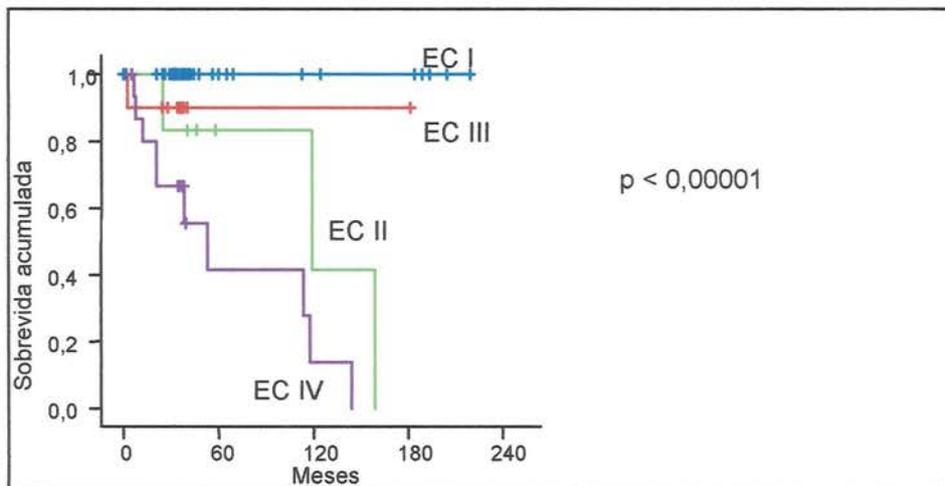


Figura 42 - Sobrevida global de acordo com o estágio clínico (n=84).

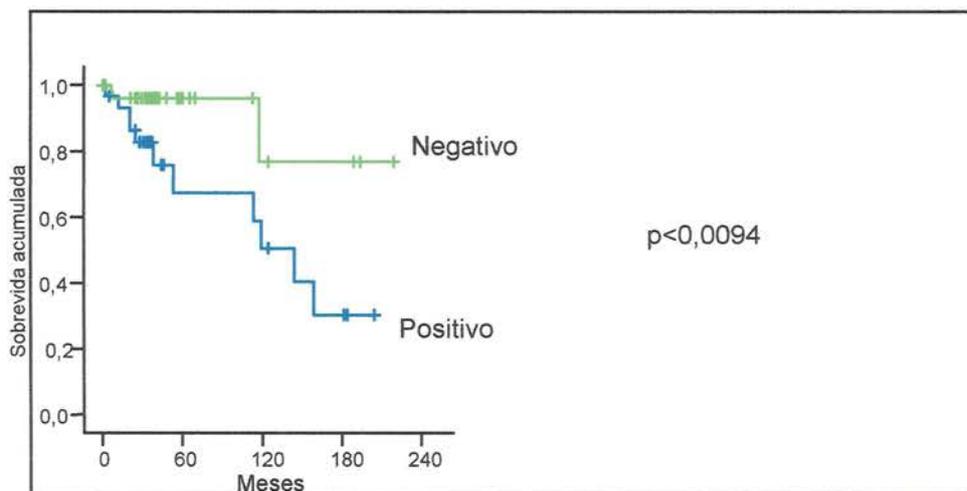


Figura 43 - Sobrevida global de acordo com a expressão de p21 (n=84).

Quando estratificados pelo diagnóstico histológico (carcinoma papilífero *versus* carcinoma folicular), idade ≥ 45 anos foi um fator prognóstico importante

apenas nos pacientes com carcinoma folicular (SG de 95% *versus* 47%, respectivamente). No grupo de pacientes com carcinoma folicular (Figura 44), a taxa de SG para o grupo com menos de 45 anos de idade (11/34 pacientes) foi superior a 90% ($p < 0,0051$; *log rank*).

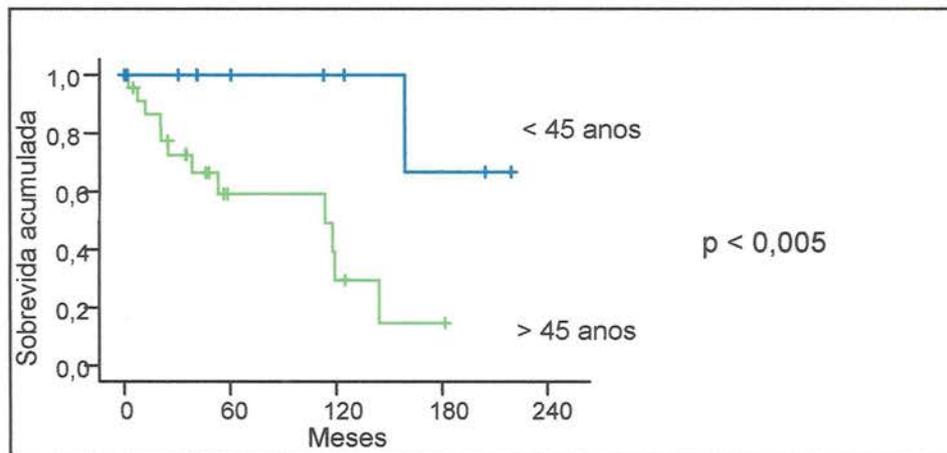


Figura 44 - Sobrevida global dos pacientes com carcinoma folicular de acordo com a idade (n=34).

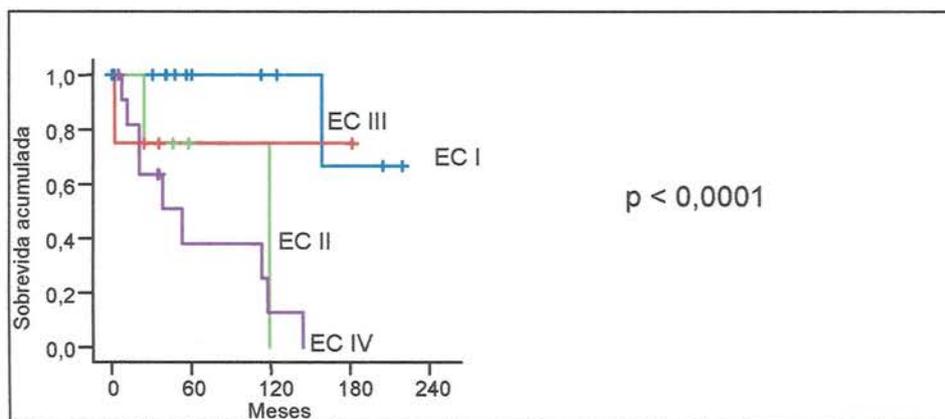


Figura 45 - SG dos pacientes com carcinoma folicular de acordo com o estadiamento (n=34).

5 DISCUSSÃO

As neoplasias tireoidianas representam um amplo espectro de tumores com comportamentos biológicos distintos. A maioria dos tumores é rapidamente diagnosticada por seus aspectos histopatológicos característicos, mas a distinção entre adenomas e carcinomas foliculares pode ser difícil. Estudos que buscam a identificação de marcadores para estas duas patologias sugerem que algumas proteínas envolvidas no controle do ciclo celular poderiam ser usadas como fatores preditivos do comportamento biológico destas neoplasias. Diferenças significativas na expressão de p27 entre adenomas e carcinomas foliculares sugerem que anticorpos contra p27 poderiam ser úteis na distinção entre neoplasias tireoidianas quando o diagnóstico não é possível pelos critérios histopatológicos habituais.

A divisão celular depende da ativação de ciclinas que se ligam as Cdks para induzir a progressão do ciclo celular em direção à fase S. A partir do pressuposto que atividade descontrolada de Cdks é uma causa freqüente de câncer, a perda do controle dos reguladores negativos do ciclo celular, p21 e p27, influenciaria o processo de oncogênese.

Nos tireócitos normais, p27 localizou-se quase exclusivamente no núcleo, enquanto que as células tumorais mostraram expressão predominantemente citoplasmática para p27, em concordância com os dados de literatura (WANG et al. 1998; ERICKSON et al. 1998). A localização nuclear de p27 é necessária para sua plena atividade inibitória, onde se liga a Cdk2, inibindo o complexo ciclina-Cdk. A localização citoplasmática de p27 está associada à elevada atividade de Cdk2,

superexpressão de ciclina D3 e fosforilação por Akt em carcinomas de tireóide e mama (BALDASSARE et al. 1999; VIGLIETTO et al. 2002; VASKO et al. 2004). Localização citoplasmática de p27 ocorre em cerca de 35% e 40% das células tumorais em câncer de cólon e mama, respectivamente, e; está relacionada com pior sobrevida em adenocarcinomas associados a Barret (SLINGERLAND e PAGANO 2000).

A diminuição da expressão de p27 está associada, além do seqüestro citoplasmático, à sua degradação, presença de mutações gênicas e metilação gênica (QIAN et al. 1998; LLOYD 1999). O principal mecanismo de degradação de p27 é a ubiquitinação (PAGANO et al. 1995). O complexo ubiquitina-p27 é reconhecido pelo proteassoma, que promove a degradação da proteína-alvo e reciclagem da ubiquitina. Entre os pré-requisitos para a ubiquitinação de p27 estão a formação de complexos p27-ciclina E/Cdk2 e; a fosforilação em Thr-187, um sítio de consenso de Cdk, por complexos ciclina E/Cdk2 (ALESSANDRINI et al. 1997).

Níveis elevados de Skp2, uma das proteínas do complexo ubiquitina ligase, e baixos níveis de p27 foram observados em neoplasias humanas por proteólise aumentada (CARRANO e PAGANO 2001; KUDO et al. 2001), sugerindo que proteínas envolvidas na degradação de p27 poderiam apresentar propriedades oncogênicas. Além disto, os níveis de Skp2 encontram-se elevados em adenomas epiteliais de cavidade oral e continuam a aumentar durante a progressão para carcinomas (GSTAIGER et al. 2001).

Apesar de vários estudos relatarem a importância prognóstica da baixa expressão de p27 em câncer de tireóide e outras neoplasias malignas (SLINGERLAND e PAGANO 2000), nosso estudo sugere que, aparentemente, a

baixa expressão de p27 por provável seqüestro citoplasmático não parece ser um fator prognóstico importante em carcinomas diferenciados de tireóide. A expressão da proteína p27 encontra-se reduzida na maioria dos carcinomas pouco diferenciados de tireóide, mas apenas em uma pequena parcela dos carcinomas bem diferenciados (BALDASSARE et al. 1999). É possível que o menor número de amostras de carcinoma folicular ou a pequena quantidade de tumores pouco diferenciados (02 casos) neste estudo expliquem esta diferença. Além disto, a baixa expressão de p27 parece ser um fator prognóstico apenas para tumores pouco ou indiferenciados (TALLINI et al. 1999). Deve ser levado em consideração que este estudo não foi desenhado para avaliar o valor prognóstico das proteínas analisadas.

As células internalizam rapidamente nutrientes e moléculas sinalizadoras como hormônios e fatores de crescimento através de sistemas de transporte intracelulares como a endocitose mediada por clatrina (MOUSAVI et al. 2004). As vesículas recobertas por clatrina são responsáveis pelo transporte seletivo, das proteínas de membrana, entre as membranas celulares (KIRCHHAUSEN 2000). Após a endocitose, alguns dos receptores de membrana internalizados e seus ligantes seguem por toda a via endocítica e são degradados nos lisossomos; enquanto outros são levados para um compartimento de reciclagem, de onde retornam à membrana plasmática (OWEN 2004).

Pequenas seqüências lineares de aminoácidos, chamadas '*trafficking motifs*', encontradas nas porções citoplasmáticas das proteínas transmembrana que estão sendo transportadas, determinam as rotas entre as membranas ao longo das quais a proteína é transportada (ARIDOR e TRAUB 2002). Em eucariontes superiores a ubiquitina funciona como um desses arranjos endocíticos (POLO et al. 2002;

HAGLUND et al. 2003). A ubiquitinação de receptores de fator de crescimento parece induzir a sua internalização a partir da membrana celular, assim como, a incorporação nas vesículas intraluminais do endossoma. Este último fato resulta no desligamento da sinalização do receptor e, conseqüentemente na sua degradação (OWEN 2004).

Neste estudo foi observado aumento significativo na expressão protéica de clatrina nos tecidos neoplásicos. Mutações ou expressão alterada das proteínas de endocitose poderiam afetar o controle da proliferação celular através de vários mecanismos, como o aumento da replicação celular por prolongamento da sinalização dos receptores de fatores de crescimento. Esse funcionamento alterado poderia interferir com proliferação celular controlada por cascatas de sinalização e promover o surgimento e/ou crescimento tumoral (FLOYD e DE CAMILLI 1998).

Assim como o observado em relação a clatrina, a expressão protéica de IGFBP5 também se mostrou elevada nos tecidos neoplásicos. As proteínas de ligação de IGF, como IGFBP5, são capazes de agir como fator de crescimento independente de IGFs (MIYAKOSHI et al. 2001). IGFBP5 possui efeitos diretos sobre a capacidade de adesão e sobrevivência celulares em linhagens de câncer de mama (McCAIG et al. 2002). Em câncer de próstata, o aumento da expressão de IGFBP5 está associado à progressão tumoral mais rápida nos tumores refratários a hormonioterapia por aumento na atividade de MAPK e, conseqüente aumento na taxa de proliferação celular (MIYAKE et al. 2000).

A ruptura da matriz extracelular (MEC) por proteinases é uma etapa essencial no processo de invasão tumoral e metastatização. Várias proteases, secretadas pelas células tumorais, têm sido implicadas na formação de metástases e invasão de células

tumorais, principalmente proteases como o ativador de plasminogênio, as catepsinas e collagenases (SPIESS et al. 1994).

Diversas patologias tireoidianas mostram alterações no padrão de expressão de catepsina B (SHUJA et al. 1999). A expressão aumentada de catepsina B, especialmente próximo à membrana basal, em carcinomas sugere uma possível relação com a capacidade de invasão tumoral e disseminação (SHUJA e MURNANE 1996). Na análise por cDNA *microarray*, a expressão de catepsina B foi maior em carcinomas papilíferos do que em bócio e tecido normal, em concordância ao observado em outros estudos. Entretanto, o mesmo não foi observado em relação à expressão da proteína.

A catepsina B sofre regulação transcricional, pós-transcricional e pós-traducional. Os mecanismos de regulação incluem transcrição aumentada, diferentes sítios de início da transcrição, presença de diferentes variantes de *splicing* do mRNA da catepsina B em cada tecido e, modificação pós-transcricional da proteína por processamento proteolítico, glicosilação, tráfico e inibição (RAO 2003). Portanto, qualquer um destes mecanismos poderia explicar os resultados obtidos neste estudo.

Células metastáticas utilizam uma cascata de reações proteolíticas que inclui a participação de serina proteases, como a catepsina B, necessárias para ativar collagenases que participam na lise dos componentes da membrana basal. Uma vez ativadas, as atividades de proteinases são controladas por seus inibidores endógenos correspondentes, os inibidores de serina proteinases (serpins). A inibição de qualquer uma das etapas desta cascata poderia reduzir a capacidade de invasão das células neoplásicas. A α 1-antitripsina é um dos principais serpins plasmáticos e, sua expressão elevada nas células tumorais, sugere sua participação no processo de

carcinogênese da tireóide. A α 1-antitripsina está relacionada à progressão tumoral em estádios precoces e pior prognóstico (KARASHIMA et al. 1990; HIGASHIYAMA et al 1992), podendo ser útil como um marcador prognóstico para tumores em estádios iniciais.

A expressão citoplasmática de p21 nos carcinomas papilíferos pode indicar que, nestes tumores, p21 atuaria como um facilitador da progressão tumoral. A comparação entre adenomas e carcinomas foliculares, mostrando uma expressão nuclear menor nos carcinomas sugere que, a perda deste mecanismo de controle do ciclo celular pode estar envolvida na transformação maligna. As diferentes funções de p21 são determinadas de acordo com sua distribuição intracelular e, são dependentes do estágio de diferenciação da célula. A atividade como inibidor do ciclo celular está associada com sua localização nuclear (STEINMAN et al. 1994), mas sua capacidade de inibir a apoptose está relacionada com a localização citoplasmática (ASADA et al. 1999), através da inibição da ativação da cascata de MAP quinase. Fosforilação de p21 por Akt, resulta em sua localização citoplasmática e supressão de sua atividade inibidora de crescimento. A capacidade de P21 em inibir a proliferação celular contribui para seu papel como gene supressor de tumor; entretanto, sua atividade anti-apoptótica pode contribuir para seu potencial como oncogene (GARTEL e TYNER 2002).

PI-3K/Akt é uma importante via de bloqueio de apoptose que contribui para o processo de carcinogênese (DATTA et al. 1999). Akt se separa da superfície interna da membrana plasmática, onde inicialmente é ativada, e se reposiciona no núcleo poucos minutos após a sua ativação por fatores de crescimento (MEIER et al. 1997). Akt é capaz de coordenar simultaneamente, duas proteínas funcionalmente diferentes

para obter um efeito harmônico sobre a proliferação celular. Por um lado, a ativação de Akt inibe GSK-3 β (glycogen syntase kinase-3 β) e estabiliza o fator promotor de crescimento ciclina D no núcleo, estimulando o crescimento. Por outro lado, Akt induz a localização citoplasmática de p21 por fosforilação da proteína em T145, suprimindo, desta forma, sua atividade inibidora de crescimento. Um dos fatores que ativam a via de Akt e conferem resistência à apoptose é a superexpressão do gene HER-2/neu via de Akt (ZHOU et al. 2001).

Diferenças moleculares entre carcinomas papilíferos e foliculares incluem elevada taxa de rearranjos do gene *RET* (WILLIAMS et al. 1996) e de mutações nos genes da família *RAS* (GINESA et al. 2003).

Em tireócitos normais, a via de sinalização de Akt é importante para o crescimento celular em resposta à insulina e IGF-1 e; pode ser ativada por vários oncogenes como p21^{Ras} e rearranjos do gene *RET* (oncogene *RET/PTC*). Uma vez ativada Akt se liga a diversas proteínas carreadoras, induz a expressão e ativação de metaloproteinases de matriz, influenciando a capacidade de invasão celular e; intensifica a migração celular por via dependente de quinase P13. Células de carcinomas foliculares em áreas de invasão capsular e vascular e, em sítios metastáticos exibem ativação nuclear de Akt e; a presença de ativação nuclear de Akt também em adenomas foliculares atípicos sugere que esta possa ser uma lesão pré-maligna (VASKO et al. 2004).

A utilização de TMA permitiu a análise simultânea dos padrões de expressão das proteínas em 172 amostras de diferentes tecidos tireoidianos com rapidez e, com a mesma eficiência que as técnicas convencionais de imunistoquímica, sem apresentar dano significativo nos blocos originais. Esta análise em larga escala foi

Fundação Antônio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kunin
Coordenadora de Pesquisa



capaz de confirmar os dados prévios dos estudos com cDNA *microarray* e, obteve resultados semelhantes aos da literatura (KONONEN et al. 1998), o que reafirma sua utilização como excelente método de rastreamento de modificações moleculares no processo de carcinogênese da tireóide.

A utilização de biópsia maior que 01mm de diâmetro pode implicar em perda de material biológico e limitação do número de amostras por bloco/lâmina de TMA.

Problemas relacionados à técnica como perda de amostras e baixa celularidade na amostra podem ser compensados pela utilização de triplicatas ou mesmo quadruplicatas (HOOS et al. 2001). Neste estudo, a taxa de perda de mostras foi de até 25% nos *arrays* de bócio e tireóide normal, principalmente nas amostradas plotadas nas extremidades dos blocos. Entre as vantagens associadas à técnica estão a capacidade aumentada de análise, pouco dano ao bloco original, coleta precisa das amostras, possibilidade de construção e análise automatizadas dos arrays, obtenção de 200 cortes de cada bloco de array, análise extensa de pequenos tumores além de ser um método rápido de rastreamento de vários genes e tumores com uma mesma técnica (KONONEN et al. 1998; HOOS et al. 2001; KALLIONIEMI et al. 2001; SIMON e SAUTER 2002).

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A análise do padrão de expressão de proteínas correspondentes a genes diferencialmente expressos em tireócitos normais e nas células foliculares de bócio, adenomas e carcinomas diferenciados da tireóide através da técnica de *tissue microarray* mostrou:

- Diferenças significativas no padrão de expressão das proteínas p27, p21, clatrina, IGFBP5 e alfa1-antitripsina;
- Baixa expressão nuclear de p27 nos carcinomas em relação aos tecidos normais e adenomas foliculares;
- Expressão citoplasmática de p21 aumentada em carcinomas papilíferos;
- Expressão citoplasmática de p27 aumentada nos carcinomas foliculares em comparação com os adenomas;
- Aumento na expressão protéica de α 1 antitripsina, IGFBP-5 e clatrina nos tecidos neoplásicos;
- Ausência de expressão diferencial no padrão de expressão de catepsina B nas amostras analisadas;
- A expressão de p21 parece estar associada a pior sobrevida global em carcinomas diferenciados da tireóide;
- O padrão de expressão de p27, clatrina, IGFBP-5, catepsina B e alfa-1 antitripsina não parece influenciar a sobrevida global.

Nos carcinomas da tireóide, a desregulação de genes e proteínas envolvidos no controle do ciclo celular parece influenciar de modo significativo a progressão tumoral; uma vez que a expressão nuclear de p27 foi maior nos tecidos normais e adenomas foliculares quando comparados aos carcinomas diferenciados e, a expressão citoplasmática tanto de p21 quanto de p27 encontrava-se aumentada nos carcinomas.

O aumento da expressão protéica de alfa 1 antitripsina, um inibidor de proteinase poderia explicar em parte o padrão de expressão protéico de catepsina B observado neste estudo; assim como modificações pós-transcricionais ou pós-traducionais também poderiam estar envolvidas na expressão citoplasmática de catepsina B nos carcinomas diferenciados da tireóide.

A expressão aumentada de alfa1 antitripsina observada nos carcinomas diferenciados explicaria em parte a baixa malignidade dos carcinomas diferenciados de tireóide através da supressão da atividade das proteases, protegendo o hospedeiro da invasão e disseminação tumoral.

A observação de expressão aumentada de IGFBP5 nos tecidos neoplásicos em comparação aos tecidos normais ou bócio, favorece a sua participação na tumorigênese dos carcinomas diferenciados de tireóide e, aumenta as suspeitas de que os adenomas seriam lesões neoplásicas pré-malignas.

A expressão aumentada de clatrina nos tecidos neoplásicos poderia significar intensa atividade dos sistemas de transporte e reciclagem de proteínas nas células que se encontram em processo de proliferação e transformação ou; refletir um distúrbio funcional dos mecanismos de endocitose e transporte celular levando ao

prolongamento da sinalização de receptores de fatores de crescimento e, transformação tumoral.

A utilização de *tissue microarrays* possibilitou a confirmação, em um grande número de amostras simultaneamente, do padrão de expressão diferencial de alguns dos genes envolvidos em diferentes patologias tireoidianas, sugerindo a participação destes genes no desenvolvimento das neoplasias foliculares.

Uma das questões mais desafiantes em relação às neoplasias tireoidianas refere-se à distinção entre adenomas e carcinomas foliculares, que atualmente é realizada apenas após a cirurgia, não permitindo tratamento diferenciado para os dois tipos de tumor. Este trabalho, juntamente com os trabalhos prévios em cDNA *microarray* buscou identificar e analisar os padrões de expressão de genes diferencialmente expressos em tecido normal, bócio, adenomas e carcinomas diferenciados de tireóide.

Nosso objetivo final é auxiliar o desenvolvimento de um método diagnóstico simples e de fácil aplicação na rotina diagnóstica dos nódulos tireoidianos, principalmente no que se refere ao diagnóstico diferencial pré-operatório das neoplasias foliculares, baseado na aplicação de testes imunoistoquímicos em série, complementares ao exame morfológico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alessandrini A, Chiaur DS, Pagano M. Regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 by degradation and phosphorylation. **Leukemia** 1997; 11:342-5.

Allred DC, Jennet MH, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. **Mod Pathol** 1998; 11:155-68.

Aridor M, Traub L. Cargo selection in vesicular transport: the making and breaking of a coat. **Traffic** 2002; 3:537-46.

Asada M, Yamada T, Ichijo H, et al. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21^{Cip1/WAF1} in monocytic differentiation. **EMBO J** 1999; 18:1223-34.

Baldassare G, Belletti B, Bruni P, et al. Overexpressed cyclin D3 contributes to retaining the growth inhibitor p27 in the cytoplasm of thyroid tumor cells. **J Clin Invest** 1999; 104:865-74.

Baloch ZW, LiVolsi VA. Follicular-patterned lesions of the thyroid: the bane of the pathologist. **Am J Clin Pathol** 2002; 117:143-50.

Barden CB, Shister KW, Zhu B, Guiter G, et al. Classification of follicular thyroid tumors by molecular signature: results of gene profiling. **Clin Cancer Res** 2004; 9:1792-800.

Bell B, Mazzaferri EL. Thyroid cancer in familial polyposis coli: case report and literature review. **Dig Dis Sci** 1993; 38:185-90.

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

- Bridge J, Kanamori M, Ma Z, et al. Fusion of the *ALK* Gene to the Clathrin Heavy Chain Gene, *CLTC*, in inflammatory myofibroblastic tumor. **Am J Pathol** 2001; 159:411-5.
- Brugarolas J, Chadrsekaran C, Gordon J, et al. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. **Nature** 1995; 377:552-7.
- Burch HB. Evaluation and management of the solid thyroid nodule. **Endocrinol Metab Clin North Am** 1995; 24:663-710.
- Carrano AC, Pagano M. Role of the F-box protein Skp2 in adhesiondependent cell cycle progression. **J Cell Biol** 2001; 153:1381-9.
- Challeton C, Bounacer A, Du Villard JA, et al. Pattern of ras and gsp oncogene mutations in radiation-associated human thyroid tumors. **Oncogene** 1995; 11:601-3.
- Chen J, Jackson PK, Kirshner MW, Dutta A. Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. **Nature** 1995; 374:386-8.
- Claussen M, Kubler B, Wendland M, et al. Proteolysis of insulin-like growth factors IGF and IGF binding proteins by cathepsin D. **Endocrinology** 1997; 138:3797-803.
- Cohen P, Peehl DM, Graves HC, Rosenfeld RG. Biological effects of prostate specific antigen as an insulin-like growth factor binding protein-3 protease. **J Endocrinol** 1994; 142:407-15.
- Collett-Solberg PF, Cohen P. The role of the insulin-like growth factor binding proteins and the IGFBP proteases in modulating IGF action. **Endocrinol Metabol Clin North Am** 1996; 25:591-614.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T. **Robbins pathologic basis of disease**. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1999. Thyroid; p.1130-47.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes Dev** 1999; 13:2905-27.

DeGroot LJ, Reilly M, Pinnamneni K, Refetoff S. Retrospective and prospective study of radiation-induced thyroid disease. **Am J Med** 1983; 74:852-62.

De Vita G, Berlingieri MT, Visconti R, et al. Akt/protein kinase B promotes survival and hormone-independent proliferation of thyroid cells in the absence of dedifferentiating and transforming effects. **Cancer Res** 2000; 60:3916-20.

Dodwell DJ. Proteinase inhibitors in malignancy: therapeutic promise or another white elephant? **J R Soc Med** 1993; 86:573-6.

Draetta G. Mammalian G1 cyclins. **Curr Opin Cell Biol** 1994; 6:842-6.

Elisei R, Romei C, Vorontsova T, Cosci B, et al. RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86:3211-6.

Erickson LA, Jin L, Wollan PC, Thompson GB, van Heerden J, Lloyd RV. Expression of p27kip1 and Ki-67 in benign and malignant thyroid tumors. **Mod Pathol** 1998; 11:169-74.

Finley DJ, Zhu B, Barden CB, Fahey TJ. Discrimination of benign and malignant thyroid nodules by molecular profiling. **Ann Surg** 2004; 240:425-37.

Floyd S, De Camilli P. Endocytosis proteins and cancer: a potential link? **Trends Cell Biol** 1998; 8:299-301.

Fowles JL, Enghild JJ, Suzuki K, Nagase H. Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. **J Biol Chem** 1994; 269:25742-6.

Freeman WM, Robertson DJ, Vrana KE. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. **Biotechniques** 2000; 29:1042-55.

Fukunari N, Nagahama M, Sugino K, Mimura T, Ito K, Ito, K. Clinical evaluation of color Doppler imaging for the differential diagnosis of thyroid follicular lesions. **World J Surg** 2004; 28:1261-65.

Galanti MR, Hansson L, Bergstrom R, et al. Diet and the risk of papillary and follicular thyroid carcinoma: A population-based case control study in Sweden and Norway. **Cancer Causes Control** 1997; 8:205-14.

Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. **Mol Cancer Ther** 2002; 1:639-49.

Gharib H. Fine-needle biopsy of thyroid nodules: advantages, limitations and effect. **Mayo Clin Proc** 1994; 69:44-9.

Ginesa GR, Hongyu Z, Robert LC, et al. Ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. **J Clin Oncol** 2003; 21:3226-35.

Goldgar D, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. **J Natl cancer Inst** 1994; 86:1600-8.

Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. **Nature** 1979; 279:679-85.

Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Charles M. Balch CM. **AJCC cancer staging handbook**. 6th ed. New York: Springer Verlag; 2002. (American Joint Committee on Cancer).

Gstaiger M, Jordan R, Lim M, et al. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:5043-8.

Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore P, Dikic I. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. **Nat Cell Biol** 2003; 5:461-6.

Hamburger JL. Diagnosis of thyroid nodules by fine needle biopsy: use and abuse. **J Clin Endocrinol Metab** 1994; 79:335-9.

Harnes JK, McLeod MK, Thompson NW, Noble WG, Burney RE. Deaths due to differentiated thyroid cancer: a 46-year perspective. **World J Surg** 1988; 12:623-9.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinase. **Cell** 1993; 75:805-16.

Hedberg Y, Ljungberg B, Roos G, Landberg JR. Expression of cyclin D1, D3, E and p27 in human renal cell carcinoma analysed by tissue microarray. **Br J Cancer** 2003; 88:1417-23.

Hegedus L, Bonnema SJ, Bennedbaek FN. Management of simple nodular goiter: current status and future perspectives. **Endocrinol Rev** 2003; 24: 102-32.

Hengst L, Dulic V, Slingerland JM, Lees E, Reed SI. A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** 1994; 91:5291-5295.

Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, et al. Validation of tissue microarray for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. **Am J Pathol** 2001; 158:1245-51.

Huang H, Campbell SC, Nelius T, et al. Alpha1-antitrypsin inhibits angiogenesis and tumor growth. **Int J Cancer** 2004; 112:1042-8.

Ito Y, Matsuura N, Sakon M, et al. Expression and prognostic roles of the G1-S modulators in hepatocellular carcinoma: p27 independently predicts the recurrence. **Hepatology** 1999; 30:90-99.

Jennische E, Skottner A, Hansson HA. Dynamic changes in insulin-like growth factor I immunoreactivity correlate with repair events in rat ear after freeze-thawed injury. **Exp Mol Pathol** 1987; 47:193-201.

Jones JJ, Clemons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocr Rev** 1995; 16:3-34.

Jossart GH, Clark OH. Well-differentiated thyroid cancer. **Curr Probl Surg** 1994; 31:937-1012.

Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. **Hum Mol Gen** 2001; 10:657-62.

Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J Am Stat** 1958; 53:457-81.

Karashima S, Kataoka H, Itoh H, Maruyama R, Kono M. Prognostic significance of alpha-1-antitrypsin in early stage of colorectal carcinomas. **Int J Cancer** 1990; 45:244-50.

Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Tateishi R. An evaluation of the prognostic significance of alpha-1-antitrypsin expression in adenocarcinomas of the lung: an immunohistochemical analysis. **Br j Cancer** 1992; 62:300-302.

Karayan L, Hadjadj S, Larsen CJ, Marechaud R, Kraimps JL. Update on differentiated thyroid carcinoma. **Bull Cancer** 2000; 89: 113-23.

Kataoka H, Uchino H, Iwamura T, Seiki M, Nabeshima K, Koono M. Enhanced tumor growth and invasiveness in vivo by a carboxyl-terminal fragment of alpha1-proteinase inhibitor generated by matrix metalloproteinases: a possible modulatory role in natural killer cytotoxicity. **Am J Pathol** 1999; 154:457-68.

Kato Y, Ying H, Willingham MC, Cheng SY. A tumor suppressor role for thyroid hormone β receptor in a mouse model of thyroid carcinogenesis. **Endocrinol** 2004; 145:4430-8.

Kelley KM, Oh Y, Gargosky SE, et al. Insulin-like growth factor-binding proteins IGBPs and their regulatory dynamics. **Int J Biochem Cell Biol** 1996; 28:619-37.

Khoo ML, Beasley NJ, Ezzat S, Freeman JL, Asa SL. Overexpression of cyclin D1 and underexpression of p27 predict lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab** 2002; 87:1814-8.

Kim DS, McCabe CJ, Buchanan MA, Watkinson JC. Oncogenes in thyroid. **Clin Otolaryngol** 2003; 28:386-95.

Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, Fusco A, Dumont JE, Roger PP. Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. **Endocr Rev** 2001; 22:631-56.

Kirchhausen T. Clathrin. **Ann Rev Biochem** 2000; 69:699-727.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med** 1998; 4:844-7.

Körle J. Guard your master: thyroid hormone receptors protect their gland of origin from thyroid cancer. **Endocrinology** 2004; 145:4427-9.

Koustoulas G, Lang A, Nagase H, Baici A. Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. **FEBS Lett** 1999; 455:286-90.

Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, et al. Pax8/PPAR γ 1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma. **Science** 2000; 289:1357-60.

Kudo Y, Kitajima S, Sato S, Miyauchi M, Ogawa I, Takata T. High expression of S-phase kinase-interacting protein 2, human F-box protein, correlates with poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. **Cancer Res** 2001; 61:7044-7.

LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. **Genes Dev** 1997; 11:847-862.

Lah TT, Kos J. Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis. **Biol Chem** 1998; 379:125-30.

Lalou C, Silve C, Rosato R, Segovia B, Binoux M. Interactions between insulin-like growth factor-I IGF-I and the system of plasminogen activators and their inhibitors in the control of IGF-binding-protein-3 production and proteolysis in human osteosarcoma cells. **Endocrinology** 1994; 135:2318-26.

Laugwitz KL, Allgeier A, Offermanns S, et al. The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996; 93:116-20.

Linke M, Jordans S, Mach L, Herzog V, Brix K. Thyroid stimulating hormone upregulates secretion of cathepsin B from thyroid epithelial cells. **Biol Chem** 2002; 383:773-84.

Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC and Scheithauer BW. **Am J Pathol** 1999; 154:313-323.

Loh KC, Greenspan FS, Gee L, Miller TR, Yeo PBB. Pathological tumor-node-metastasis pTNM staging for papillary and follicular thyroid carcinomas: a retrospective analysis of 700 Patients. **J Clin Endocrinol Metab** 1996; 82:3553-62.

Mahooney MC, Lawvere S, Falkner KL, et al. Thyroid cancer incidence trends in Belarus: examining the impact of Chernobyl. **Int J Epidemiol** 2004; 33:1025-33

McCaig C, Perks CM, Holly JMP. Intrinsic actions of IGFBP-3 and IGFBP-5 on Hs578T breast cancer epithelial cells: inhibition or accentuation of attachment and survival is dependent upon the presence of fibronectin. **J Cell Science** 2002; 115:4293-4303.

Meier R, Alessi DR, Cron P, Andjelkovic M, Hemmings BA. Mitogenic activation, phosphorylation and nuclear translocation of protein kinase B. **J Biol Chem** 1997; 272:30491-7.

Meireles SI, Cristo EB, Carvalho AF, et al. Molecular classifiers for gastric cancer and premalignant diseases of the gastric mucosa. **Cancer Res** 2004; 64:1-11.

Miyake H, Pollak M, Gleave ME. Castration-induced up-regulation of insulin-like growth factor binding protein-5 potentiates insulin-like growth factor-1 activity and accelerates progression to androgen independence in prostate cancer models. **Cancer Res** 2000; 60:3058-64.

Miyakoshi N, Richman C, Kasukawa Y, Linkhart TA, Baylink DJ, Mohan S. Evidence that IGF-binding protein-5 functions as a growth factor. **J Clin Invest** 2001; 107:73-81.

Mizuno T, Kyoizumi S, Suzuki T, Iwamoto KS, Seyama T. Continued expression of a tissue specific activated oncogene in the early steps of radiation-induced human thyroid carcinogenesis. **Oncogene** 1997; 15:1455-60.

Morgan M. Principles of cdk regulation. **Nature** 1995; 374:131-4.

Mousavi SA, Malerod L, Berg T, Kjekken R. Clathrin-dependent endocytosis. **Biochem J** 2004; 377:1-16.

Ogawa Y, Kato Y, Ikeda K, et al. The value of ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology for thyroid nodules: an assessment of its diagnostic potencial and pitfalls. **Surg Today** 2001; 31:97-101.

Okamoto CT, McKinney J, Jeng YY. Clathrin in mitotic spindles. **Am J Physiol** 2000; 279:C369-74.

Owen DJ. Linking endocytic cargo to clathrin: structural and functional insights into coated vesicle formation. **Biochem Soc Trans** 2004; 32:1-14.

Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. **Science** 1995; 269:682-5.

Pearse BM. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1976; 73:1255-9.

Poblete MT, Nualart F, del Pozo M, Perez JA, Figueroa CD. Alpha 1-antitrypsin expression in human thyroid papillary carcinoma. **Am J Pathol** 1996; 20:956-63.

Polo S, Sigismund S, Faretta M, et al. A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins **Nature** 2002; 416:451-5.



Polyak K, Waldman T, He T-C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. **Genes Dev** 1996; 10:1945-52.

Postiglione MP, Parlato R, Rodriguez-Mallon, et al. Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002; 99:15462-7.

Prescott JL, Tindall DJ. Clathrin gene expression is androgen regulated in the prostate. **Endocrinology** 1998; 139:2111-9.

Qian X, Jin L, Kulig E, Lloyd RV. DNA methylation regulates p27Kip1 expression in rodent pituitary cell lines. **Am J Pathol** 1998; 153:1475-82.

Quackenbush J. Computational analysis of microarray data. **Nat Rev Genet** 2001; 2:418-27.

Rao JS. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:489-501.

Raphael SJ. The meanings of markers: ancillary techniques in diagnosis of thyroid neoplásica. **Endocr Pathol** 2002; 13:301-11.

Reed-Larsen P. A tiroide. In: Wyngaarden JB, Smith LH, Jr, Bennett JC, editors. **Cecil tratado de medicina interna**. 19^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993. p.1272-96.

Resnick MB, Schacter P, Finkelstein Y, Kellner Y, Cohen O. Immunohistochemical analysis of p27/kip1 expression in thyroid carcinoma. **Mod Pathol** 1998; 11:735-9.

Rivas M, Santisteban P. TSH-activated signaling pathways in thyroid tumorigenesis. **Mol Cell Endocrinol** 2003; 213:31-45.

Ron E, Lubin JH, Shore RE, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with complimentary DNA microarray. **Science** 1995; 270:467-70.

Schena M, Shalon D, Davis DW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with complimentary DNA microarray. **Science** 1995; 270:467-70.

Schlumberger MJ. Papillary and follicular thyroid carcinoma. **N Engl J Med** 1998; 338:297-306.

Schneider AB, Ron E, Lubin J, Stovall M, Gierlowski TC. Dose-dependent relationships for radiation-induced thyroid nodules: evidence for the prolonged effects of radiation on the thyroid. **J Clin Endocrinol Metab** 1993; 77:362-9.

Segev DL, Umbricht C, Zeiger MA. Molecular pathogenesis of thyroid cancer. **Surg Oncol** 2003; 12:69-90.

Sherman SI, Gillenwater AM. Neoplasms of the thyroid. In: Rolland JF, Bast RC, Morton DL, Frei III E, Kufe DW, Weichselbaum RR, editors. **Cancer medicine**. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 2000. p.1105-14.

Shimasaki S, Shimonaka M, Zhang HP, Ling N. Identification on five different insulin-like growth factor binding proteins IGFBPs from adult rat serum and molecular cloning of a novel IGFBP in rat and human. **J Biol Chem** 1991; 266:10646-53.

Shuja S, Murnane MJ. Marked increases in cathepsin B and L activities distinguish papillary carcinoma of the thyroid from normal thyroid and thyroid with non-neoplastic disease. **Int J Cancer** 1996; 66:420-6.

Shuja S, Cai J, Iacobuzio-Donahue C, et al. Cathepsin B activity and protein levels in thyroid carcinoma, graves'disease, and multinodular goiters. **Thyroid** 1999; 9:569-77.

Simon R, Sauter G. Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors. **Exp Hematol** 2002; 30:1365-72.

Slingerland J, Pagano M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. **Cell Physiol** 2000; 183:10-17.

Smith CJ, Grigorieff N, Pearse BM. Clathrin coats at 21 Å resolution: a cellular assembly designed to recycle multiple membrane receptors. **EMBO J** 1998; 17:4943-53.

Sobin LH, Wittekind CH. **TNM classification of malignant tumours**. 5th ed. New York: Wiley-Liss; 1997. Thyroid gland; p.52-6.

Spiess E, Bruning A, Gack S, et al. Cathepsin B activity in human lung tumor cell lines: ultrastructural localization, pH sensitivity and inhibitor status at the cellular level. **J Histochem Cytochem** 1994; 42:917-929.

Stolf BS, Carvalho AF, Martins WK, et al. Differential expression of IGFBP-5 and two human ESTs in thyroid glands with goiter, adenoma and papillary or follicular carcinomas. **Cancer Lett** 2003; 191:193-202.

Steinman RA, Hoffman B, Iro A, et al. Induction of p21 WAF1/CIP1 during differentiation. **Oncogene** 1994; 9:3389-96.

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.

Tallini G, Garcia-Rostan G, Herrero A, et al. Downregulation of p27^{KIP1} and Ki67/Mib1 labeling index support the classification of thyroid carcinoma into prognostically relevant categories. **Am J Surg Pathol** 1999; 23:678-85.

Trachte AL, Suthers SE, Lerner MR, et al. Increased expression of alpha-1-antitrypsin, glutathione S-transferase pi and vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. **Am J Surg** 2002; 184:642-7.

Tucker MA, Boice JD. Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. **Radiat Res** 1995; 141:259-77.

Vasko V, Saji M, Kruhlak M, Larin A, et al. Akt activation and localization correlate with tumor invasion and oncogene expression in thyroid cancer. **J Med Genet** 2004; 41:161-70.

Viglietto G, Motti ML, Bruni P, et al. Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. **Nat Med** 2002; 8:1136-44.

Wang S, Wu J, Savas L, Patwardhan N, Khan A. The role of cell cycle regulatory proteins, cyclin D1, cyclin E and p27 in thyroid carcinogenesis. **Hum Pathol** 1998; 29:1304-9.

Williams GH, Rooney S, Thomas GA, Cummins G, Williams ED. RET activation in adult and childhood papillary thyroid carcinoma using a reverse transcriptase-n-polymerase chain reaction approach on archival-nested material. **Br J Cancer** 1996; 74:585-9.

Yan S, Sameni M, Sloane BF. Cathepsin B and human tumor progression. **Biol Chem** 1998; 379:113-23.

Yanamandra N, Gumidyala KV, Waldron KG, et al. Blockade of cathepsin B expression in human glioblastoma cells is associated with suppression of angiogenesis. **Oncogene** 2004; 23:2224-30.

Yamashita H, Nogushi S, Watanabe S, et al. Thyroid cancer associated with adenomatous goiter: an analysis of incidence and clinical factors. **Surg Today** 1997; 27:495-9.

Zapf J, Waldvogel M, Froesch ER. Binding of nonsuppressible insulin-like activity to human serum: Evidence for a carrier protein. **Arch Biochem Biophys** 1975, 168:638-45.

Zheng B, Clarke JB, Busby WH, Duan C, Clemmons DR. Insulin-like growth factor-binding protein-5 is cleaved by physiological concentrations of thrombin. **Endocrinology** 1998; 139:1708-14.

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee M-H and Hung M-C. Cytoplasmic localization of p21^{Cip1/WAF1} by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. **Nat Cell Biol** 2001; 3:245-52.

ANEXO

Anexo 1 - Banco de Dados - Ficha Clínica

Diagnóstico: 1()Ca papilífero 2()Ca folicular

AP (nº)_____ Lâminas_____ Blocos_____

RGH_____ Sexo: 2()F 2()M

Data de nascimento _____ Data do diagnóstico _____

Raça: 2()Caucasiana 2()Negra 3()Amarela

TNM_____ EC : 1()I 2()II 3()III 4()IV

Comorbidades: 1()Bócio 2()Tireoidite ()Outras_____

Tipo de cirurgia: 1()TT 2()TP 3()T + L

Data da cirurgia: _____

TTO complementar: 1-()QT 2-()RT 3-()IR

Data TTO adjuvante: _____

Recidiva: 1()Sim 2()Não Data da recidiva_____

Local: ()Locorregional Ganglionar () ()Distância_____

Tratamento pós-recidiva: 1-() cirurgia 2-() RT 3-()QT 4()IR

Data do TTO: _____

Status atual:

1()Vivo 2()óbito _____

()vivo s/ doença ()vivo c/ doença ()óbito pela doença

()óbito por outras causas ()c/ doença ()s/ doença

Data último seguimento _____

