UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

DENISE FARIA GALANO CARVALHO

Caracterização imunoistoquímica de linfócitos T regulatórios e T citotóxicos em carcinoma papilífero de tireoide, associado ou não com tireoidite de Hashimoto.

Ribeirão Preto

2018

DENISE FARIA GALANO CARVALHO

Caracterização imunoistoquímica de linfócitos T regulatórios e T citotóxicos em carcinoma papilífero de tireoide, associado ou não com tireoidite de Hashimoto.

Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Patologia. Curso: Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Edson Garcia Soares
Coorientador: Prof. Dr. Jorge Esquiche Leon

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Galano-Carvalho, Denise Faria

Caracterização imunoistoquímica de linfócitos T regulatórios e T citotóxicos em carcinoma papilífero de tireoide, associado ou não com tireoidite de Hashimoto.

65 p. : il. ; 30cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP – Área de concentração: Patologia Experimental.

Orientador: Soares, Edson Garcia

1. Carcinoma papilífero de tireoide. 2. Linfócitos T citotóxicos. 3. Linfócitos T regulatórios. 4. Resposta imune. 5. Fatores clínicos. 6. Imunoistoquímica.

Nome: Galano-Carvalho, Denise Faria

Título: Caracterização imunoistoquímica de linfócitos T regulatórios e T citotóxicos em carcinoma papilífero de tireoide, associado ou não com tireoidite de Hashimoto.

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Patologia. Curso: Patologia Experimental.

Banca Examinadora

Prof. Dr: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha filha **Beatriz** que renova minha vida a cada dia, minha motivação. Só faltava você para tudo ficar perfeito...

Ao meu esposo **Rogério Falleiros Carvalho**;

Por esses anos de caminhada e companheirismo. Testemunha das dificuldades e superações. “Juntos somos um...” E assim caminhamos para a realização dos nossos sonhos.

Te amo!

Aos meus pais, **Douglas Galano** e **Maria Silvia Faria Galano**;

Pelo exemplo de dedicação e amor;

Por me guiarem para uma sólida educação e formação de caráter;

Pelo apoio incondicional de melhores amigos.

Minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por ter me permitido sabedoria e discernimento para reunir condições para produzir este estudo.

À **minha família**, que me propiciam carinho e motivação constantes.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Edson Garcia Soares**, gratidão pela acolhida como integrante do seu grupo. Obrigada pelos ensinamentos, por todo o estímulo e disposição nesses anos de convivência.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Jorge Esquiche Leon**, pela atenção e colaboração científica dispensadas.

À minha querida amiga **Bruna Zanetti**, obrigada pelo carinho, atenção e disponibilidade. A sua presteza fez a diferença em momentos imprescindíveis dessa caminhada.

À querida **Ana Maria Rocha**, pelas orientações específicas e toda ajuda e ensinamentos na metodologia prática. Agradeço também pela amizade e carinho diários.

Aos amigos do Departamento de Patologia, **Camila de Luca Zambonini, Felipe Denipotte, Rosângela M. Castania de Paiva e Neide Terezinha Gonçalves**, pela disposição e colaboração oferecidos em todos os momentos em que foram solicitados.

Aos colegas do arquivo do SERPAT, **Décio e Júnior**, pela dedicação e ajuda.

A todos os funcionários, docentes, técnicos de laboratório e pós-graduandos do Departamento de Patologia, pela convivência e troca de experiências durante esses anos.

Ao **Cnpq** pelo auxílio científico e financeiro.

**“Devemos assumir que somos responsáveis, com os
nossos saberes e fazeres, pelo que vai ser amanhã.”**

Paulo Freire

RESUMO

GALANO-CARVALHO, D.F. **Caracterização imunoistoquímica de linfócitos T regulatórios e T citotóxicos em carcinoma papilífero de tireoide, associado ou não com tireoidite de Hashimoto. 2018.** Tese (Doutorado em Ciências. Área: Patologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Em diversos tipos de neoplasias já foi demonstrado que diferenças no perfil do infiltrado imune tumoral têm relação com prognóstico e resposta ao tratamento. Esta relação aparece intimamente correlacionada ao perfil de expressão imunoistoquímica do tumor. A presença de linfócitos T citotóxicos (CTLs) no microambiente do tumor sugere uma característica biológica crucial para a modulação da resposta imunológica antitumoral. Por outro lado, as células T regulatórias (Tregs) são importantes na manutenção da homeostase imune, em virtude da sua capacidade em inibir a resposta imunológica. Defeitos na função ou uma diminuição do número das Tregs tem sido documentado em doenças auto-imunes, ao passo que no câncer esta população ainda pode ser mais bem estudada. Sendo estabelecido que o câncer pode ser promovido e / ou agravado pela inflamação e infecções e considerando que a superexpressão de componentes do controle da resposta inflamatória específicos de Tregs e CTLs podem representar um potente mecanismo para o processo de progressão e/ou regressão de carcinoma papilífero de tireoide (CPT), o objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar as Tregs e CTLs, bem como avaliar e investigar a relação e o papel dessas células implicado na patogênese da resposta imune em pacientes acometidos com CPT associado ou não com a presença de Tireoidite de Hashimoto (TH), relacionando-as com fatores prognósticos clínico-patológicos. Foram selecionados 36 casos estratificados em 3 grupos (12 casos em cada grupo): CPTS correspondeu aos casos de CPT sem associação com quadro de tireoidite, CPTL aos casos de CPT associados à tireoidite linfocítica (CPTL) e CPTH, casos aonde o CPT estava associado à tireoidite de Hashimoto (CPTH) os quais foram submetidos à técnica de imunoistoquímica para os marcadores CD4, CD8, CD25, CD56, FOXP3 e Gran B e os resultados avaliados pelo método quantitativo. Os dados clínicos foram obtidos dos prontuários médicos. As leituras das células marcadas foram feitas nas regiões de carcinoma papilífero (denominadas intratumorais), nas áreas de parênquima tireoidiano de interface ao tecido neoplásico (denominadas peritumorais) e em áreas subsequentes de tecido tireoidiano normal (denominadas distantes). O número de células T do infiltrado

inflamatório foi expresso pela média aritmética da contagem das células dos cinco campos distintos em cada área. Foram feitas análise de variância de Medidas Repetidas Modelo Mixto e calculado o coeficiente de correlação de Pearson para as variáveis CD4 com CD8 e FOXP3 com GranB. Adicionalmente, apesar da avaliação dos CPT divididos segundo seus parâmetros clínico-patológicos não ter se apresentado significante, verificamos que em CPTH as imunovariáveis CD4 e FOXP3 (marcadores para Tregs) apresentaram maior marcação em tumores > 4,1 cm. Nesse mesmo grupo CD8 e Gran B (marcadores para CTLs) se apresentaram com maior imunomarcação em tumores não metastáticos, de estágio menor e sem recorrência. No geral, o infiltrado de células imunes entre os grupos CPTH, CPTL e CPTS, apresentou-se com diferentes densidades entre as áreas estudadas (intratumoral, peritumoral e distante). Linfócitos infiltrando o tecido de forma difusa (CPTS e CPTL) ou em agregados linfoides (CPTH) foram mais abundantes em áreas peritumorais e distantes e a proporção das células CD4+ e CD8+ variou substancialmente entre os grupos, de maneira que todos apresentaram correlação positiva (CPTH $r=0,67$; CPTL $r=0,7$ e CPTS $r=0,35$) crescente entre as variáveis. Em conclusão, estes resultados indicam que nos CPTs o microambiente imune parece ter uma relação com características patológicas de progressão do tumor. Nosso estudo mostrou que em CPTH a densidade do infiltrado tumoral e peritumoral por linfócitos Tregs e T citotóxicos está inversamente relacionada. Corroborando com a importância do microambiente imune na evolução dos CPTs, os Tregs exerceram atividade pró-tumoral, favorecendo tumores mais agressivos e os CTLs, atividade antitumoral, favorecendo características de menor agressividade.

Palavras chave: Carcinoma papilífero de tireoide, Linfócitos T citotóxicos, Linfócitos T regulatórios, Resposta imune, Fatores clínicos, Imunoistoquímica.

ABSTRACT

GALANO-CARVALHO, D.F. Immunohistochemical characterization of regulatory and cytotoxic T lymphocytes in papillary thyroid carcinoma, associated or not with Hashimoto's thyroiditis. 2018. Tese (Doutorado em Ciências. Área: Patologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

It has already been shown that differences in tumoral immune infiltrate profile are related to prognosis and response to treatment in several types of neoplasias. This relationship is closely correlated to the tumor immunohistochemical expression profile. The presence of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in the tumor microenvironment suggests a crucial biological feature for the modulation of the antitumor immune response. On the other hand, regulatory T cells (Tregs) are important in maintaining immune homeostasis, because of their ability to inhibit the immune response. Defects in function or a decrease in the number of Tregs has been documented in autoimmune diseases, nevertheless in cancer this population may still be better studied. With the establishment that cancer can be promoted and / or aggravated by inflammation and infections and considering that overexpression of components of the inflammatory response specific for Tregs and CTLs may represent a potent mechanism for the progression and / or regression of thyroid papillary carcinoma (CPT). The objective of this study was to identify and characterize the Tregs and CTLs, as well as to evaluate and investigate the relationship and the role of these cells involved in the pathogenesis of the immune response in patients with CPT associated or not with the presence of Hashimoto's thyroiditis (HT) besides relating them to clinical-pathological prognostic factors. Thirty-six stratified cases were selected in 3 groups (12 cases per group): CPTS corresponded to TLC without thyroiditis association, CPTL to cases of TLC with lymphocytic thyroiditis associated (CPTL) and CPTH was considered cases which CPT was associated to Hashimoto thyroiditis (CPTH). These three groups were submitted to the immunohistochemical technique for the CD4, CD8, CD25, CD56, FOXP3 and Gran B markers and the results was evaluated by the quantitative method. Clinical data were obtained from medical records. Stained cells readings were made in the regions of papillary carcinoma (termed intratumoral area), in the areas of the thyroid parenchyma interface to the neoplastic tissue (termed peritumoral) and in subsequent areas of normal (distal) thyroid tissue. The number of T cells of the inflammatory infiltrate was expressed by the arithmetic mean of cells counted in five distinct fields. The variance analysis of Mixed Model Repeated

Measurements and the Pearson correlation coefficient for the CD4 and CD8 and FOXP3 variables with GranB were calculated. In addition, although the CPT divided according to clinical-pathological parameters did not present a significant difference, we found that the CD4 and FOXP3 immunoglobulins (Tregs markers) showed higher marking in tumors > 4.1cm. In this same group, CD8 and Gran B (markers for CTLs) presented a higher immunolabeling in non-metastatic tumors, in smaller stage and in cases without recurrence. In general, the infiltrate of immune cells between the CPTH, CPTL and CPTS groups, presented different densities between the studied areas (intratumoral, peritumoral and distant). Lymphocytes infiltrating diffuse tissue (CPTS and CPTL) or lymphoid aggregates (CPTH) were more abundant in peritumoral and distal areas and the proportion of CD4 + and CD8 + cells varied substantially between groups, so that all groups presented positive correlation (CPTH $r = 0.67$, CPTL $r = 0.7$ and CPTS $r = 0.35$), increasing among the variables. In conclusion, these results indicate that in the CPTs the immune microenvironment seems to have a relation with pathological characteristics of tumor progression. Our study showed that in CPTH the density of tumor and peritumoral infiltrate by Tregs and T cells is inversely related. Corroborating with the importance of the immune microenvironment in the evolution of CPTs, Tregs exerted pro-tumor activity, favoring more aggressive tumors. While CTLs exerted an antitumor activity, favoring characteristics of lower aggressiveness.

Key words: Thyroid papillary carcinoma, Cytotoxic T lymphocytes, Regulatory T lymphocytes, Immune response, Clinical factors, Immunohistochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
BRAF	Oncogene de sarcoma viral murino v-raf homologia B1
CCL	Ligante de quimiocina CC
CD	<i>Cluster Differentiation</i>
CDT	Carcinoma diferenciado de tireoide
CPT	Carcinoma papilífero de tireoide
CTL	Linfócitos T citotóxicos
CXCL	Receptor de quimiocinas CXC
CTLA4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DAB	Diaminobenzidine
DC	Células dendríticas
ANOVA	Análise de variância
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HC	Hospital das Clínicas
HE	Hematoxilina - Eosina
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IL-17R	Receptor de citocina IL-17
mM	milimolar
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMP	<i>Matrix Metaloproteinases</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
PAX8	<i>Paired-box gene 8</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> PDL
PPAR-γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-γ</i>
RAS	Vírus sarcoma de rato
RET/PTC	<i>Rearranged during transfection/papillary thyroid carcinoma</i>
ROR	<i>Retinoid-related orphan receptor</i>
SERPAT	Serviço de Patologia

SI	Sistema Imune
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAA	<i>Tumor-associated Antigens</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th	<i>T helper</i>
TH	Tireoidite de Hashimoto
TIL	<i>Tumor infiltrating lymphocytes</i>
TL	Tireoidite linfocítica
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNM	Tumor Nódulo Metástase
Tregs	<i>Regulatory T cell</i>
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VEGF-R	Receptor do fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela 1: Descrição dos anticorpos utilizados para imunoistoquímica nos CPT.....	30
Tabela 2: Características demográficas da população de estudo	36
Tabela 3: Comparação entre a expressão de CD4, CD25 e FOXP3 e os parâmetros clínico-patológicos nas lesões tireóideas malignas.....	37
Tabela 4: Comparação entre a expressão de CD8, CD56 e Gran B e os parâmetros clínico-patológicos nas lesões tireóideas malignas	38
Tabela 5: Distribuição da média de células imunomarcadas entre os parâmetros clínico-patológicos para CPTH.....	39
Tabela 6: Distribuição da média de células imunomarcadas entre os parâmetros clínico-patológicos para CPTL.....	39
Tabela 7: Distribuição da média de células imunomarcadas entre os parâmetros clínico-patológicos para CPTS.....	40
Tabela 8: Distribuição da média de células intratumorais marcadas por CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD56 e GRAN B entre os diferentes grupos de CPT.	42
Tabela 9: Comparação da média de expressão quantitativa do CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD56 e GRAN B da área intratumoral entre os diferentes grupos.....	42
Tabela 10: Distribuição da média de células peritumorais marcadas por CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD56 e GRAN B entre os diferentes grupos de CPT.....	44
Tabela 11: Comparação da média de expressão quantitativa do CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD56 e GRAN B da área peritumoral entre os diferentes grupos.....	45
Tabela 12: Distribuição da média de células distantes marcadas por CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD56 e GRAN B entre os diferentes grupos de CPT.....	47

Tabela 13: Comparação da média de expressão quantitativa do CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD56 e GRAN B da área distante entre os diferentes grupos.	47
Tabela 14: Distribuição das áreas de maior concentração de células marcadas entre os grupos.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografias das imunomarcações em tonsila, controles positivo.....	31
Figura 2: Painel imunoistoquímico de células do sistema imunológico em carcinomas papilíferos da tireoide.....	35
Figura 3: Média de linfócitos marcados para CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD56 e GRAN B de acordo com os grupo estudados	41
Figura 4: Distribuição da densidade de células intratumorais marcadas por anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-CD56, anti-FOXP3 e anti- Gran B entre os grupos CPTH, CPTL e CPTS.....	43
Figura 5: Figura 5: Distribuição da densidade de células peritumorais marcadas por anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-CD56, anti-FOXP3 e anti- Gran B entre os grupos CPTH, CPTL e CPTS.....	46
Figura 6: Distribuição da densidade de células distantes marcadas por anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-CD56, anti-FOXP3 e anti- Gran B entre os grupos CPTH e CPTL.....	48
Figura 7: Expressão imunoistoquímica de CD8 no CPTH nas diferentes áreas estudadas.....	49
Figura 8: Expressão imunoistoquímica de CD4 no CPTH nas diferentes áreas estudadas.....	50
Figura 9: Representação gráfica da imunomarkação das variáveis imunológicas	51
Figura 10: Gráficos de dispersão da análise de correlação entre a expressão de CD4 e CD8 nos diferentes grupos.....	53
Figura 11: Gráficos de dispersão da análise de correlação entre a expressão de FOXP3 e Gran B nos diferentes grupos.....	54

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	18
2 - REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1- Imunologia tumoral	20
2.2- Inflamação, linfócitos e câncer	23
2.3- Tireoidite de Hashimoto	25
2.4-Carcinoma papilífero de tireoide	26
3 - OBJETIVO GERAL	27
3.1 - Objetivos específicos	27
4 - MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 - Casuística	28
4.2 - Reação de imunoistoquímica	30
4.3 - Análise dos marcadores CD4, CD8, CD25, CD56, FOXP3 e Gran B	32
4.4 - Análise estatística	33
5 - RESULTADOS	34
5.1 - Características histoquímicas	34
5.2 - Análise das lesões tireoideas dos pacientes estudados em relação aos parâmetros clínico-patológicos	35
5.3 - Expressão imunoistoquímica dos marcadores CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD56 e GRAN B	40
5.4 - Análise de correlação entre CD4 x CD8 e FOXP3 x Gran B	52
6 - DISCUSSÃO	54
7 - CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXO	65

1- INTRODUÇÃO

O câncer da tireoide é o tumor maligno mais comum do sistema endócrino, representando a sétima malignidade mais comum entre as mulheres (1). É proveniente de dois grupos celulares que possuem origens embriológicas distintas: os originários das células foliculares – Carcinomas Papilífero, Folicular e Anaplásico – e o originário das células C neuroendócrinas – o Carcinoma Medular. Dentre eles, destaca-se o carcinoma papilífero (CPT) como o mais frequente, correspondendo a 90% dos casos (2). Apesar do conhecimento em relação a idade e a presença de mutações de ponto e rearranjos cromossômicos e da associação do CPT com a prevalência aumentada em mulheres, ainda tem muito para se explorar sobre os mecanismos que determinam e ou desencadeiam a patofisiologia destes carcinomas.

A incidência das doenças tireoideas tem aumentado nos últimos anos e o câncer de tireoide é um dos diagnósticos de câncer que mais cresce em todo o mundo (3). A exposição a radiação ionizante é o fator de risco mais bem esclarecido até o momento para o desenvolvimento de carcinoma de tireoide (4). As condições anormais da tireoide estão associadas à liberação excessiva de seus hormônios (hipertireoidismo), à deficiência desses hormônios (hipotireoidismo), a bóciós e tumores. Segundo o Ministério da Saúde, para o Brasil, estimou-se no ano de 2016 e estendendo para 2017, 1.090 casos novos de câncer de tireoide para o sexo masculino e 5.870 para o sexo feminino, com um risco estimado de 1,08 casos a cada 100 mil homens e 5,70 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2016).

Embora o CPT seja caracterizado por um crescimento lento e de bom prognóstico, recentemente foi demonstrado que o risco de recorrência (local e à distância) da doença é mais frequentemente analisado em relação ao prognóstico, com uma estimativa de cerca 30% de recorrência (5). Além das características clínico-patológicas consideradas como contribuindo para um maior ou menor risco de recorrência da doença, foram sugeridos elementos adicionais no processo de estratificação de risco nos guidelines publicados pela Associação Americana de Tireoide (ATA), sendo eles: presença ou ausência e grau de invasão vascular, multifocalidade, número e tamanho de linfonodos

cervicais com metástases e presença ou não de invasão capsular (6). Neste sentido, a busca por novos caminhos que possam auxiliar o entendimento dos fatores que levam a progressão dos tumores de CPT é de suma importância para melhorar a abordagem terapêutica.

Intensa investigação sobre a função efetora e regulação das células imunes é um caminho que tem despertado novas estratégias para o entendimento do comportamento das células tumorais. A resposta imune eficiente pode eliminar as células cancerosas, porém, a ativação crônica de células inflamatórias em torno da neoplasia pode sustentar a proliferação de células neoplásicas (7). Existe uma forte associação entre inflamação crônica, aumento da susceptibilidade à transformação neoplásica e o desenvolvimento do câncer (7-9). O câncer de tireoide pode exibir componente inflamatório crônico associado que é frequentemente observado no CPT. Esta neoplasia frequentemente aparece em pacientes com doenças autoimunes, tais como a Tireoidite de Hashimoto (TH) e a Doença de Graves. Portanto, a avaliação da resposta imunológica como marcador de atividade tumoral pode ser identificada como fator que possa prever a evolução dos pacientes com CPT e ajudar a selecionar os grupos com alto risco de recidiva.

A coexistência de inflamação e câncer pode ser observada em vários tumores. A persistente liberação de mediadores da resposta inflamatória no local do tumor pode afetar a sua progressão, assim como a resistência, a apoptose e promoção da angiogênese podem aumentar a taxa de proliferação de células tumorais por inibição de imunidade protetora antitumoral (9).

A identificação de mecanismos celulares e moleculares levando à ativação de células imunes inatas e adaptativas têm sido de suma importância no progresso da imunologia tumoral. Estudos sobre a intrincada rede de interações entre células tumorais e imunes revelaram novos sinais regulatórios, incluindo receptores inibitórios da superfície celular e moléculas co-estimulantes, caminhos regulatórios intracelulares, citocinas imunossupressoras e mediadores proapoptóticos, que podem operar em conjunto para orquestrar a fuga imune tumoral (10). Este portfólio emergente de pontos de controle inibitórios pode influenciar a fisiologia das células imunes inatas, incluindo células dendríticas, macrófagos e células assassinas naturais

(NK), bem como diferentes subconjuntos de células T para afinar sua função efetora. A combinação sinérgica de estratégias visando a superação de sinais reguladores e/ou estimulando vias efetoras pode oferecer vantagem terapêutica como adjuvantes de terapias anticancerígenas convencionais.

Nesse contexto, e levando em conta que a associação entre inflamação e câncer tem sido progressivamente reconhecida nas últimas décadas, a superexpressão de componentes do controle da resposta inflamatória específicos de linfócitos T puderam representar um potente mecanismo para o processo de progressão do CPT, buscando na associação com as tireoidites de Hashimoto e linfocítica uma maior ou menor agressividade do tumor. Com base nessa premissa, discutiremos aqui como o controle das funções efetoras de células imunes inatas e adaptativas e a presença de caminhos regulatórios, isolados ou em combinação, poderiam ser explorados para fins terapêuticos em pacientes com câncer de tireoide.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Imunologia tumoral

Os últimos 30 anos de pesquisa em imuno-oncologia forneceram evidências sólidas de que os tumores são reconhecidos pelo sistema imunológico e seu desenvolvimento pode ser interrompido ou controlado através de um processo conhecido como imunovigilância. A especificidade tumoral da resposta imune reside no reconhecimento de antígenos tumorais. Atualmente, a imunopatologia tumoral tem dado grande importância a estes antígenos, a quem designa como antígenos associados a tumores (TAAs). Estes antígenos surgem durante a carcinogênese por meio de mutações genéticas e o seu comportamento está relacionado à ativação ou tolerância da resposta imune (11). As proteínas virais em tumores causados por vírus e também proteínas mutadas (oncogenes), bem como auto-proteínas não-mutadas, mas anormalmente expressas encontradas, demonstraram bons

alvos para a imunovigilância (12). Em muitos tipos de câncer, no entanto, a progressão maligna é acompanhada de profunda imunossupressão que impede uma efetiva resposta antitumoral e eliminação dos tumores (13). Essa evasão do sistema imune (SI) permite às células neoplásicas criarem um ambiente de tolerância, levando ao crescimento e à malignidade tumoral por meio de uma variedade de mecanismos que incluem a produção de citocinas imunossupressoras e alterações nas funções de células dendríticas (DC) (13).

De maneira geral o microambiente tumoral é composto por células tumorais, vasos sanguíneos, células estromais e inflamatórias, além de uma variedade de células associadas ao tecido (14). As células que apresentam um crescimento descontrolado, bem como a presença de antígenos tumorais, podem ser reconhecidas e controladas pelo sistema imunológico, induzindo uma resposta imune inata e/ou adaptativa (14).

A resposta adaptativa às células tumorais depende da apresentação de epítopos de antígenos tumorais no sítio de ligação de moléculas do MHC (Complexo Maior de Histocompatibilidade) classe I. O principal mecanismo de morte das células tumorais por vias específicas depende da ação de células T CD8⁺ citotóxicas que reconhecem antígenos apresentados no contexto do MHC I. Assim, respostas imunes do Tipo 1, envolvem uma ampla variedade de células, fatores humorais e respostas de tecidos, sendo exercidas por um tipo de células T efectoras (tipo T helper-1 [Th1]), células T citotóxicas (CTL) e células natural killer (NK) e são importantes na defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares e células tumorais (15). Independente do mecanismo de reconhecimento inato, as vias efectoras são mediadas pela via do IFN- γ . Células dendríticas apresentadoras de antígenos tumorais drenam para um linfonodo e estimulam a proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ tumor-específicas. Por fim, as células da imunidade adaptativa são atraídas para o local da neoplasia onde reconhecem e destroem as células tumorais que expressam os antígenos específicos (15). Por outro lado, quando as células tumorais criam mecanismos de escape das células do sistema imune através da liberação de citocinas inibitórias como TGF- β ou IL-10, o que favorece um padrão Th2, ocorre o crescimento de maneira descontrolada.

Inicialmente, a maior parte da fuga da imunovigilância foi atribuída a mudanças nas próprias células tumorais aonde a perda de antígenos tumorais, perda de moléculas de antígenos de leucócitos humanos, perda de sensibilidade ao complemento ou lise celular de células T ou células NK foram considerados alvos pobres para um ataque imunológico. No entanto, tornou-se claro que a supressão vem da capacidade dos tumores de subverter a regulação imune normal para a sua vantagem. O microambiente do tumor pode prevenir a expansão das células T auxiliares e citotóxicas específicas do antígeno tumoral e, em vez disso, promover a produção de citocinas pró-inflamatórias e outros fatores, levando ao acúmulo de populações de células supressoras que inibem em vez de promover a imunidade (12, 13).

Uma questão central e que remete a muitas controversas são os mecanismos responsáveis em ativar e suprimir a resposta imunológica durante o processo de carcinogênese. Durante a resposta inflamatória aguda, observam-se predominantemente células Th1, linfócitos T e NK. Os linfócitos secretam citocinas antitumorais, que combinadas com antiglobulinas produzidas por linfócitos B, ativam a resposta inibitória e recrutam células imunes e linfócitos citotóxicos que promovem a regressão tumoral (12). Em contrapartida, a ativação crônica da resposta imune resulta no acúmulo de linfócitos T reguladores (Tregs), de células Th2 e ativação de células B, ocasionando o desenvolvimento e a progressão tumoral (13).

Aparentemente, o tipo, a intensidade e o momento do início da resposta inflamatória induzida pela ação de citocinas, são fatores que definem se o processo inflamatório atuará como promotor ou inibidor do desenvolvimento tumoral. Nesse contexto, a compreensão dos mecanismos básicos envolvidos no crescimento tumoral, bem como a resposta imune contra o tumor, são fundamentais para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, especialmente para as formas mais avançadas da doença para as quais as opções atuais de tratamento têm impacto limitado na sua progressão.

2.2- Inflamação, linfócitos e câncer

A inflamação é um componente crítico para o desenvolvimento tumoral, haja vista que muitos tumores surgem em locais de infecção ou inflamação crônica. O papel da inflamação crônica na carcinogênese foi proposto por Rudolf Virchow em 1863. Ao observar a presença de leucócitos em tecidos tumorais, Virchow postulou que um meio inflamatório promove um ambiente celular que orienta a iniciação e o desenvolvimento tumoral (16).

A evolução tumoral é composta pelas seguintes fases: in situ, crescimento, invasão, extravasamento e metástase. Durante essas fases, as células tumorais interagem com o seu microambiente e são influenciadas por sinais provenientes de células estromais, endoteliais, inflamatórias e imunológicas, os quais podem contribuir, simultaneamente, para o processo inflamatório e para a resposta imune anti-tumoral (17). Dessa maneira, o sistema imune é capaz de responder ao câncer a partir da ativação sistêmica, regional e intratumoral de leucócitos (18).

Um paradigma amplamente aceito, atualmente, é de que a inflamação crônica associada ao tumor é dirigida, em parte, por citocinas e quimiocinas presentes no ambiente tumoral, que facilitam a progressão das células neoplásicas, em vez de promover uma resposta imune efetiva (14). Células tumorais e do estroma reativo secretam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que atuam direta ou indiretamente estimulando o endotélio vascular a recrutar leucócitos para o sítio tumoral (19). Assim, com o acúmulo de citocinas pró-inflamatórias no microambiente do tumor e a inflamação associada ao desenvolvimento e progressão do câncer, torna-se razoável prever uma relação positiva entre estas células e a progressão do tumor.

Evidências crescentes demonstram que a ativação do sistema imune pode ser um tratamento eficaz e cada vez mais promissor para pacientes com câncer. As principais células imunes responsáveis pela atividade antitumoral são os CTLs (20). A presença deles direcionados ao tumor, em número e funcionalidade, é um pré-requisito para o sistema imune atacar células cancerosas (21). Os anticorpos imunomoduladores dirigidos contra o antígeno

CTLA-4 (CD152) e o ligante de morte celular programada (PDL1 / CD274) mostraram eficácia clínica em pacientes com câncer de pulmão (22). Os agentes imunomoduladores tentam aumentar a eficácia da atividade dos CTLs. Há décadas, experimentos em camundongos e estudos clínicos em humanos vêm mostrando claramente a contribuição do linfócito T CD8+ no controle do desenvolvimento tumoral. Em modelos murinos, a eficiência de várias vacinas contra o câncer depende principalmente da sua capacidade de induzir linfócitos T CD8+. A administração de clones T citotóxicos específicos antitumorais em camundongos resultou em respostas antitumorais que demonstraram diretamente a eficiência terapêutica dessas células. As respostas clínicas em pacientes com câncer tratados com imunoterapia foram associadas à presença de linfócitos T CD8+ específicos antitumorais. Em melanomas regressivos espontâneos, notou-se a expansão dos CTLs CD8+ intratumorais sugerindo seu envolvimento no encolhimento do tumor.

Estudos desenvolvidos nos últimos anos têm confirmado a importância das células Tregs na indução da tolerância ao próprio e também no contexto de tumores. Foi observado que em cultura as células TCD4+CD25+ murinas e humanas conseguem suprimir a proliferação de células TCD4+CD25- e TCD8+CD25-. Além disso, a co-injeção de células T com o fenótipo regulador com células T efetoras conseguiu em camundongos imunodeficientes, prevenir o desenvolvimento de processos inflamatórios autoimunes. Com isso, foi demonstrado que essas células são supressoras tanto *in vitro* como *in vivo* (23-25). As células T reguladoras naturais (geradas no timo com atividade reguladora e que expressam o fator de transcrição FOXP3 - nTregs) e as induzidas (iTregs), que ocorrem na periferia, têm um papel na supressão da resposta efetora inflamatória. As células Tregs, em especial as naturais, é hoje foco de intensa pesquisa científica, pois possuem grande potencial de uso para terapia celular em condições patológicas nas quais é necessário restaurar a tolerância imunológica, como em doenças autoimunes e no contexto do transplante alogênico (26).

As células T reguladoras CD4 + que expressam Foxp3 (Tregs), que são um subconjunto das células T auxiliares (Th), constituem um dos principais mecanismos de tolerância periférica. Tregs previnem a ativação anormal do sistema imunológico, protegendo assim de doenças auto-imunes e

inflamatórias (27). Estudos recém-publicados também têm elucidado o papel das Tregs no desempenho de funções importantes do controle não apenas da ativação celular inata e adaptativa, mas também regulando a função celular não-imune durante insultos e lesões (28). Tendo conhecimento de que a inflamação contribui para uma multiplicidade de doenças agudas e crônicas que podem afetar a tireoide, nosso trabalho se propôs a examinar o papel de Tregs na patogênese do CPT associados ou não a doenças inflamatórias como TH e TL, explorando assim possíveis abordagens para o uso dessas células na prevenção e terapia do CPT.

2.3- Tireoidite de Hashimoto

A TH é a doença autoimune da tireoide mais prevalente, onde se observa infiltração de células, em especial de linfócitos, no tecido parenquimatoso da glândula(29). Está relacionada à ativação da resposta imune celular e humoral com ativação anormal de linfócitos T e consequente destruição de células epiteliais da tireoide por quimiotaxia de linfócitos com produção de autoanticorpos e resposta inflamatória crônica persistente(30).

A principal característica imunológica detectada na doença é a presença de auto-anticorpos anti-tireoidianos no soro dos pacientes (cerca de 90% deles) contra dois antígenos da tireoide, tireoperoxidase e tireoglobulina (15). Além desses anticorpos, a citotoxicidade mediada por células T e as vias de ativação apoptóticas também têm papel importante na patogênese da TH (8).

Ao longo das últimas décadas, a patogênese da TH tem sido objeto de numerosos estudos. A insuficiência dos folículos da tireoide ocorre com o desenvolvimento da destruição autoimune e é um processo que ocorre envolvendo diversos fatores ambientais e genéticos convergentes. O principal fator no desenvolvimento de tireoidite autoimune é a perda da tolerância imune iniciada por eventos inflamatórios na glândula, provavelmente como resultado de infecções virais ou bacterianas. As células da tireoide lesionadas podem expor epítomos diferentes ou desmascarar novos epítomos resultando em um influxo de macrófagos e células dendríticas apresentadoras de antígeno pelo MHC II. Estas células passam então a apresentar antígenos tireoidianos para

linfócitos dentro dos nódulos linfáticos regionais, levando a expansão clonal de células T CD4 + autorreativas, células T CD8 +, CTLs, e células B produtoras de imunoglobulinas (IgG), as quais infiltram o tecido tireoidiano resultando em tireoidite crônica (31).

Durante o processo inflamatório crônico na TH, é possível que os linfócitos Tregs possam atuar no sítio inflamatório na tentativa de atenuar a lesão tecidual. Como consequência poderá haver uma diminuição da defesa imune contra as células neoplásicas e o desenvolvimento de câncer. A associação entre o CPT e a TH é intensamente questionada na comunidade científica por compartilharem várias características morfológicas, imunoistoquímicas e moleculares (32-34). Estudos têm sido realizados buscando demonstrar a associação entre essas duas doenças e tem sugerido uma relação não apenas incidental (35, 36). Os pacientes com CPT tiveram quatro vezes mais propensão ao demonstrar uma TH coexistente, em comparação com os pacientes com outras doenças da tireoide, sugerindo uma ligação entre a inflamação crônica e o aparecimento de câncer na glândula (37).

Evidências indiretas na associação da TH com o CPT suportam o aumento de 2,7 vezes da frequência da TH associada ao CPT quando comparada ao grupo controle (37). A presença de processo inflamatório crônico observado na TH poderia ser admitida como o fator desencadeante, no qual a ativação de genes ou de receptores ligados ao ciclo celular poderiam predizer a transformação maligna (38).

2.4- Carcinoma papilífero de tireoide (CPT)

Existem vários relatos de infiltrados de células imuno-inflamatórias em carcinomas de tireoide, mas muitos deles controversos. Não somente os CPT, que são frequentes no contexto da TH, mas na ausência dos sinais típicos de tireoidite auto-imune, todos os tipos de carcinomas de tireoide também apresentam um infiltrado linfocítico notável, tais como produção de auto-anticorpos e formação de folículos terciários (39). A prevalência de infiltrado linfocítico é geralmente significativamente mais elevada em pacientes com CPT do que em pacientes com lesões benignas da tireoide (40), o que indica que

estas células podem favorecer o desenvolvimento do câncer. No entanto, a presença de tireoidite linfocítica crônica em pacientes com CPT se correlaciona com um melhor prognóstico (41). Controversamente, os carcinomas de tireoide com mau prognóstico, tais como os menos diferenciados e os indiferenciados, são caracterizados por uma forte redução de linfócitos infiltrantes, sugerindo que estas células podem desempenhar um papel protetor no câncer da tireoide(42). Um estudo recente investigou o papel de células imunes na progressão dos CDT através de marcadores imunoistoquímicos e verificou que células imunes infiltraram tecidos malignos mais frequentemente do que as lesões benignas (43). A presença de tireoidite linfocítica e TILs foi associada com características clínicas e patológicas de menor agressividade do tumor e uma evolução mais favorável do paciente. Com base nos estudos citados, podemos reconhecer, no entanto, que o microambiente tumoral é essencial para investigar o papel das células Tregs e CTLs nas fases de crescimento do tumor, podendo atuar para modificar o papel observado de resposta imune.

3- OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar a expressão imunoistoquímica do CD4, CD8, CD25, CD56, FOXP3 e Granzima B no microambiente tumoral de pacientes com carcinoma papilífero de tireoide e correlacioná-la com os dados clínicos e histopatológicos de importância prognóstica.

3.1- Objetivos específicos

Investigar a possível relação entre o perfil de expressão imunoistoquímica do microambiente imune do carcinoma papilífero com a presença ou ausência de tireoidite concomitante.

Correlacionar diferenças do perfil de infiltração tumoral por linfócitos T regulatórios e citotóxicos com os diferentes achados clínicos e histopatológicos e verificar possíveis implicações prognósticas aos pacientes.

Avaliar se há associação entre a expressão dos marcadores em tecido tireoidiano e linfocítico adjacente e a evolução clínica dos pacientes dos diferentes grupos.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Casuística

Este estudo baseia-se em uma análise retrospectiva de casos de neoplasia maligna da glândula tireoide tratados cirurgicamente no HC-FMRP (USP) de 2000 a 2012 que totalizaram 61 casos. Todos os pacientes submetidos a cirurgia assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que permite a utilização de todos os dados clínicos e patológicos que constem em seu prontuário, resguardando-se o sigilo sobre a sua identidade. Esse trabalho foi integralmente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Experimentação Humana da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), conforme o parecer número 3437/2016 (Anexo).

Para o estudo, as lâminas arquivadas coradas por hematoxilina-eosina (HE) foram reavaliadas pelo patologista responsável para certificar o diagnóstico e selecionar as biópsias com a área de lesão mais representativa. Inicialmente, foram selecionados blocos, cujos tecidos não apresentavam autólise, artefatos ou sinais de processamento inadequados e que apresentaram tumor em pelo menos dez campos de grande aumento (40X). Atentou-se também, para o fato do paciente não ter perdido o seguimento até o momento da seleção do caso. Biópsias de pacientes com descrição no prontuário médico de sorologia positiva para o HIV ou qualquer condição orgânica relacionada com imunossupressão ou com história prévia de radioterapia para tratamento de neoplasias foram excluídas do estudo. Posteriormente, nova revisão foi feita pelo patologista responsável e foram escolhidos os blocos correspondentes as lâminas mais representativas de lesão que foram aquelas que representaram as incidências de corte com maiores dimensões, maiores graus de atipias e preferencialmente, com amostragem representativa de parênquima tireoidiano ao redor. Os casos

selecionados foram estratificados em 3 grupos. O grupo 1 correspondeu aos casos de CPT sem associação com quadro de tireoidite (CPTS), o grupo 2, aos casos de CPT associados à tireoidite linfocítica (CPTL) e o grupo 3 aos casos em que o CPT estava associado à tireoidite de Hashimoto (CPTH). Essa estratificação foi realizada levando-se em conta achados de infiltrado linfocitário nas lâminas e também no resultado do exame sorológico anti-peroxidase que foi positivo para todos os pacientes do grupo com TH. Foram revisados quanto à presença de linfócitos, o tumor, o tecido circundante imediatamente adjacente ao tumor e o tecido normal da tireoide. As amostras contendo inflamação linfocítica no tecido normal da tireoide foram designadas com tireoidites linfocíticas associadas. Esses tecidos apresentavam pelo menos um e muitas vezes, múltiplos agregados linfóides densos no parênquima normal da tireoide. Os linfócitos associados ao tumor, na ausência de tireoidite linfocítica concomitante, foram definidos por células únicas ou agregados linfocíticos pequenos (≤ 10 linfócitos agrupados). Intenso infiltrado linfocitário formando folículos linfóides com centros germinativos e níveis elevados de anticorpos circulantes dirigidos contra a peroxidase e a tiroglobulina definiram quadros de tireoidite de Hashimoto. De acordo com esses critérios, a casuística ficou com 36 casos, estando 12 deles integrando cada grupo. Também foram incluídas no estudo, para controle, 5 tireoides saudáveis obtidas através do banco de tireoide do Departamento de Endocrinologia da USP de Ribeirão Preto.

As informações clínico-patológicas, tais como sexo, idade do diagnóstico, tamanho tumoral, metástase, recorrência, e óbito, foram coletadas dos laudos do serviço de prontuários do Hospital das Clínicas da FMRP. Os carcinomas foram estadiados de acordo com o tamanho do tumor, metástases linfonodais e metástases distantes, segundo os critérios definidos pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC, 2002) e revisados pelo American Thyroid Association (44). Definiu-se a evolução como "livre de doença" (sem recidiva) em indivíduos que mantiveram níveis de Tg abaixo de 2 ng/dL e sem qualquer evidência de recorrência, clínica ou por métodos de imagem, enquanto os pacientes com recidiva foram aqueles com recorrência local (detecção de restos tireoidianos no leito tireoidiano ou gânglios cervicais).

4.2 - Reação de imunoistoquímica

Cortes com espessura de 5 µm foram realizados nas amostras parafinadas selecionadas, as quais foram colocadas em lâminas de vidro previamente sinalizadas com organosilano 4% em acetona e submetidos à técnica de imunoistoquímica para marcação das proteínas CD4, CD8, CD25, CD56, FOXP3 e Granzima B pelo método da avidina-biotina-peroxidase, utilizando-se o kit universal da DAKO LSAB®+ Kit, Peroxidase, Carpinteria, CA, USA. Os anticorpos primários utilizados e sua função (provável marcação) estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição dos anticorpos utilizados para imunoistoquímica nos CPT

MARCADORES	TIPO	CLONE	MARCA	FUNÇÃO
Anti-CD4	Monoclonal Camundongo	4B12	Novocastra	Linfócito T Helper-MHC II
Anti-CD8	Monoclonal Camundongo	C8/144B	Dako	Linfócito T Citotóxico-MHC I
Anti-CD25	Monoclonal Camundongo	4C9	Novocastra	Receptor de IL 2
Anti-CD56	Monoclonal camundongo	CD564	Novocastra	Célula NK
Anti-FOXP3	Monoclonal Coelho	SP97	Spring	Linfócito T Regulatório
Anti-GranB	Monoclonal Camundongo	11F1	Novocastra	Granzima B nos grânulos líticos de LTC e NK

Os cortes foram desparafinados em xilol, reidratados em uma bateria de álcool com concentração decrescente e lavados em água. A reação foi desenvolvida utilizando recuperação antigênica em panela de pressão durante 35 minutos a 95°C, com tampão citrato 10mM e pH 6,0. Com exceção do epítipo CD4 que foi usado tampão TrisEDTA 10mM e pH9,0. O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado com água oxigenada a 3% em PBS por 20 minutos. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com soro normal de cavalo diluído em PBS na concentração 1:50 num período de 30 minutos. Na sequência, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos

primários, anti-CD4 (diluição 1:200), anti-CD8 (diluição 1:500), anti-CD25 (diluição 1:400), anti-CD56 (diluição 1:100), anti-FOXP3 (diluição 1:300) e anti-GranB (diluição 1:100), por 2 horas à temperatura ambiente em câmara úmida. Na etapa final foram utilizados anticorpos secundários conjugados com estreptavidina-biotina-peroxidase (K0690, Universal Dako LSAB® + Kit, Peroxidase, Carpinteria, CA, EUA) por 30 minutos e como revelador foi utilizado o DAB (3,3-diaminobenzidina) por 30 segundos. A contracoloração foi desenvolvida com hematoxilina de Carazzi por 2 minutos e após a reidratação dos cortes em soluções de álcool absoluto e xilol as lâminas foram montadas com Permount (MERK, Darmstadt, Alemanha). Para as reações das proteínas analisadas, foram utilizados controles externos positivo e negativo, sendo, respectivamente, amostra de tonsilas humanas (Figura 1) e omissão do anticorpo primário. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz convencional, sendo consideradas células positivas aquelas coradas de marrom após a reação.

Figura1: Fotomicrografias das imunomarcações em tonsila, controles positivo (10x). (A) Marcação citoplasmática para linfócitos T CD4. (B) Marcação citoplasmática para linfócitos T CD8. (C) Marcação nuclear do FOXP3 para linfócitos T regulatórios. (D) Marcação perinuclear do Gran B para linfócitos T citotóxicos. (E) Marcação citoplasmática do CD25. (F) Marcação citoplasmática do CD56 para células NK. Barra 50 µm e detalhes: 40x.

4.3- Análise dos marcadores CD4, CD8, CD25, CD56, FOXP3 e Gran B

A padronização da interpretação em relação à marcação levou em consideração a positividade esperada para cada tipo celular, sendo feita a quantificação por contagem direta de células positivas. Para os marcadores de CD4, CD8, CD25, CD56 o padrão de marcação foi de membrana (citoplasmática). O marcador para a granzima B apresentou-se com padrão perinuclear (intracitoplasmática) e para o FOXP3 padrão nuclear (Figura 1). Após a avaliação dos cortes em sua totalidade, as áreas com maior imunomarcação foram avaliadas para a contagem de linfócitos T CD4+ e T CD8+. Foram selecionados cinco campos distintos de grande aumento (400X) nas áreas de carcinoma papilífero (denominadas intratumorais), nas áreas de parênquima tireoidiano de interface ao tecido neoplásico (denominadas peritumorais) e em áreas subsequentes de tecido tireoidiano normal (denominadas distantes). O número de células T do infiltrado inflamatório foi expresso pela média aritmética da contagem das células dos cinco campos distintos em cada área.

A quantidade e a distribuição das células positivas foram detectadas no tecido tumoral e também não tumoral linfóide adjacente. Para a marcação não se utilizou score, pois as tireoides normais não apresentavam infiltrado

linfocítico, então, as comparações foram feitas pela média de linfócitos marcados nos diferentes grupos (CPTS, CPTL e CPTH).

4.4 - Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando o software SAS Statistical Software (version 9.3; SAS Institute, Inc. Cary, NC) e submetidos a testes específicos para confiança estatística de 95% ($p < 0,05$). A distribuição normal foi testada usando o teste de Shapiro-Wilks. Devido à alta variabilidade (que acarreta falta de normalidade) utilizamos a transformação Logarítmica para todas as variáveis. Para comparar os 3 grupos (PAH, PAL e PAS) com 2 áreas repetidas (intratumoral e peritumoral) foi feita análise de variância (ANOVA) de Medidas Repetidas Modelo Mixto, com pré-teste de homogeneidade de variância de Levene e para comparar os 2 grupos (PAH e PAL) que também possuíam a contagem na área distante foi feito teste t para amostras independentes.

Foram apresentados os valores p da Anova, valores p menores do que o nível de significância adotado ($p < 0,05$) trazem a evidência de que pelo menos um dos grupos se difere dos demais. Para evidenciar essas diferenças foi feito o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey e apresentadas as diferenças estimadas com os respectivos intervalos de confiança 95%. Intervalos de confiança que não englobam o valor zero, trazem evidências de diferença entre os grupos e seus limites mostram a magnitude desta diferença. Intervalos de confiança que englobam o valor zero, trazem evidências de não diferença entre os grupos.

O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado para as variáveis CD4 com CD8 e FOXP3 com GranB. Foram apresentados gráficos de dispersão com o respectivo coeficiente de correlação. O coeficiente de correlação varia de -1 a 1, quanto mais próximo dos extremos (-1 ou 1) maior a magnitude da correlação e quanto mais próximo de zero menor a magnitude da correlação. Valores positivos evidenciam uma relação crescente, conforme uma variável aumenta de valor a outra também tende a aumentar de valor.

Valores negativos evidenciam uma relação decrescente, conforme uma variável aumenta de valor a outra tende a diminuir de valor.

5- RESULTADOS

5.1- Características histoquímicas

Pela coloração da hematoxilina e eosina (HE) observou-se que o infiltrado de células imunes era relativamente homogêneo entre os grupos CPTH, CPTL e CPTS, mas apresentou-se com diferentes quantidades entre as diferentes áreas estudadas (intratumoral, peritumoral e distante). Linfócitos infiltrando o tecido de forma difusa (CPTS e CPTL) ou em agregados linfóides (CPTH) foram mais abundantes em áreas peritumorais e distantes e a proporção das células CD4+ e CD8+ variou substancialmente entre as amostras. A Granzima B apesar de ser constitutivamente integrante das NKs, só é expressada por CTLs ativadas(45). Assim, células Gran B positivas de padrão citoplasmático granular foram avaliadas como CTLs (CD56-) e as de padrão denso foram avaliadas como células NK (CD56+). Células FOXP3 positivas apresentaram coloração nuclear, refletindo a função de transcrição nuclear do foxp3 (Figura 2).

Figura 2: Painel imunoistoquímico de células do sistema imunológico em carcinomas papilíferos da tireoide. A- Infiltração de linfócitos CD4+ (T auxiliares), (200x); B- Infiltração de linfócitos CD25+ (Tregs), (200x); C- Infiltração de linfócitos FOXP3+ (Tregs), (200x); D- Infiltração de linfócitos CD8+ (CTLs), (50x); E- Infiltração de células CD56+ (NK), (200x) e F- Infiltração de células Gran B+ (CTLs), (200x).

5.2- Análise das lesões tireoideas dos pacientes estudados em relação aos parâmetros clínico-patológicos

A população de estudo constituiu-se por 36 pacientes, sendo 30 do sexo feminino e 6 do sexo masculino. Assim, foi observada uma relação de proporção de 5 mulheres para cada homem (5:1). A média de idade ao diagnóstico foi de $44,75 \pm 13,47$ anos, estando o paciente mais novo com 8 anos ao diagnóstico e o mais velho com 73 anos (Tabela 2).

Tabela 2 : Características demográficas da população em estudo

Idade (anos)	
Mediana	45
Média ± DP	44,75 ± 13,47
Variação	8-73
Sexo	
Feminino	30
Masculino	6
Proporção	5:1
Total de pacientes	36

Atualmente a classificação histopatológica e o sistema de estadiamento TNM, preconizado pela American Joint Committee on Cancer (AJCC, 2002) são considerados as principais variáveis utilizadas na estratificação dos pacientes com câncer de tireoide, ou seja, são reconhecidos como fatores prognósticos (46). A estratificação desses pacientes em grupos de risco permite estabelecer estimativas de sobrevida e a necessidade de tratamentos complementares. O sistema de estadiamento TNM baseia-se no nível de penetração tumoral (T), no número de linfonodos regionais comprometidos por metástase (N) e na presença ou ausência de metástase à distância (M) (47). Esta classificação discrimina pacientes com doença em estágio inicial daqueles com doença avançada de acordo com quatro estádios. Em nosso trabalho foi observado a prevalência de tumores com penetração menor que dois centímetros.

Quanto às metástases, dentre os 36 pacientes incluídos no trabalho, 4 (11,2%) sofreram metástases, sendo todas ganglionares. Com relação a recorrência, a frequência se igualou a da metástase (11,2%), incluindo 3 pacientes com metástase que evoluíram para recidiva e mais 1 que não apresentava metástase ao diagnóstico. Óbito não foi observado na casuística do estudo. No estadiamento,, a distribuição ficou com 30 casos com estágio I e II e 6 casos com estágio III e IV.

Ao avaliar as amostras de câncer divididas em grupos segundo seus parâmetros clínico-patológicos, a expressão imunoistoquímica das variáveis imunológicas não se correlacionou com nenhum dos parâmetros (Tabela 3 e 4). A expressão quantitativa do CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD56 e GRAN B foi

classificada como baixa e alta considerando a média e o seu respectivo desvio padrão (de cada grupo) do número de células marcadas em todos os campos selecionados, sem levar em consideração as diferentes áreas estudadas (intratumoral + peritumoral + distante). Este valor foi utilizado como ponto de corte para definir os subgrupos de alta (AE) e baixa expressão (BE)

Tabela 3: Comparação entre a expressão de CD4, CD25 e FOXP3 e os parâmetros clínico-patológicos nas lesões tireoideas malignas.

Biópsias com CPT (CPTH + CPTL+ CPTS) = 36 (N)									
CD4 = 25 (N)				CD25 = 36 (N)			FOXP3 = 36 (N)		
	AE	BE	p	AE	BE	p	AE	BE	p
Idade (anos)									
≤ 45	8	4	0.4283	9	11	1.000	9	11	1.000
> 45	6	7		7	9		7	9	
SEXO									
M	2	1	1.000	2	4	0.6722	4	2	0.3738
F	12	10		14	16		12	18	
Tamanho tumoral (cm)									
≤ 2	8	8	0.6766	8	13	0.4996	9	12	1.000
>2,1	6	3		8	7		7	8	
Metástase									
Sim	1	1	1.000	2	2	1.000	0	4	0.1131
Não	13	10		14	18		16	16	
Estadio									
I-II	13	8	0.2878	14	16	0.6722	14	16	0.6722
III-IV	1	3		2	4		2	4	
Evolução									
Sem recidiva	12	10	1.000	14	17	1.000	15	16	0.6129
Recidiva	2	1		2	3		1	4	

AE= alta expressão; BE= baixa expressão; p= p-valor referente ao teste exato de Fisher.

Tabela 4: Comparação entre a expressão de CD8, CD56 e GRAN B e os parâmetros clínico-patológicos nas lesões tireoideas malignas.

Biópsias com CPT (CPTH + CPTL+ CPTS) = 36 (N)									
CD8 = 36 (N)				CD56 = 36 (N)			GRAN B = 36 (N)		
	AE	BE	p	AE	BE	p	AE	BE	p
Idade (anos)									
≤ 45	7	13	0.0922	6	14	0.4932	4	16	0.1593
> 45	11	5		7	9		7	9	
SEXO									
M	4	2	0.6581	4	2	0.1608	1	5	0.6428
F	14	16		9	21		10	20	
Tamanho tumoral (cm)									
≤ 2	10	11	1.000	9	12	0.4837	9	12	0.4837
>2,1	8	7		4	11		4	11	
Metástase									
Sim	3	1	0.3377	1	3	1.000	1	3	1.000
Não	15	17		12	20		10	22	
Estadio									
I-II	14	16	0.6581	12	18	0.3854	11	19	0.1479
III-IV	4	2		1	5		0	6	
Evolução									
Sem recidiva	15	17	0.3377	11	21	1.000	10	22	1.000
Recidiva	3	1		2	2		1	3	

AE= alta expressão; BE= baixa expressão; p= p-valor referente ao teste exato de Fisher.

Apesar da avaliação dos CPT divididos segundo seus parâmetros clínico-patológicos não ter se apresentado significativo, analisando a média de células imunomarcadas de acordo com os mesmos parâmetros, mas separados em grupos, notamos que em CPTH as imunovariáveis CD4, CD8 e FOXP3 apresentaram maior marcação em tumores > 4,1 cm, quando comparados com esse mesmo parâmetro do grupo CPTS. Os casos de CPTH não metastáticos também apresentaram CD4, CD8 e FOXP3 com maior expressão em relação aos não metastáticos do grupo CPTS (Tabelas 5 e 7). Já para o CPTL, foi possível verificar infiltração mais intensa de linfócitos CD4+ e FOXP3 para os casos com recidiva, comparados aos do grupo CPTS.

Tabela 5: Distribuição da média de células imunomarcadas entre os parâmetros clínico-patológicos para CPTH

CPTH= 12 (N total)			MD					
Parâmetros clínicos		N	CD4	CD8	CD25	CD56	FOXP3	GranB
Sexo	M	2	65,25	127,43	18,00	3,37	66,03	2,96
	F	10	57,04	85,86	17,00	20,12	62,64	4,01
Idade	≤45	7	50,09	93,97	15,95	27,09	70,75	3,58
	>45	5	70,05	91,15	18,87	3,67	52,64	4,20
Tamanho tumor	≤ 2 cm	8	65,11	96,78	17,81	22,04	71,16	4,14
	2,1 a 4 cm	3	38,30	80,84	15,25	3,20	39,32	2,92
	> 4,1 cm	1	131,87	163,07	25,67	2,53	79,27	7,20
Metastase	Sim	1	8,58	8,78	8,27	2,00	15,27	1,07
	Não	11	62,94	100,43	17,98	18,72	67,56	4,09
Estadio	I-II	11	61,91	99,49	17,97	18,73	68,34	4,07
	III-IV	1	19,93	19,07	8,33	1,93	6,73	1,33
Evolução (recidiva)	Não	11	62,94	100,43	17,98	18,72	67,56	4,09
	Sim	1	8,58	8,78	8,27	2,00	15,27	1,07

MD=Média de Células marcadas; N= Número de casos

Tabela 6: Distribuição da média de células imunomarcadas entre os parâmetros clínico-patológicos para CPTL

CPTL= 12 (N total)			MD					
Parâmetros clínicos		N casos	CD4	CD8	CD25	CD56	FOXP3	GranB
Sexo	M	1	24,87	22,53	2,93	3,40	20,87	0,60
	F	11	12,22	14,67	14,67	2,91	8,60	0,94
Idade	≤45	6	14,51	11,41	7,49	2,08	7,25	0,60
	>45	6	13,08	19,24	8,06	3,81	12,00	1,22
Tamanho tumor	≤ 2 cm	8	10,95	15,55	8,78	3,41	8,80	1,09
	2,1 a 4 cm	4	22,33	14,88	5,77	2,02	11,27	0,55
	> 4,1 cm	0	-	-	-	-	-	-
Metastase	Sim	2	-	18,67	7,13	0,63	6,87	0,43
	Não	10	13,80	14,66	7,90	3,41	10,18	1,01
Estadio	I-II	9	12,53	13,70	7,93	3,28	9,42	1,01
	III-IV	3	17,60	20,22	7,31	1,96	10,22	0,62
Evolução (recidiva)	Não	10	12,22	14,01	7,89	3,15	8,54	1,00
	Sim	2	24,87	21,93	7,20	1,93	15,07	0,50

MD=Média de Células marcadas; N= Número de casos

Tabela 7: Distribuição da média de células imunomarcadas entre os parâmetros clínico-patológicos para CPTS

CPTS= 12 (N total)			MD					
Parâmetros clínicos		N casos	CD4	CD8	CD25	CD56	FOXP3	GranB
Sexo	M	3	-	7,27	1,47	2,70	3,77	0,73
	F	9	8,76	7,14	2,08	2,08	2,31	1,79
Idade	≤45	7	11,70	6,39	1,77	2,09	2,59	0,91
	>45	5	8,03	8,28	2,14	2,44	2,80	2,38
Tamanho tumor	≤ 2 cm	5	7,65	6,32	1,00	2,82	1,90	1,10
	2,1 a 4 cm	6	9,50	7,95	2,27	2,05	2,43	1,97
	> 4,1 cm	1	-	6,80	4,50	0,40	8,00	1,00
Metastase	Sim	1	11,50	14,50	6,00	2,90	2,10	6,50
	Não	11	8,08	6,51	1,55	2,17	2,73	1,07
Estadio	I-II	10	9,18	6,59	2,02	2,48	2,57	1,64
	III-IV	2	7,10	10,10	1,45	1,00	3,20	0,95
Evolução (recidiva)	Não	11	8,08	6,51	1,55	2,17	2,73	1,07
	Sim	1	11,50	14,50	6,00	2,90	2,10	6,50

MD=Média de Células marcadas; N= Número de casos

5.3- Expressão imunoistoquímica dos marcadores CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD56 e GRAN B

A quantidade de células marcadas para CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD56 e GRAN B foram comparadas entre os diferentes grupos levando em conta a distribuição das mesmas em relação a localização tumoral. Células positivas foram detectadas nas áreas intratumoral, peritumoral e distante.

A média de células marcadas e seus respectivos desvios padrões em cada grupo analisado podem ser vistas na Figura 2. Os linfócitos do microambiente tumoral apresentaram a média de marcação heterogênea nos diferentes grupos estudados, podendo verificar que a maior média foi para o CPTH.

Figura 3: Média de linfócitos marcados para CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD56 e GRAN B de acordo com o grupo analisado.

Em relação a expressão imunoistoquímica dos marcadores nas diferentes áreas para um mesmo grupo temos:

Área intratumoral

Nas análises de múltiplas comparações das médias de células marcadas na área intratumoral, foram encontradas diferenças significantes entre CPTH x CPTS para CD8 ($p= 0,0039$) e FOXP3 ($p= 0,0318$) e entre CPTH x CPTL para CD8. Observamos maior média de marcação de linfócitos CD8+ e FOXP3 + no microambiente intratumoral do CPT associado à TH em relação às lesões sem associação (CPTS). Linfócitos CD8+ também foram mais intensos em CPTH quando comparados aos CPTL. (Tabela 8)

Tabela 8: Distribuição da média de células intratumorais marcadas por CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD56 e GRAN B entre os diferentes grupos de CPT.

Grupo/área	Marcador	Média	Desvio padrão	Limite inferior	Limite superior
CPTH/ Intratumoral	CD4	,695	,140	,400	,989
	CD8	1,319	,129	1,051	1,587
	CD25	,330	,163	-,009	,668
	CD56	-,085	,197	-,494	,324
	FOXP3	1,018	,144	,719	1,317
	GRAN B	-,199	,132	-,472	,074
CPTL/ Intratumoral	CD4	,434	,172	,074	,795
	CD8	,623	,129	,355	,891
	CD25	,145	,163	-,193	,484
	CD56	-,125	,197	-,534	,283
	FOXP3	,265	,144	-,034	,564
	GRAN B	-,479	,132	-,752	-,205
CPTS/ Intratumoral	CD4	,968	,204	,544	1,392
	CD8	,548	,125	,294	,801
	CD25	-,011	,145	-,306	,283
	CD56	,022	,173	-,330	,375
	FOXP3	,053	,139	-,231	,336
	GRAN B	-,003	,127	-,261	,254

Tabela 9: Comparação da média de expressão quantitativa do CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD56 e GRAN B da área intratumoral entre os diferentes grupos.

Marcadores	Valor p (ANOVA)	Comparações	Intervalo de confiança 95%	
			Limite inferior	Limite superior
CD4 = 25 (N)	0,3984	CPTH - CPTL	-	-
		CPTH - CPTS	-	-
		CPTL - CPTS	-	-
CD8 = 36 (N)	0,0039	CPTH - CPTL	7,14	58,21
		CPTH - CPTS	7,26	58,34
		CPTL - CPTS	-25,41	25,66
CD25 = 36 (N)	0,2453	CPTH - CPTL	-	-
		CPTH - CPTS	-	-
		CPTL - CPTS	-	-

CD56 =36 (N)	0,4143	CPTH - CPTL	-	-
		CPTH - CPTS	-	-
		CPTL - CPTS	-	-
FOXP3 =36 (N)	0,0318	CPTH - CPTL	-1,187	33,237
		CPTH - CPTS	0,305	34,728
		CPTL - CPTS	-15,720	18,703
GRAN B =36 (N)	0,4381	CPTH - CPTL	-	-
		CPTH - CPTS	-	-
		CPTL - CPTS	-	-

Análise ANOVA-oneway, com pré-teste de homogeneidade de variância de Levene e pós-teste de comparações múltiplas de Tukey

Figura 4: Distribuição da densidade de células intratumorais marcadas por anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-CD56, anti-FOXP3 e anti- Gran B entre os grupos CPTH, CPTL e CPTS.

Área peritumoral

Nas análises de múltiplas comparações das médias de células marcadas na área peritumoral, foram encontradas diferenças significantes entre CPTH x CPTS para todos os marcadores (CD4, CD8, CD 25, FOXP3 e GRAN B), exceto o CD56 que não apresentou significância em nenhuma das

comparações. Na comparação CPTH x CPTL foi encontrada diferença significativa para os marcadores CD8, FOXP3 e GRAN B e entre CPTL x CPTS para CD25.

Tabela 10: Distribuição da média de células peritumorais marcadas por CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD56 e GRAN B entre os diferentes grupos de CPT.

Grupo/área	Marcador	Média	Desvio padrão	Limite inferior	Limite superior
CPTH/ peritumoral	CD4	1,599	,073	1,446	1,753
	CD8	1,962	,087	1,782	2,143
	CD25	1,196	,100	,988	1,403
	CD56	,823	,166	,479	1,167
	FOXP3	1,661	,144	1,363	1,959
	GRAN B	,488	,113	,254	,722
CPTL/ peritumoral	CD4	1,312	,089	1,125	1,500
	CD8	1,399	,087	1,218	1,579
	CD25	,909	,100	,702	1,116
	CD56	,527	,166	,183	,872
	FOXP3	,978	,144	,680	1,276
	GRAN B	,012	,113	-,222	,246
CPTS/ peritumoral	CD4	,765	,113	,532	,999
	CD8	,746	,112	,518	,974
	CD25	,194	,112	-,033	,421
	CD56	,270	,160	-,056	,595
	FOXP3	,244	,151	-,064	,552
	GRAN B	,037	,107	-,181	,255

Tabela 11: Comparação da média de expressão quantitativa do CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD56 e GRAN B da área peritumoral entre os diferentes grupos.

Marcadores	Valor p (ANOVA)	Comparações	Intervalo de confiança 95%	
			Limite inferior	Limite superior
CD4 = 25 (N)	0,0043	CPTH - CPTL	-0,335	50,318
		CPTH - CPTS	11,686	70,757
		CPTL - CPTS	-15,403	47,863
CD8 = 36 (N)	0,0001	CPTH - CPTL	46,04	136,43
		CPTH - CPTS	64,69	155,08
		CPTL - CPTS	-26,54	63,84
CD25 =36 (N)	0,0001	CPTH - CPTL	-0,476	12,143
		CPTH - CPTS	8,407	21,026
		CPTL - CPTS	2,574	15,193
CD56 =36 (N)	0,2618	CPTH - CPTL	-	-
		CPTH - CPTS	-	-
		CPTL - CPTS	-	-
FOXP3 =36 (N)	0,0001	CPTH - CPTL	22,933	66,967
		CPTH - CPTS	35,533	79,567
		CPTL - CPTS	-9,417	34,617
GRAN B =36 (N)	0,0113	CPTH - CPTL	0,1927	4,9740
		CPTH - CPTS	0,4260	5,2073
		CPTL - CPTS	-2,1573	2,6240

Análise ANOVA-oneway, com pré-teste de homogeneidade de variância de Levene e pós-teste de comparações múltiplas de Tukey

Figura 5: Distribuição da densidade de células peritumorais marcadas por anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-CD56, anti-FOXP3 e anti- Gran B entre os grupos CPTH, CPTL e CPTS.

Área distante

Nas análises de múltiplas comparações das médias de células marcadas na área distante, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre CPTH x CPTL para todos os marcadores (CD4, CD8, CD 25, FOXP3 e GRAN B), exceto o CD56 que não apresentou significância estatística. Os CPTH por apresentarem centros germinativos formados por inúmeros linfócitos, que não são vistos no CPTL, apresentaram a média de linfócitos marcados mais intensa.

Tabela12: Distribuição da média de células distantes marcadas por CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD56 e GRAN B entre os diferentes grupos de CPT.

Grupo/área	Marcador	Média	Desvio padrão	Limite inferior	Limite superior
CPH/distante	CD4	1,945	,113	1,708	2,181
	CD8	1,935	,141	1,641	2,228
	CD25	1,385	,112	1,153	1,616
	CD56	,175	,177	-,191	,541
	FOXP3	1,950	,127	1,688	2,213
	GRAN B	,539	,121	,287	,791
CPTL/distante	CD4	1,064	,138	,775	1,354
	CD8	,941	,141	,648	1,234
	CD25	,776	,112	,545	1,008
	CD56	,052	,177	-,314	,418
	FOXP3	,779	,127	,517	1,042
	GRAN B	-,322	,121	-,574	-,070

Tabela 13: Comparação da média de expressão quantitativa do CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD56 e GRAN B da área distante entre os diferentes grupos.

Marcadores	Valor p	Comparações	Intervalo de confiança 95%	
			Limite inferior	Limite superior
CD4 = 25 (N)	0,001	CPH - CPTL	46,8642	157,6
CD8 = 36 (N)	0,001	CPH - CPTL	61,4277	155,5
CD25 =36 (N)	0,0001	CPH - CPTL	8,4040	29,3293
CD56 =36 (N)	0,46	CPTL - CPH	-15,8820	43,6153
FOXP3 =36 (N)	0,0001	CPH - CPTL	65,9639	133,6
GRAN B =36 (N)	0,001	CPH - CPTL	2,0512	7,7821

Teste t para amostras independentes.

Figura 6: Distribuição da densidade de células distantes marcadas por anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-CD56, anti-FOXP3 e anti- Gran B entre os grupos CPTH e CPTL.

Em relação a expressão imunoistoquímica dos marcadores entre os diferentes grupos, a tabela 14 demonstra as áreas de maior concentração de células marcadas.

Tabela 14: Distribuição das áreas de maior concentração de células marcadas entre os grupos.

	CPTH	CPTL	CPTS
CD4	Distante	Peritumoral	X
CD8	Peritumoral	Peritumoral	X
CD25	Distante	Peritumoral	X
CD56	Peritumoral	Peritumoral	X
FOXP3	Distante	Peritumoral	X
Gran B	Peri/Distante	Peritumoral	X

X= Não há diferença

Figura 7: Expressão imunoistoquímica de CD8 no CPTH nas diferentes áreas estudadas. A- Fotomicrografia do caso de CPTH com a demarcação das áreas 1 (intratumoral), 2 (peritumoral) e 3 (distante), posteriormente detalhadas (40x). B- Fotomicrografia da área 1 (intratumoral), (400x). C- Fotomicrografia da área 2 (peritumoral), (400X) e D- Fotomicrografia da área 3 (distante), (200x).

Figura 8: Expressão imunoistoquímica de CD4 no CPTH nas diferentes áreas estudadas. A- Fotomicrografia do caso de CPTH com a demarcação das áreas 1 (intratumoral), 2 (peritumoral) e 3 (distante), posteriormente detalhadas (40x). B- Fotomicrografia da área 1 (intratumoral), (400x). C- Fotomicrografia da área 2 (peritumoral), (400X) e D- Fotomicrografia da área 3 (distante), (200x).

Em geral, no CPTH verificamos maior concentração de células CD4+, CD25+ e FOXP3+ nas áreas distantes. Nessa área concentra-se a TH com seus centros germinativos, aonde a infiltração de linfócitos foi mais intensa em relação as outras áreas analisadas (intratumoral e peritumoral). Esses marcadores caracterizam os linfócitos Tregs. Células Gran B+ ficaram sem área de maior concentração, estando distribuídas entre peritumoral e distante homogeneamente. Enquanto a quantidade de células Gran B+ (CTLs) é semelhante entre as áreas peritumoral e distante, células CD56+ estão mais expressas na região peritumoral (NKs). Esse dado mostra que os CTLs estão mais concentrados na região distante pois nesta, CD56 está menos expresso. Na região peritumoral encontra-se mais células NKs que também expressam Gran B constitutivamente. Para o CPTL nota-se maior expressão de células marcadas na área peritumoral que foi a região de maior concentração linfocítica

das amostras histológicas. A média de linfócitos Tregs e CTLs foi menor em relação ao CPTH, mas se concentrou nas áreas de parênquima tireoidiano de interface ao tecido neoplásico, aonde geralmente localiza-se a tireoidite linfocítica. Como o CPTS não possui quantidades significativas de infiltrado linfocítico, não houve diferença de concentração de imunomarcacão entre as áreas, de maneira que a distribuição dos linfócitos se mostrou homogênea entre as áreas intra e peritumoral.

Figura 9: Representação gráfica da imunomarcacão das variáveis imunológicas (CD4, CD8, CD25, CD56, FOXP3, Granzima B) dos grupos (CPTH, CPTL, CPTS) nas diferentes áreas estudadas (intratumoral, peritumoral e distante).

Considerando o tempo médio de segmento de pouco mais de 4 anos como baixo e levando em consideração que o CPT é uma doença de comportamento indolente e que pode recidivar em até 10 a 20 anos após o tratamento inicial(48, 49) e também o fato de nenhum paciente da amostra ter vindo a óbito pela doença, não realizamos a análise relacionando o microambiente tumoral ou marcadores imunoistoquímicos e sobrevida.

5.6- Análise de correlação entre CD4 x CD8 e FOXP3 x Gran B

Para avaliar se havia alguma relação entre a expressão de CD4 com a expressão de CD8 nos CPT associados ou não com tireoidites, realizamos uma análise de correlação entre a média da densidade das células marcadas por essas duas imunovariáveis nos diferentes grupos. Verificamos correlação positiva mais próxima de 1 nos grupos CPTH (coeficiente de correlação Pearson = 0,67) e CPTL (coeficiente de correlação Pearson = 0,7). Esses dados mostram que conforme a expressão de CD4 aumentava, a expressão de CD8 se correlacionava de maneira crescente. No CPTS (coeficiente de correlação Pearson = 0,35) a correlação, apesar de positiva, apresentou tendência a ficar com valor mais próximo de zero, que representa uma menor magnitude de correlação (Figura 9).

Figura 10: Gráficos de dispersão da análise de correlação entre a expressão de CD4 e CD8 nos diferentes grupos.

Para a relação entre FOXP3 e Gran B verificamos no grupo CPTH correlação positiva mais próxima de 1 (coeficiente de correlação Pearson = 0,63) de maneira que a expressão entre as imunovariáveis se correlacionou de maneira crescente. No CPTL (coeficiente de correlação Pearson = 0,49) foi possível observar menor magnitude de correlação positiva. Para o grupo CPTS (coeficiente de correlação Pearson = 0) não houve correlação entre FOXP3 e Gran B (Figura).

Figura 11: Gráficos de dispersão da análise de correlação entre a expressão de FOXP3 e Gran B nos diferentes grupos.

6- DISCUSSÃO

A incidência de câncer da glândula tireoide é a que mais vem crescendo nas últimas décadas. Dentro desse grupo, de diferentes neoplasias, o carcinoma papilífero, um dos carcinomas bem diferenciados, representa a maioria e tem prognóstico favorável, com sobrevida acima de 90% em 5 anos. Embora sejam utilizadas diversas classificações de risco baseadas em diferentes fatores prognósticos, ainda não se consegue prever quais pacientes terão maior chance de recorrência, metástases linfonodais e desfecho desfavorável, que se beneficiariam de um tratamento mais agressivo. Já foi demonstrado em diversos tipos de neoplasias que diferenças no perfil do infiltrado imune tumoral têm relação com prognóstico e resposta ao tratamento. Neste estudo caracterizou-se o microambiente imune do carcinoma papilífero através de marcadores imunoistoquímicos de células inflamatórias e relacionou-se esse perfil de infiltração com fatores prognósticos clínico-patológicos. Nós focamos na infiltração de Tregs e CTLs em diferentes regiões do tumor e também a comparamos entre amostras de CPT e associados ou não com tireoidites de Hashimoto e linfocítica.

A idade do paciente é apontada como o fator prognóstico de maior impacto na sobrevida do carcinoma diferenciado de tireoide, piorando

progressivamente a partir dos 40 anos. As taxas de recorrência variam de 20% -40%, sendo maior nos extremos de idade (menores que 10 anos e maiores que 60 anos)(50). Em nossa casuística, dos 36 casos, 4(11,1%) apresentaram recorrência e a média das idades foi de 55 anos (variação 44 - 70 anos).

Em uma das primeiras publicações a demonstrar o potencial prognóstico dos TILs em CPT, foi demonstrado que a presença destes linfócitos reduziu o risco de recorrência(51). De modo semelhante, um estudo de imunomarcadores em TMA mostrou que o infiltrado linfocitário no tumor e tireoidite linfocítica estão relacionados com prognóstico mais favorável, e que a tireoidite parece influenciar o microambiente imune dos CPT(52). Algumas publicações que não levaram em conta as diferentes subpopulações celulares não conseguiram demonstrar esta relação, talvez por não considerarem a ativação dessas células no microambiente tumoral, podendo se tornar pró ou antitumorais em sua atividade(42, 53). Em nosso estudo, caracterizamos o perfil do infiltrado linfocitário para Tregs e CTLs utilizando respectivamente os marcadores CD4, CD25 e FOXP3 e CD8, CD56 e Gran B e como a tireoide é um órgão onde o infiltrado linfocitário é bastante prevalente e consequentemente a análise da densidade e subpopulações de linfócitos seria impactada, dividimos nossa casuística separando os casos de CPT sem associação com tireoidite (CPTS) dos casos, onde o CPT estava associado com tireoidites de Hashimoto (CPTH) e linfocítica (CPTL), permitindo assim uma melhor análise dos linfócitos no microambiente imune.

A relação entre doenças tireoidianas autoimunes e câncer de tireoide, particularmente o CPT, vem sendo frequentemente estudada, mas como alvo de debates. Acredita-se que pacientes com tireoidite linfocítica crônica tenham maior risco de desenvolver CPT(54). Kim et al.(55), mostraram que a presença de TH associada ao CPT é um fator preditivo independente para metástases linfonodais. Um outro estudo, de Jeong et al.(56), analisou um grupo de 1357 CPTs e descreveu que pacientes com TLC eram mais jovens, predominantemente mulheres e com tendência a ter tumores menores. Entretanto, a TLC não foi um fator independente significativo de bom prognóstico. Corroborando com esses dados, em nosso estudo, apesar da presença de tireoidites de Hashimoto e linfocítica associadas ao CPT não

apresentarem relação com tamanho tumoral e evolução do tumor, sendo assim consideradas fatores de bom prognóstico, verificamos que no grupo CPTH, tumores maiores foram mais infiltrados por linfócitos CD4+ e FOXP3+, e no grupo CPTL, tumores que evoluíram para recidiva apresentaram infiltração mais intensa de linfócitos CD4+ e FOXP3+.

Geralmente, para se determinar o efeito dos TILs no microambiente tumoral *in vivo* usa-se a quantificação dessas células e a comparação com características tumorais, de prognóstico e sobrevida. Para analisar dados já publicados, Gooden et al.(57), realizaram uma revisão sistemática sobre o papel dos TILs em diferentes tipos de carcinomas que incluiu 52 estudos e uma metanálise com 33 estudos. Estes autores encontraram um papel prognóstico moderado desempenhado pelos TILs que, no entanto se torna mais pronunciado quando analisadas as relações de diferentes subtipos deles, como CD8+/CD4+, CD8+/FOXP3+ ou CD3+/CD8+. Em nosso estudo, a correlação de células CD4+/CD8+ apresentou-se positiva, de maneira crescente para os grupos onde o CPT estava associado com tireoidites (CPTH e CPTL). Assim, não foi possível caracterizá-las com seus efeitos prognósticos esperados, aonde Tregs (CD4+) com papel pró-tumoral, favoreceria tumores mais agressivos e maiores e CTLs (CD8+) com papel antitumoral, favoreceria características tumorais menos agressivas.

A composição de TILs foi estudada por Modi e colaboradores que mostraram que 43% de 21 casos de CPT possuíam células CD4+ (linfócitos T auxiliares), 38% possuíam células CD8+ (linfócitos T citotóxicos), 48% possuíam células CD19+ (linfócitos B) e somente 1 caso (5%) continha células CD56+ (linfócitos NK)(58). Gupta e col. mostraram que a proliferação de TILs é associada ao aumento do tempo livre de doença em crianças e adultos jovens com câncer de tireoide(51). Porém o baixo número de amostras e curto tempo de seguimento limitaram as conclusões destes estudos. Ugolini et al., embora não encontrando significância entre a extensão do infiltrado linfocitário com o prognóstico esperado de diferentes variantes do CPT, demonstraram que os tumores de tireoide com pior prognóstico apresentaram diminuição do infiltrado de linfócitos tumorais(42). Em nosso trabalho, não reconhecemos relação direta entre a extensão do infiltrado linfocitário e o

prognóstico dos diferentes grupos do CPT, mas foi possível verificar que tumores mais extensos do CPTH foram definitivamente caracterizados por aumento marcante da infiltração de linfócitos FOXP3+ (Tregs). Posteriormente, French et al. encontraram que a presença de TILs em CPT foi associada à maior agressividade tumoral(59). Encontraram ainda, que a infiltração de linfócitos FOXP3+ estava correlacionada com a presença de metástases linfonodais, sugerindo que a infiltração de tais células conferisse pior prognóstico aos pacientes. Para esse trabalho, entretanto, vale destacar que dos 100 casos de CPT estudados, apenas 10 foram avaliados quanto ao tipo de linfócito infiltrante. De acordo com esses dados e corroborando com os acima apresentados, podemos sugerir que as células Tregs têm uma relação direta em tumores invasivos, podendo afetar o desenvolvimento e a progressão de tumor metastático.

Diferentes publicações sobre microambiente tumoral apresentam muitas controvérsias. Cunha et al.(43), demonstraram o impacto prognóstico do infiltrado de células FOXP3 de forma contrária, aonde um maior infiltrado desses linfócitos associou-se a tumores menores e sem extensão extratireoidiana. O mesmo grupo, em outro estudo utilizando TMA relatou associação inversa entre linfócitos FOXP3+ e multifocalidade, contrário ao esperado pelo papel que geralmente desempenham no microambiente(60). Em nossos resultados, apesar de não significativo, foi favorecido que, pelo menos na fase de crescimento e progressão, o carcinoma papilífero de tireoide associado com tireoidite de Hashimoto foi positivamente influenciado pelos componentes inflamatórios das células T citotóxicas (CD8+) presentes no estroma do tumor (intratumoral) que favoreceram o efeito antitumoral (maior expressão em tumores não metastáticos, de estadio menores e que não apresentaram recidiva). Outros fatores influentes foram dependentes das células T regulatórias (FOXP3+), que favoreceram o efeito pró-tumoral (maior expressão em tumores de maior extensão).

Levando em conta que a metodologia aplicada nos estudos é bastante heterogênea e muitas vezes incapaz de abordar os vários aspectos do complexo processo sistema imune e tumor ainda, há muito a ser esclarecido, especialmente sobre os diferentes papéis que as células imunes podem

assumir de acordo com os diferentes fatores regulatórios locais não completamente elucidados. Em relação ao CPT, como visto, essa heterogeneidade reflete o quanto ainda se tem para percorrer na busca de uma compreensão mais precisa do microambiente imune, reforçando a insistência em aprofundar análises do infiltrado imune e seu papel prognóstico e possivelmente terapêutico.

7 - CONCLUSÃO

Neste estudo, caracterizamos o perfil do infiltrado de linfócitos T regulatórios (CD4, CD25 e FOXP3) e T citotóxicos (CD8, CD56 e Gran B) em carcinomas papilíferos de tireoide associados ou não a tireoidites significativas (Hashimoto e linfocítica) e verificamos que existe uma resposta imunológica contra o CPT capaz de exercer papel antitumoral.

Nossos dados mostraram que em geral, a densidade do infiltrado inflamatório de células Tregs e CTLs em CPT parece interferir nas características anátomo-patológicas do tumor. Casos com maior infiltração tumoral e tireoidea de Tregs apresentaram-se em tumores maiores dos CPTs associados à TH (CPTH), inferindo resposta pró-tumoral (maior agressividade) desses linfócitos. Já a presença de infiltração de linfócitos CTLs (CD8+) em CPTH associou-se a características de menor progressão tumoral (maior expressão em tumores não metastáticos, de estadio menores e que não apresentaram recidiva), ainda que nenhuma dessas variáveis fosse considerada como fator de melhor prognóstico e evolução clínica dos pacientes.

REFERÊNCIAS

INCA. Instituto Nacional do Câncer. 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 12 julho 2017

1. Ortega J, Sala C, Flor B, Lledo S. Efficacy and cost-effectiveness of the UltraCision harmonic scalpel in thyroid surgery: an analysis of 200 cases in a randomized trial. *Journal of laparoendoscopic & advanced surgical techniques Part A*. 2004;14(1):9-12.
2. Lloyd RV, Erickson LA, Casey MB, Lam KY, Lohse CM, Asa SL, et al. Observer variation in the diagnosis of follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 2004;28(10):1336-40.
3. Ito Y, Miyauchi A, Inoue H, Fukushima M, Kihara M, Higashiyama T, et al. An observational trial for papillary thyroid microcarcinoma in Japanese patients. *World journal of surgery*. 2010;34(1):28-35.
4. White MG, Cipriani NA, Abdulrasool L, Kaplan S, Aschebrook-Kilfoy B, Angelos P, et al. Radiation-Induced Differentiated Thyroid Cancer Is Associated with Improved Overall Survival but Not Thyroid Cancer-Specific Mortality or Disease-Free Survival. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2016;26(8):1053-60.
5. Omry-Orbach G. Risk Stratification in Differentiated Thyroid Cancer: An Ongoing Process. *Rambam Maimonides medical journal*. 2016;7(1).
6. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2016;26(1):1-133.
7. Liotti F, Visciano C, Melillo RM. Inflammation in thyroid oncogenesis. *American journal of cancer research*. 2012;2(3):286-97.
8. Ehlers M, Schott M. Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid cancer: are they immunologically linked? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2014;25(12):656-64.
9. Swann JB, Vesely MD, Silva A, Sharkey J, Akira S, Schreiber RD, et al. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting

during primary tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(2):652-6.

10. Zwirner NW, Croci DO, Domaica CI, Rabinovich GA. Overcoming the hurdles of tumor immunity by targeting regulatory pathways in innate and adaptive immune cells. *Current pharmaceutical design*. 2010;16(3):255-67.

11. Liu W, Peng B, Lu Y, Xu W, Qian W, Zhang JY. Autoantibodies to tumor-associated antigens as biomarkers in cancer immunodiagnosis. *Autoimmunity reviews*. 2011;10(6):331-5.

12. Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2012;23 Suppl 8:viii6-9.

13. Bhatia A, Kumar Y. Cellular and molecular mechanisms in cancer immune escape: a comprehensive review. *Expert review of clinical immunology*. 2014;10(1):41-62.

14. Whiteside TL. Immune responses to malignancies. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S272-83.

15. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annual review of immunology*. 2004;22:329-60.

16. Professor Virchow on Medical Education. *British medical journal*. 1896;1(1840):873.

17. Yaquib S, Aandahl EM. Inflammation versus adaptive immunity in cancer pathogenesis. *Critical reviews in oncogenesis*. 2009;15(1-2):43-63.

18. Wong MP, Cheung KN, Yuen ST, Fu KH, Chan AS, Leung SY, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression in primary lymphoepithelioma-like carcinomas (LELCs) of the lung. *The Journal of pathology*. 1998;186(4):372-7.

19. Lumachi F, Basso SM, Orlando R. Cytokines, thyroid diseases and thyroid cancer. *Cytokine*. 2010;50(3):229-33.

20. Benchetrit F, Gazagne A, Adotevi O, Haicheur N, Godard B, Badoual C, et al. [Cytotoxic T lymphocytes: role in immunosurveillance and in immunotherapy]. *Bulletin du cancer*. 2003;90(8-9):677-85.

21. Aerts JG, Hegmans JP. Tumor-specific cytotoxic T cells are crucial for efficacy of immunomodulatory antibodies in patients with lung cancer. *Cancer research*. 2013;73(8):2381-8.

22. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *The New England journal of medicine*. 2012;366(26):2455-65.
23. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *Journal of immunology*. 2001;167(3):1137-40.
24. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International immunology*. 2009;21(10):1105-11.
25. Yamanishi T, Chikamatsu K, Takahashi G, Endo S, Masuyama K. Immune regulation by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with Japanese cedar pollinosis. *International archives of allergy and immunology*. 2011;156(2):187-95.
26. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology*. 2005;6(4):345-52.
27. Wang YM, Ghali J, Zhang GY, Hu M, Wang Y, Sawyer A, et al. Development and function of Foxp3(+) regulatory T cells. *Nephrology*. 2016;21(2):81-5.
28. Sharma R, Kinsey GR. Regulatory T cells in Acute and Chronic Kidney Diseases. *American journal of physiology Renal physiology*. 2017:ajprenal 00236 2017.
29. Zaletel K, Gaberscek S. Hashimoto's Thyroiditis: From Genes to the Disease. *Current genomics*. 2011;12(8):576-88.
30. Mikos H, Mikos M, Obara-Moszyńska M, Niedziela M. The role of the immune system and cytokines involved in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease (AITD). *Endokrynologia Polska*. 2014;65(2):150-5.
31. Lee HS, Hwang JS. The natural course of Hashimoto's thyroiditis in children and adolescents. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*. 2014;27(9-10):807-12.
32. Benvenga S. Update on thyroid cancer. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2008;40(5):323-8.

33. Nam SY, Shin JH, Ko EY, Hahn SY. A comparison of lymphocytic thyroiditis with papillary thyroid carcinoma showing suspicious ultrasonographic findings in a background of heterogeneous parenchyma. *Ultrasonography*. 2015;34(1):45-50.
34. Noureldine SI, Tufano RP. Association of Hashimoto's thyroiditis and thyroid cancer. *Current opinion in oncology*. 2015;27(1):21-5.
35. Strauss M, Laurian N, Antebi E. Coexistent carcinoma of the thyroid gland and Hashimoto's thyroiditis. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1983;157(3):228-32.
36. Pisanu A, Piu S, Cois A, Uccheddu A. Coexisting Hashimoto's thyroiditis with differentiated thyroid cancer and benign thyroid diseases: indications for thyroidectomy. *Chirurgia italiana*. 2003;55(3):365-72.
37. Ahn D, Heo SJ, Park JH, Kim JH, Sohn JH, Park JY, et al. Clinical relationship between Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid cancer. *Acta oncologica*. 2011;50(8):1228-34.
38. Cipolla C, Sandonato L, Graceffa G, Fricano S, Torcivia A, Vieni S, et al. Hashimoto thyroiditis coexistent with papillary thyroid carcinoma. *The American surgeon*. 2005;71(10):874-8.
39. Guarino V, Castellone MD, Avilla E, Melillo RM. Thyroid cancer and inflammation. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;321(1):94-102.
40. Okayasu I. The Relationship of Lymphocytic Thyroiditis to the Development of Thyroid Carcinoma. *Endocrine pathology*. 1997;8(3):225-30.
41. Kebebew E, Treseler PA, Ituarte PH, Clark OH. Coexisting chronic lymphocytic thyroiditis and papillary thyroid cancer revisited. *World journal of surgery*. 2001;25(5):632-7.
42. Ugolini C, Basolo F, Proietti A, Vitti P, Elisei R, Miccoli P, et al. Lymphocyte and immature dendritic cell infiltrates in differentiated, poorly differentiated, and undifferentiated thyroid carcinoma. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2007;17(5):389-93.
43. Cunha LL, Morari EC, Nonogaki S, Soares FA, Vassallo J, Ward LS. Foxp3 expression is associated with aggressiveness in differentiated thyroid carcinomas. *Clinics*. 2012;67(5):483-8.
44. American Thyroid Association Guidelines Taskforce on Thyroid N, Differentiated Thyroid C, Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, et al.

Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2009;19(11):1167-214.

45. Gao Q, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Wang XY, Xiao YS, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(18):2586-93.

46. Shaha AR. TNM classification of thyroid carcinoma. *World journal of surgery*. 2007;31(5):879-87.

47. Ward LS, Assumpcao LV. [Thyroid cancer: prognostic factors and treatment]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2004;48(1):126-36.

48. Nixon IJ, Ganly I, Patel SG, Palmer FL, Whitcher MM, Tuttle RM, et al. Thyroid lobectomy for treatment of well differentiated intrathyroid malignancy. *Surgery*. 2012;151(4):571-9.

49. Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Patterns of failure in differentiated carcinoma of the thyroid based on risk groups. *Head & neck*. 1998;20(1):26-30.

50. Tuttle RM, Ball DW, Byrd D, Dilawari RA, Doherty GM, Duh QY, et al. Thyroid carcinoma. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2010;8(11):1228-74.

51. Gupta S, Patel A, Folstad A, Fenton C, Dinauer CA, Tuttle RM, et al. Infiltration of differentiated thyroid carcinoma by proliferating lymphocytes is associated with improved disease-free survival for children and young adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(3):1346-54.

52. Cunha LL, Morari EC, Guihen AC, Razolli D, Gerhard R, Nonogaki S, et al. Infiltration of a mixture of different immune cells may be related to molecular profile of differentiated thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*. 2012;19(3):L31-6.

53. Ryder M, Ghossein RA, Ricarte-Filho JC, Knauf JA, Fagin JA. Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*. 2008;15(4):1069-74.

54. Holm LE, Blomgren H, Lowhagen T. Cancer risks in patients with chronic lymphocytic thyroiditis. *The New England journal of medicine*. 1985;312(10):601-4.

55. Kim SS, Lee BJ, Lee JC, Kim SJ, Jeon YK, Kim MR, et al. Coexistence of Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma: the influence of lymph node metastasis. *Head & neck*. 2011;33(9):1272-7.
56. Jeong JS, Kim HK, Lee CR, Park S, Park JH, Kang SW, et al. Coexistence of chronic lymphocytic thyroiditis with papillary thyroid carcinoma: clinical manifestation and prognostic outcome. *Journal of Korean medical science*. 2012;27(8):883-9.
57. Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *British journal of cancer*. 2011;105(1):93-103.
58. Modi J, Patel A, Terrell R, Tuttle RM, Francis GL. Papillary thyroid carcinomas from young adults and children contain a mixture of lymphocytes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(9):4418-25.
59. French JD, Weber ZJ, Fretwell DL, Said S, Kloppper JP, Haugen BR. Tumor-associated lymphocytes and increased FoxP3+ regulatory T cell frequency correlate with more aggressive papillary thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(5):2325-33.
60. Cunha LL, Marcello MA, Morari EC, Nonogaki S, Conte FF, Gerhard R, et al. Differentiated thyroid carcinomas may elude the immune system by B7H1 upregulation. *Endocrine-related cancer*. 2013;20(1):103-10.

Anexo

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 11 de outubro de 2016.

Ofício nº 3437/2016
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 8367/2016

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **"AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO CONTROLE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CARCINOMA PAPILÍFERO DA TIREOIDE E SUA ASSOCIAÇÃO COM A TIREOIDITE DE HASHIMOTO"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 438ª Reunião Ordinária realizada em 10/10/2016, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como a solicitação de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA

Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

DENISE FARIA GALANO CARVALHO

PROF. DR. EDSON GARCIA SOARES (Orientador)

Depto. de Patologia e Medicina Legal

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br