Ana Karina de Melo Bezerra Sodré

Expressão do simportador sódio-iodo (NIS) nos
tumores tireoidianos benignos e malignos através
de estudo imunohistoquímico e da quantificação
do RNA mensageiro

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Endocrinologia
Orientadora: Dra Rosalinda Yossie Asato de Camargo

São Paulo
2006

Aos meus amores: Gregório, Júlia e minha família

AGRADECIMENTOS

Ao longo dos quatro anos e meio desta tese, tive a grande felicidade de contar com muitos, a quem hoje não posso chamar de colaboradores, mas sim de amigos, pois compartilharam comigo o meu sonho e me ajudaram a realizá-lo.

A Deus que guia todos os passos da minha vida, por ter me dado saúde, força e perseverança para conseguir concluir esta tese de doutorado.

Ao meu marido, pelo apoio e compreensão durante todo o decorrer da tese e nos longos momentos de minha ausência em casa, mas sobretudo por seu amor.

À minha filha amada Júlia, por ser minha inspiração e me dar novo ânimo, a cada dia, com sua alegria e amor.

À minha mãe, por ter sempre uma palavra de apoio, por seu amor incondicional e por cuidar da minha filha com tanto zelo, em todos os longos períodos de minha ausência em casa.

À minha família pelo seu apoio e incentivo em concluir esta tese.

À Dra Rosalinda, minha orientadora, a qual admiro bastante por sua simplicidade e também como pessoa e profissional, pela sua amizade, paciência, apoio e pelas sugestões valiosas ao longo de todo o desenvolvimento da tese.

À Ileana, minha co-orientadora do dia-a-dia, por ter me apresentado ao mundo da biologia molecular, pela amizade, carinho, dedicação e pela contribuição sem tamanho em todas as etapas desta tese.

Ao Dr Eduardo, pela ajuda inestimável, pelas inúmeras sugestões e orientações.

Ao Prof. Dr Geraldo Medeiros-Neto, por ter tornado esta tese possível e por ter aberto muitas "portas" para mim ao longo destes anos de convívio.

Ao Prof. Dr. Meyer Knobel por permitir a realização desta tese.

À Ana Luíza, por sua imensa ajuda na quantificação do RNA mensageiro do NIS.

Ao Prof. Dr. Venâncio Avancini e Cristina Kanamura, por terem ajudado na realização e interpretação das imuno-histoquímicas.

Ao Prof. Dr. Carlos Buchipiguel e Dra Tomoco Watanabe por ajudarem na realização das cintilografias.

Aos cirurgiões, Dr. Celso Friguglietti e Dr Marco Kulcsar, pela atenção e colaboração, fundamentais, para realização desta tese .

Ao Dr. Jonh Morris pela doação do anticorpo anti-NIS.

À Andréa por sua ajuda no contato com os pacientes.

À Sílvia e Jacira pelo auxílio no manejo das iodúrias.

Aos pacientes por aceitarem participar deste trabalho.

Às animadas meninas do LIM 25, pelos nossos agradáveis momentos no laboratório.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Tudo posso naquele que me fortalece

Filipenses 4, versículo 13

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.*

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

Sumário

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Estrutura e propriedades da proteína NIS.....	02
1.2 Biogênese e localização subcelular do NIS.....	04
1.3 Família da proteína NIS.....	05
1.4 Aspectos fisiológicos do NIS.....	05
1.5 NIS em doença tireoidiana auto-imune.....	07
1.6 NIS em hipotireoidismo congênito.....	08
1.7 NIS em outros tecidos.....	09
1.8 Regulação da expressão e função do NIS.....	10
1.8.1 TSH.....	10
1.8.2 Fosforilação do NIS.....	11
1.8.3 Regulação do NIS pelo iodo.....	12
1.8.4 Tireoglobulina.....	13
1.9 NIS em tumores de tireóide.....	14
2 OBJETIVOS.....	21
3. MÉTODOS.....	22
3.1 Protocolo de atendimento clínico.....	22
3.2 Determinação do TSH, T3, T4 total, T4 livre, anticorpo anti-tireoglobulina e anticorpo anti-peroxidase	23
3.3 Ultra-sonografia e punção aspirativa guiada pelo ultra-som.....	23
3.4 Cintilografia e prova funcional de captação com Iodo-123.....	27
3.5 Iodúria.....	29
3.6 Coleta das amostras tumorais e não-tumorais.....	31
3.7 Quantificação da expressão gênica do NIS.....	31
3.7.1 Extração do RNA total.....	31
3.7.2 Quantificação do RNA total.....	32
3.7.3 Avaliação da qualidade do RNA.....	32
3.7.4 Síntese do cDNA.....	33
3.7.5 Quantificação do cDNA.....	33
3.7.6 Quantificação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real.....	34
3.8 Análise imuno-histoquímica.....	38
3.8.1 Análise imuno-histoquímica para NIS.....	39
3.8.2 Análise imuno-histoquímica para rTSH e TPO.....	40
3.8.3 Avaliação da imuno-positividade das proteínas.....	41
3.9 Análise Estatística.....	41
4 RESULTADOS.....	43
4.1 Características dos pacientes.....	43
4.2 Exames laboratoriais.....	44

4.3 Anátomo-patológico.....	45
4.4 Dados ultra-sonográficos.....	48
4.5 Cintilografia.....	48
4.6 Iodúrias.....	48
4.7 Quantificação da expressão gênica do NIS.....	50
4.7.1 Quantificação gênica com o GAPDH.....	50
4.7.2 Quantificação gênica com o PSMC6.....	53
4.7.3 Correlação entre os genes GAPDH e PSMC6.....	56
4.8 Análise imuno-histoquímica.....	56
4.8.1 Análise imuno-histoquímica para NIS.....	56
4.8.2 Análise imuno-histoquímica para receptor de TSH.....	60
4.8.3 Análise imuno-histoquímica para TPO.....	62
4.8.4 Correlação entre quantificação gênica e imuno-histoquímica.....	64
5 DISCUSSÃO.....	66
6 CONCLUSÕES.....	77
7 REFERÊNCIAS.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	adenosina monofosfato
AMPC	adenosina monofosfato cíclica
Anti-TPO	anticorpo anti-tireoperoxidase
Anti-TG	anticorpo anti-tireoglobulina
cDNA	ácido desoxi-ribonucleico complementar
DNA	ácido desoxi-ribonucleico
et al.	e outros
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
NIS	simportador sódio-iodo
PAAF	punção aspirativa por agulha fina
PAAF-US	punção aspirativa por agulha fina guiada por ultra-sonografia
PCR	reação em cadeia da polimerase
PSMC6	<i>proteasome 26S ATPase subunit 6</i>
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
rTSH	receptor do hormônio tireo-estimulante
TG	tireoglobulina
TPO	tireo-peroxidase
TSH	hormônio tireo-estimulante
UA	unidades arbitrárias

RESUMO

Sodré, AKMB. *Expressão do simportador sódio-iodo (NIS) nos tumores tireoidianos benignos e malignos através de estudo imuno-histoquímico e da quantificação do RNA mensageiro* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

O transporte de iodo para tireóide é mediado pelo simportador sódio-iodo (NIS), glicoproteína de 643 aminoácidos localizada na região basolateral da célula folicular que acopla a entrada de sódio e iodo para o interior da célula. A clonagem do gene NIS em 1996 foi o primeiro passo na investigação dos mecanismos moleculares responsáveis pela diminuição da captação do radioiodo nos tumores benignos e malignos da tireóide. Estudos prévios sobre a expressão do gene NIS baseados em quantificação do transcrito e/ou análise imuno-histoquímica da proteína, mostraram resultados bastante divergentes. A maioria dos estudos com RT-PCR mostrou redução ou até ausência do transcrito do NIS. Os estudos mais recentes de imuno-histoquímica, no entanto, mostraram aumento da expressão da proteína NIS, ao invés de diminuição. Poucos foram os estudos que fizeram análise do transcrito e da proteína concomitantemente nas mesmas amostras. Este estudo teve como objetivo quantificar o RNAm do gene NIS e avaliar a expressão e localização celular da proteína NIS, através das técnicas de RT-PCR em tempo real e exame imuno-histoquímico, respectivamente. Foram estudadas 30 amostras de nódulos de tireóide, sendo 14 nódulos benignos e 16 nódulos malignos, sempre pareados com o tecido não-tumoral do mesmo paciente. Através de exame cintilográfico, verificou-se que 100% dos nódulos malignos e 85,7% dos benignos eram hipocaptantes. Houve diminuição da expressão gênica do NIS em 78,6% dos nódulos benignos, em 81,2% dos carcinomas utilizando o gene PSMC6 como controle interno e em 100% dos carcinomas com o gene GAPDH como controle interno. O exame imuno-histoquímico da proteína NIS revelou positividade da proteína NIS no citoplasma em 100% dos tecidos não-tumorais, 100% dos nódulos benignos e 93,75% dos nódulos malignos, não sendo estatisticamente diferentes entre si. A positividade na membrana basolateral ocorreu em 23,3% das amostras não-tumorais, em 14,3% dos nódulos benignos e em 12,5% dos nódulos malignos, não se detectando diferença significativa entre os grupos. A comparação da intensidade da imuno-expressão do NIS no citoplasma entre os nódulos *versus* os tecidos não-nodulares mostrou que esta foi maior em 64,3% dos nódulos benignos e em 87,5% dos malignos. Houve associação entre diminuição da quantificação gênica do NIS tumoral e aumento da imuno-expressão da proteína NIS no citoplasma tumoral em 50% dos nódulos benignos, 87,5% dos nódulos malignos, quando se utilizou o GAPDH como controle interno e, em 68,75% dos nódulos malignos quando se utilizou o PSMC6. A diminuição da expressão gênica do NIS associada a maior imuno-positividade intracitoplasmática da proteína NIS se deve a provável incapacidade de migração da proteína para a membrana plasmática.

Descritores: Simportadores, Neoplasias da glândula tireóide, RNA, Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa, Imuno-histoquímica

ABSTRACT

Sodré, AKMB. *Expression of the sodium iodide symporter (NIS) in benign and malignant thyroid tumors using immunohistochemistry and messenger RNA quantification* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

The iodide uptake by epithelial thyroid cells requires the expression of sodium iodide symporter (NIS), a transmembrane glycoprotein of 643 amino acids. NIS is located at basolateral plasma membrane of the thyroid follicular cells and couples the transport of iodide and sodium to this cells. NIS gene was cloned in 1996, being the first step of investigation of the mechanisms responsible for the lower uptake of radioiodide by benign and malignant thyroid tumors. Previous studies about expression of NIS gene based in quantification by RT-PCR and/or immunohistochemistry analysis showed divergent data. The majority of RT-PCR studies showed reduction or even absence of transcript of NIS in malignant tumors. Recent studies of immunostaining showed that many tumors overexpress rather than under express NIS. Only a few studies have made the analysis of the transcript and the protein at the same time in the same samples. The objective of this study was to investigate NIS transcript levels and the presence and location of NIS protein, using real time RT-PCR and immunohistochemistry, respectively. It was included 30 samples of thyroid tumors, 14 benign and 16 malignant ones, always compared to adjacent non-tumoral samples. Scintigraphic findings showed that 100% of malignant tumors and 87.5% of benign ones were "cold". RT-PCR data revealed lower gene expression in 78.6% of the benign tumors, 81.2% of the carcinomas using PSMC6 as a housekeeping gene and 100% of the carcinomas using GHPDH as a housekeeping gene, when paired to the normal tissue samples. Immunohistochemical staining revealed presence of NIS protein in 100% of the non-tumoral samples, 100% of the benign tumors and 93.75% of the malignant tumors. No statistical differences were detect in this data. NIS protein was identified at basolateral membrane in 23.3% of non-tumoral samples, 14.3% of benign tumors and 12.5% of malignant tumors. No statistical differences were detect in this data. Higher quantities of intracytoplasmatic NIS protein were detect in 64.3% of benign tumors and in 87.5% of malignant tumors when compared to non-tumoral samples. Association between lower gene expression and higher presence of intracytoplasmatic NIS protein was found in 50% of benign tumors, 87.5% of malignant tumors using GHPDH as a housekeeping gene and 68.75% of malignant tumors using PSMC6 as a housekeeping gene. The reduced gene expression of NIS in thyroid tumors with strong intracytoplasmatic staining may be due to his incapacity in migrating to cellular membrane.

Descriptors: Symporters, Thyroid neoplasms, RNA, Reverse transcriptase polymerase chain reaction, Immunohistochemistry

1 INTRODUÇÃO

O iodo é um componente essencial para a síntese dos hormônios tireoidianos, os quais têm importante papel no metabolismo, crescimento e maturação de tecidos e órgãos, principalmente no desenvolvimento do sistema nervoso central do feto e do recém-nascido. Devido à oferta de iodo no ambiente ser limitada, um sistema eficiente de transporte faz com que a maior parte do iodo ingerido seja acumulada na tireóide^{1,2}.

A tireóide tem capacidade de concentrar iodo de 20 a 40 vezes mais que a concentração plasmática deste halogênio, em condições fisiológicas e, devido ao seu arranjo folicular, ela é capaz não só de transportar, mas também de estocar iodo para suas futuras necessidades.

A habilidade das células foliculares tireoidianas em concentrar iodo foi descrita pela primeira vez em 1896 por Baumann* apud Dohán¹. A existência de um mecanismo concentrador de iodo na glândula foi investigada melhor após 1940, quando surgiram os isótopos radioativos do iodo. Por volta da metade da década de 70, sugeriu-se um modelo de transportador de iodo e sódio na membrana das células tireoidianas. Parecia claro que o transporte de iodo para a tireóide era mediado por um simportador sódio-iodo (NIS), que seria uma proteína transportadora intrínseca da membrana plasmática que acoplaria a entrada de iodo e sódio¹.

Durante décadas, a falta de informação molecular sobre o NIS constituiu a maior lacuna no entendimento sobre a fisiologia e fisiopatologia

* Baumann E. Über den jodgehalt der schilddrüsen von menschen und tierem. Hoppe Seylers Z. Physiol Chem. 1896;22:1-17.

tireoidianas, do ponto de vista molecular. Vários pesquisadores tentaram identificar esse transportador de iodo, mas foi somente em 1996 que se clonou o DNA complementar (cDNA) que codifica o NIS de ratos (rNIS) em oócitos de *Xaenopus laevis*, usando cDNA derivado de células FRTL-5 (linhagem celular altamente funcional derivada de tumores da tireóide de rato)³. Neste mesmo ano, através do rastreamento de bibliotecas de cDNA de tireóide humana, foi isolado o cDNA que codifica o NIS humano (hNIS)⁴ e o sequenciamento revelou uma estrutura composta por 1929 nucleotídeos.

Em 1997, examinou-se a expressão, a organização exon-intron e o mapeamento cromossômico do gene do hNIS e concluiu-se que ele está localizado no cromossomo 19p12-13.2 e que contém uma região codificadora de 15 exons interrompida por 14 introns, que codifica o RNA mensageiro (RNAm) de 3,9 kb⁵.

1.1 Estrutura e propriedades da proteína NIS

Com a disponibilidade do cDNA do NIS e o desenvolvimento de anticorpos específicos, tornou-se possível a caracterização estrutural e funcional da proteína NIS.

O hNIS é uma glicoproteína de 643 aminoácidos, com peso molecular de 70-90 kDa. Ela apresenta 84% de identidade e 93% de similaridade com o NIS do rato.

O modelo da estrutura secundária da proteína hNIS aceito atualmente é composto por 13 segmentos trans-membranosos, uma região amino-terminal

extracelular e uma região carboxi-terminal intracelular e foi proposto em 1998 por Levy et al.⁶ (Figura 1). Os segmentos trans-membranosos são compostos por 20 a 28 aminoácidos, com exceção do segmento V que contém 18 aminoácidos.

Figura 1. Modelo da estrutura secundária da proteína NIS. Números 1 a 643: sequência dos aminoácidos; números 1 a 14: domínios intra e extracelulares; números I a XIII: domínios transmembranosos; triângulos vermelhos: potenciais sítios de glicosilação
 FONTE: Spitzweg et al.⁷

A proteína NIS possui sete segmentos hidrofóbicos, cinco dos quais são extracelulares (região amino-terminal e as alças: entre os segmentos II - III, entre os segmentos VI - VII, entre os segmentos VIII - IX e entre os segmentos XII - XIII)⁸. A região carboxi-terminal também é uma grande região hidrofílica, composta por 94 aminoácidos e um potencial sítio de fosforilação AMP-cíclico dependente.

Estudos de microscopia eletrônica em oócitos de *Xaenopus laevis* revelaram partículas intra-membranas de nove nm que correspondem ao

NIS, sugerindo que o NIS pode funcionar como uma proteína multimérica⁹. Outros estudos de co-imunoprecipitação mostraram que o NIS é também uma proteína oligomérica e isto pode se dever a uma alça de leucinas localizadas nas posições 199, 206, 213 e 220⁸.

A proteína NIS é considerada uma glicoproteína porque possui três potenciais sítios de glicosilação, as asparaginas nas posições 225, 485 e 497, que podem ser glicosiladas no retículo endoplasmático. A glicosilação parece não ser essencial para o funcionamento da proteína, já que o NIS mutante não glicosilado consegue se localizar na membrana plasmática e realizar o transporte de iodo, com valor de K_m (20-30 μM), idêntico ao NIS glicosilado⁶.

1.2 Biogênese e localização subcelular do NIS

Em 1997, Levy et al.⁶ realizaram estudo *in vivo* com anticorpo anti-NIS de alta afinidade, em células FRTL-5, e mostraram que a proteína NIS é sintetizada inicialmente como um precursor, com peso molecular de 56 kDa e que, após a glicosilação, evolui para a forma madura dentro de uma hora. Em aproximadamente 12 horas, já se observa transporte de iodo, indicando que as moléculas funcionantes alcançaram à membrana plasmática. Para que o transporte de iodo ocorra é necessário que a proteína NIS seja expressa, migre e se localize na membrana plasmática. Acredita-se que a proteína que fica no citoplasma seja incapaz de mediar o transporte de iodo¹⁰.

A meia vida do NIS nestas células, é de três dias, na ausência do hormônio estimulador da tireóide (TSH) e de cinco dias na presença dele.

1.3 Família da proteína NIS

A proteína NIS é membro de uma família de transportadores dependentes de sódio, chamada família de carreadores de solutos 5 (SLC5A) que inclui mais de 60 membros de origem procariótica e eucariótica. Todos têm bastante similaridade entre si e usam o gradiente eletroquímico do transporte de sódio como meio de transportar solutos para a célula. Os membros eucarióticos desta família incluem: família de co-transportadores de sódio e glicose de alta afinidade (SLC5A1), co-transportadores de sódio e glicose de baixa afinidade (SLC5A2), transportador de sódio e mioinositol (SLC5A3), simportador de prolina dependente de sódio (SLC5A4) e transportador de multivitaminas dependente de sódio (SLC5A6). Este último tem maior homologia com o NIS (SLC5A5)¹¹.

1.4 Aspectos fisiológicos do NIS

Foi a partir da clonagem do gene que codifica o hNIS que se alcançou maior entendimento sobre o mecanismo de transporte de iodo.

Atualmente sabe-se que o iodo é transportado ativamente do sangue para o citoplasma da célula folicular, através da membrana plasmática

basolateral, em um processo catalisado pelo NIS conhecido como captação de iodo (Figura 2). Ele acopla a entrada de sódio (que ocorre a favor de seu gradiente eletroquímico) e de iodo (contra seu gradiente eletroquímico). Dois íons sódio são transportados para cada ânion de iodo. Estudos de eletrofisiologia mostraram que o sódio liga-se ao NIS antes que o iodo, mostrando que a ligação ao NIS é ordenada e sequencial⁹.

Figura 2. Representação esquemática da célula folicular tireoidiana exibindo os principais aspectos do transporte e organificação do iodo. Na região basolateral encontram-se o NIS, rTSH e bomba sódio potássio ATP-ase; na região apical TPO e pendrina
FONTE: Spitzweg et al.⁷

O gradiente de sódio que fornece energia para a captação de iodo é mantido pela bomba sódio-potássio-ATPase, também localizada na região basolateral das células foliculares⁹.

Em seguida, o iodo é transportado passivamente do citoplasma para o lúmen folicular, através da membrana apical, por meio de diferentes

transportadores, como a pendrina (transportador cloro-iodo)¹². Esse processo é chamado de efluxo de iodo.

O lúmen folicular é cercado de células foliculares e preenchido de colóide, o qual é composto principalmente por tireoglobulina (TG). Na interface célula-colóide, o iodo é organificado em uma complexa reação catalisada pela peroxidase (TPO). A organificação envolve a oxidação do iodo e a incorporação dele em resíduos de tirosil da tireoglobulina. Nesta etapa, é necessária a presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é produzido por um sistema gerador de H_2O_2 , no qual as tireóide-oxidases um e dois (ThOXs1 e 2) são essenciais¹³. O processo de organificação é inibido competitivamente pelo tiocianato, perclorato e outros ânions.

Em virtude da pronta organificação do iodo na tireóide, ela consegue um acúmulo prolongado deste íon, diferentemente de outros tecidos capazes de concentrar iodo¹⁴.

Toda essa etapa da biossíntese hormonal é estimulada pelo hormônio tireo-estimulante (TSH) que interage com seu receptor (rTSH) localizado na membrana basolateral dos tirócitos⁸.

1.5 NIS em doença tireoidiana auto-imune

Alguns estudos mostram que uma porcentagem dos soros de pacientes com doença de Graves e tireoidite de Hashimoto causa moderada inibição da captação de iodo em células tireoidianas e não tireoidianas transfectadas com NIS (ambas livres de anticorpos), o que é atribuído a um auto-anticorpo anti-NIS¹⁵. Entretanto, ainda é necessário determinar a existência,

prevalência, efeito funcional e significado patológico dos auto-anticorpos contra o NIS nas doenças auto-imunes da tireóide. Todavia, acredita-se que eles não exerçam papel importante como auto-antígenos⁸.

1.6 NIS em hipotireoidismo congênito

O defeito no transporte de iodo, devido à mutação do gene NIS, leva ao hipotireoidismo congênito, tem herança autossômica recessiva e se caracteriza clinicamente por: hipotireoidismo, bócio, captação tireoidiana de iodo ou percneto reduzida ou ausente e baixa relação saliva/plasma de iodo¹⁶.

Foram descritos 58 casos (em 33 famílias) de hipotireoidismo por defeito no transporte de iodo. Onze mutações no gene NIS foram descritas até o momento: V59E, G93R, Q267E, C272X, G395R, T354P, 515X *frame-shift*, Y531X, G543E, del143-323 e del439-443¹⁸ (Figura 3).

Apesar do quadro clínico e das alterações genéticas serem bem descritos, somente quatro mutações foram estudadas funcionalmente. Nos defeitos T354P e G395R, a proteína NIS é expressa, sofre alterações pós-transcricionais, atinge a membrana plasmática, mas não funciona. No defeito Q267E, ocorre diminuição do transporte do iodo. No G543E, ocorre somente maturação parcial do NIS e ele permanece na região intracelular¹⁶.

Figura 3. Esquema da localização das mutações identificadas no NIS
 FONTE: De la Vieja et al.¹⁶

1.7 NIS em outros tecidos

Acreditava-se que o NIS era uma proteína específica da tireóide, entretanto, tornou-se claro que ele é expresso em vários tecidos não tireoidianos, como: glândulas salivares, estômago, timo e mama. Baixos níveis de expressão foram detectados na próstata, ovário, adrenal, pulmão e coração. Não se encontrou expressão do gene do NIS no cólon, fibroblastos da órbita normal e mucosa nasofaríngea^{17,18}.

Em condições fisiológicas, tanto as glândulas salivares como o estômago, exibem acúmulo de iodo mediado pelo NIS, ao passo que, na glândula mamária, a expressão funcional ocorre somente na fase final da gravidez e na lactação. O cDNA do NIS clonado destes três órgãos é idêntico ao da tireóide¹⁸, porém, a análise por imuno-histoquímica da proteína é positiva somente na membrana lateral das células ductais salivares (e não nas células acinares), nas células parietais da mucosa

gástrica e nas células epiteliais da mama durante a lactação^{19,20}. A localização basolateral da proteína se assemelha bastante com o padrão observado nas células foliculares²¹.

Apesar de se detectar RNAm do NIS em vários tecidos, somente as glândulas salivares e a mucosa gástrica exibem acúmulo de iodo dependente de sódio e sensível ao perclorato⁴, sugerindo que a detecção do RNAm não é evidência suficiente da expressão funcional do NIS.

Estudo recente que analisou a expressão do NIS, através de *microarrays* de alta densidade, em tecidos tumorais de 25 órgãos, mostrou que o NIS foi detectado em 19 tipos de carcinomas, independente da expressão no tecido normal destes órgãos²².

1.8 Regulação da expressão e função do NIS

1.8.1 TSH

O TSH é uma glicoproteína de aproximadamente 30 kDa, sintetizada na adeno-hipófise e é o principal regulador hormonal da função tireoidiana. A maioria das ações do TSH é mediada pela ativação da adenilato ciclase e começa com a ligação ao seu receptor (rTSH).

Já é bem estabelecido que o TSH regula a captação de iodo via AMPc de, pelo menos, duas maneiras: 1) através do aumento na transcrição do gene NIS. Estudo em células FRTL-5 mostrou que, após a retirada do TSH, ocorre redução dos níveis de AMPc intracelular e da captação de iodo e que

esta última pode ser restabelecida pelo próprio TSH ou por agentes que aumentam o AMPc ²³. 2) Através de indução na atividade da proteína NIS. Riedel et al.²⁴ mostraram que, três dias após privação de TSH, há diminuição da proteína NIS, mais pronunciada na membrana plasmática do que no citoplasma, mostrando que, na ausência deste hormônio, o NIS permanece no citoplasma ou é reconduzido da membrana para o citoplasma. Este estudo sugere que o TSH é um dos responsáveis pela manutenção do NIS na membrana das células foliculares, porém, o mecanismo pelo qual ele regula a distribuição subcelular ainda é desconhecido.

A partir desses dados conclui-se que o TSH interfere na expressão do NIS tanto a nível transcricional como pós-traducional.

Estudo em tecidos humanos mostrou que o TSH regula também a expressão de outros genes da tireóide, como TG, TPO e PAX-8 ²⁵, o que poderia também interferir com a expressão do NIS.

1.8.2 Fosforilação do NIS

Como o NIS é uma fosfoproteína e como a fosforilação é um mecanismo que está implicado na ativação, localização subcelular e/ou degradação de proteínas, postula-se que este seria o mecanismo pelo qual o TSH regularia o NIS, a nível pós-traducional.

Riedel et al.²⁴ mostraram que o NIS é fosforilado *in vivo*, principalmente nos aminoácidos serinas, independente da presença do TSH. Entretanto, os

fosfopeptídeos observados na presença do TSH, são bem diferentes daqueles observados na ausência dele.

1.8.3 Regulação do NIS pelo iodo

Além do TSH, o principal regulador da captação do iodo pela tireóide é a própria concentração intracelular de iodo.

Em 1944, Wolff e Chaikoff^{*} apud Dohán⁸ mostraram que a organificação do iodo é bloqueada quando o nível de iodo no plasma atinge um nível crítico, fenômeno conhecido como efeito Wolff-Chaikoff agudo, ou seja, a alta concentração de iodo leva ao bloqueio da peroxidase e, conseqüentemente, ao bloqueio da síntese hormonal. Entretanto, se a concentração do iodo continua alta por dois dias, ocorre um mecanismo de adaptação ou escape e a organificação e síntese hormonal são retomadas.

Em 1963, Braverman e Ingbar^{**} apud Dohán⁸ propuseram que o escape do efeito Wolff-Chaikoff agudo se deve à diminuição no transporte de iodo que leva a sua baixa concentração intracelular, removendo a inibição da organificação.

O efeito do iodo no funcionamento do NIS só começou a ser investigado após a clonagem do gene NIS.

^{*} Wolff J, Chaikoff IL. Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. J Biol Chem. 1944;174:555-64.

^{**} Braverman LE, Ingbar SH. Changes in thyroidal function during adaptation to large doses of iodide. J Clin Invest. 1963;42:1216-31.

Atualmente, se aceita que altas doses de iodo, *in vivo*, levam à diminuição tanto do RNAm como da proteína NIS, todavia, estudos *in vitro* sugerem que há aumento do *turnover* dessa proteína⁸.

Sabe-se também que as moléculas de iodo não organificadas são capazes de formar os iodolipídios, a partir do ácido araquidônico (na presença do peróxido de hidrogênio), podendo inibir a atividade da adenilato-ciclase induzida pelo TSH²⁶.

1.8.4 Tireoglobulina

A tireoglobulina age como um potente supressor de genes tireoidianos, incluindo o NIS, mas o mecanismo pelo qual ocorre este efeito inibitório ainda não está claro. A inibição da expressão gênica pode ser um mecanismo regulatório de *feedback* negativo que contrabalança o efeito estimulador do TSH sobre a função folicular^{27,28}. Isto está de acordo com estudos de imuno-histoquímica em células foliculares normais que mostram que a expressão de NIS é nula ou baixa em folículos maiores (que contêm maior quantidade de tireoglobulina), que apresentam células epiteliais inativas e achatadas. Ao contrário, nos folículos pequenos nos quais as células são cubóides (refletindo maior atividade) a expressão do NIS está aumentada.

Outros fatores parecem participar da regulação do NIS, como citocinas e estradiol, mas eles foram pouco estudados até o momento.

1.9 NIS em tumores de tireóide

A capacidade de concentração de iodo pela tireóide tem grande implicação na avaliação, diagnóstico e tratamento de várias moléstias da tireóide, incluindo o câncer.

Estudos *in vivo* mostraram que o tecido neoplásico geralmente aparece “frio” à cintilografia porque a captação de radioiodo deles é de 0,1 - 0,01% por grama de tecido, enquanto que, no tecido normal, é de 1%²⁹. Apesar da captação de iodo estar diminuída na maioria dos cânceres, ainda é suficiente para levar à destruição dos restos tumorais e metástases. Contudo, a compreensão dos complexos mecanismos que fazem parte da sua regulação, pode levar ao aparecimento de melhores opções terapêuticas para os tumores que não captam iodo.

A clonagem do NIS em 1996 facilitou a investigação dos mecanismos moleculares responsáveis pela diminuição da captação do radioiodo nos cânceres tireoidianos e em suas metástases. A partir daí, iniciou-se um novo e extenso campo de pesquisa sobre NIS na tireóide normal e em suas doenças, em especial no câncer tireoidiano.

Uma das primeiras hipóteses levantadas era de que a diminuição na função do NIS seria decorrente de mutação no gene NIS, entretanto, Russo et al.³⁰ não encontraram qualquer mutação nas amostras de carcinomas papilíferos estudadas.

Através de RT-PCR não quantitativo, técnica que detecta somente presença ou ausência RNA mensageiro, Arturi et al.³¹ encontraram perda da

expressão do NIS em alguns carcinomas papilíferos, foliculares e anaplásicos.

Em 1997, Smanik et al.⁵ detectaram níveis mais baixos de RNAm de NIS em várias amostras de carcinomas de tireóide, quando comparados com tecido normal, através da técnica de *Northern blot*. Usando RT-PCR semiquantitativo, estes mesmos autores encontraram níveis variáveis de NIS em diversos carcinomas papilíferos, sugerindo que a redução na expressão gênica do NIS pode, em parte, ser responsável pela diminuição na captação de iodo.

Para se estudar mais precisamente o papel da expressão gênica nos carcinomas de tireóide, Ryu et al.³² desenvolveram a PCR competitiva para quantificar a expressão gênica do NIS. Lazar et al.³³ utilizaram esta técnica para análise dos genes NIS, TPO e tireoglobulina em adenomas não captantes e em carcinomas de tireóide e encontraram diminuição do NIS nos dois grupos. Entretanto, só detectaram diminuição dos outros genes nos carcinomas, sugerindo que a menor expressão do NIS representa uma anormalidade precoce no processo de transformação da célula tireoidiana e não uma consequência da progressão do câncer.

Outros autores que quantificaram o RNAm de NIS através de RT-PCR em tempo real também encontraram menores níveis dele em nódulos benignos e malignos de tireóide^{34,35}.

A partir dos estudos apresentados, observa-se que níveis variados de RNAm de NIS, quantificados através do RT-PCR, são encontrados nos carcinomas, e que, apesar desta técnica ser amplamente utilizada e de fácil

execução, não fornece informação sobre a estabilidade do RNAm. Além do mais, as variações encontradas nos níveis de RNAm podem não refletir a expressão da proteína NIS, nem sua localização celular, dado que o NIS sofre uma complexa regulação transcricional, pós-transcricional, traducional e pós-traducional e a simples presença ou ausência do transcrito e sua quantidade não são suficientes para indicar a quantidade da proteína NIS, localização e funcionalidade dela¹⁰.

Neumann et al.³⁴ mostraram que a quantidade do RNAm do NIS não reflete a quantidade da expressão da proteína NIS em nódulos “frios” de tireóide, indicando que fatores pós-transcricionais devem ter participação importante nisto.

A partir do que foi exposto acima, conclui-se que para o estudo do NIS não basta quantificar o RNAm, mas deve-se estudar também a proteína, o que pode ser feito através de exame imuno-histoquímico. A maior vantagem desta técnica é que ela fornece indicação sobre a localização celular da proteína NIS. Portanto, uma importante etapa no processo de caracterização da proteína NIS e estudo de sua expressão, foi o desenvolvimento de anticorpos poli e monoclonais de alta afinidade contra a região carboxi-terminal, que são utilizados nos estudos de imuno-histoquímica³⁶.

Os estudos de imuno-histoquímica, em amostras de tireóide normal, mostram que, aproximadamente, apenas 30% das células foliculares apresentam quantidades detectáveis da proteína NIS na membrana plasmática basolateral, mesmo com a presença de altos níveis de RNAm^{19,21}. Em geral, a expressão nos tecidos tireoidianos normais ocorre

nas células foliculares que estão em íntimo contato com os capilares e tende a ser mais intensa nos folículos pequenos, compostos por células epiteliais cubóides ou colunares, do que nos grandes, o que mostra que a organização tridimensional das células nos folículos também interfere na expressão da proteína^{19,37,38}. Nestas amostras normais a expressão da proteína NIS é heterogênea, pois há áreas de folículos com imuno-positividade, intercaladas com áreas de folículos que apresentam positividade mínima ou ausente, e mesmo dentro de um folículo, a imuno-positividade ocorre em esporádicos tirócitos¹⁹.

Nas tireoidites auto-imunes, a imuno-positividade é semelhante ao tecido tireoidiano normal, mas com maior expressão nas células foliculares adjacentes a infiltrados linfocitários. Na doença de Graves e adenomas tóxicos, a imuno-positividade desta proteína é homogênea, muito mais intensa, detectada na maioria dos tirócitos, mas sempre limitada à membrana basolateral^{19, 21, 22}.

Os primeiros estudos sobre a proteína NIS em tumores de tireóide através de imuno-histoquímica, mostraram diminuição dos níveis da proteína associada à perda da localização basolateral, quando comparados com o tecido normal. Caillou et al.²¹ estudaram carcinomas foliculares, papilíferos e anaplásicos e mostraram diminuição da imuno-positividade da proteína NIS nos dois primeiros grupos e ausência dela no último grupo, sugerindo que quanto maior o grau de desdiferenciação tumoral menor seria a imuno-positividade da proteína. Jhiang et al.¹⁹ também não detectaram imuno-positividade da proteína NIS em uma pequena amostra de carcinomas

estudados. Dois estudos realizados por Castro et al.^{36,39} confirmaram ausência de imuno-positividade da proteína NIS em carcinoma de células de Hürthle e anaplásico.

Os estudos resumidos acima sugerem que diminuição da captação de iodo pelos cânceres tireoidianos poderia ser decorrente da redução na transcrição do RNAm do NIS que levaria a redução da síntese da proteína da NIS. Entretanto, Saito et al.⁴⁰ mostraram que o nível de RNAm e a imuno-positividade da proteína NIS estavam aumentados em aproximadamente 50% dos carcinomas papilíferos estudados, contrariando todos os estudos já publicados e sugerindo, pela primeira vez, que outros fatores poderiam estar envolvidos na regulação do NIS. Estes resultados ficaram sem explicação até o final de 2001, quando foi dado mais um passo importante na compreensão da complexa correlação entre NIS e captação de iodo. Neste ano, Dohán et al.⁴¹ analisaram a expressão e localização celular da proteína NIS através de exame imuno-histoquímico e mostraram que 70% dos carcinomas de tireóide “superexpressam” esta proteína, quando comparados com o tecido não tumoral. Contudo, geralmente ela se encontra localizada no compartimento intracelular e quando a expressão ocorre na membrana plasmática, é difusa e não confinada à membrana basolateral. Os autores concluíram que em 70% dos casos de câncer, o defeito na captação de iodo decorre de deficiência na migração ou retenção do NIS na membrana plasmática, mas não excluíram que, em alguns casos, se deve à diminuição ou ausência da expressão da proteína. Wapnir et al.²² também encontraram “superexpressão” da proteína NIS em 77,5% dos carcinomas diferenciados

de tireóide estudados. O estudo de Tonacchera et al.⁴² fortaleceu esta hipótese, pois mostrou que 54% dos nódulos benignos não funcionantes também “superexpressam” o NIS, mas há falha na sua migração para a membrana celular.

Caillou et al.²¹ analisaram a imuno-expressão de NIS e receptor de TSH em pequeno número de carcinomas papilíferos e encontraram diminuição do número de células que apresentam este receptor, sugerindo que esta diminuição pode levar a menor imuno-expressão do NIS e, consequentemente, menor captação de iodo.

Por tudo o que foi visto, nota-se que ainda há grande controvérsia a respeito da relação entre NIS e captação de iodo nos nódulos de tireóide. As disparidades dos resultados dos estudos podem ser decorrentes de vários motivos: diferentes metodologias empregadas, não pareamento da amostra tumoral com a amostra não-tumoral do mesmo paciente, tamanho da casuística analisada, falta de informação sobre valor de TSH do paciente e possível uso de levotiroxina, tipos histológicos analisados e, por fim, a complexidade do processo transcricional e pós-transcricional do NIS. O que leva a crer que não existe apenas uma alteração que explique a diminuição da captação do iodo em todos os nódulos “frios” de tireóide.

Tendo em vista que: ainda existe grande controvérsia sobre o assunto; que os trabalhos disponíveis até o momento sugerem que as alterações do NIS podem resultar não só de anormalidades transcricionais bem como de pós-transcricionais; que a grande maioria dos trabalhos publicados apresentou algum viés; e que pouquíssimos foram os estudos que fizeram

análise conjunta de RNAm e proteína, encontrou-se justificativa suficiente para realizar o presente trabalho de comparação da expressão gênica do NIS (através da quantificação do seu RNAm) com a imuno-expressão da proteína NIS, em tumores benignos e malignos de tireóide, sempre pareados com a amostra não tumoral do mesmo paciente, tendo-se o cuidado de analisar o máximo de informações clínicas e laboratoriais dos pacientes. Decidiu-se ainda estudar da imuno-expressão do receptor do TSH com o objetivo de avaliar se a menor expressão deste receptor poderia estar envolvida nas alterações de imuno-expressão da proteína NIS, e de forma complementar, decidiu-se estudar também a imuno-expressão da TPO.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- 1) Avaliar a expressão gênica do NIS e correlacioná-la com a imuno-expressão da proteína NIS, em amostras pareadas de nódulos benignos e malignos de tireóide, por meio das seguintes etapas:
 - a) Quantificação do RNAm do gene NIS através da técnica de RT-PCR em tempo real;
 - b) Estudo da expressão e localização celular da proteína NIS através de exame imuno-histoquímico;
 - c) Avaliação de correlação da quantidade do RNAm do NIS com a localização celular da proteína NIS;
- 2) Estudar também a expressão da tireo-peroxidase e do receptor de TSH através de exame imuno-histoquímico;
- 3) Avaliar a correlação entre a localização celular da proteína NIS com a presença e intensidade de imuno-expressão do receptor de TSH.

3 MÉTODOS

Foram incluídos neste estudo 30 pacientes, atendidos na Unidade de tireóide da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo que preencheram os seguintes critérios de inclusão:

- Portadores de nódulo tireoidiano maior que 1 cm de diâmetro;
- Pacientes com indicação de tireoidectomia total ou parcial:
 - Nódulos com escore de classificação citológica e ultra-sonográfica combinadas maior que cinco (ver descrição adiante);
 - Nódulos benignos com história de crescimento ou sintomas compressivos.

Foram excluídos os pacientes que apresentaram quaisquer das características abaixo:

- Gestação;
- Uso atual de medicação antitireoidiana;
- Antecedente de tratamento esclerosante com injeção de etanol do nódulo;
- Antecedente de radioiodoterapia;
- Contra-indicação cirúrgica.

3.1 Protocolo de atendimento clínico

Todos os pacientes passaram em consulta quando foram realizados:

- Anamnese e avaliação clínica;

- Exames laboratoriais para avaliação da função tireoidiana;
- Ultra-sonografia e Punção Aspirativa por Agulha Fina guiada por ultra-sonografia (PAAF-US) do nódulo tireoidiano;
- Encaminhamento para avaliação pré-operatória.

O estudo foi aprovado pela comissão de Ética Médica do Hospital das Clínicas da FMUSP e todos os participantes deram consentimento formal antes da coleta de material biológico, após informação sobre o estudo.

3.2 Determinação do TSH, T3, T4 total, T4 livre, anticorpo anti-tireoglobulina e anticorpo anti-peroxidase

As concentrações séricas de T3, T4 total, T4 livre, TSH e anticorpos anti-tireoglobulina e anti-TPO foram determinadas por método fluorimétrico, utilizando-se estojos comerciais Auto-Délfia (Perkin Elmer, Wellesley, EUA).

3.3 Ultra-sonografia e punção aspirativa guiada pelo ultra-som

Para a realização do ultra-som de tireóide, foi utilizado o aparelho de ultra-sonografia ALOKA SSD 500 com transdutor linear de 7,5 MHz (Tóquio, Japão). Os pacientes foram examinados em decúbito dorsal, com leve hiper-extensão do pescoço. Foi utilizado gel para impedir a presença de ar entre o transdutor e a pele, permitindo um contato perfeito entre as duas superfícies.

O pescoço foi avaliado nos sentidos sagital, transversal e oblíquo para verificação das seguintes estruturas: músculos, artérias carótidas, veias

jugulares, ambos os lobos tireoidianos, istmo e possíveis adenomegalias. Os nódulos identificados foram mensurados nos seus três maiores eixos, e esta medida foi realizada, sempre que possível, no bordo externo da linha que delimitava o nódulo.

Após essa etapa, os nódulos foram classificados em quatro graus (I a IV), correspondentes, progressivamente, à maior probabilidade de malignidade da lesão nodular⁴³.

A classificação ultra-sonográfica dos nódulos tireóideos foi baseada nas seguintes características:

- Conteúdo:

- Cisto com conteúdo totalmente líquido;

- Cisto com massa sólida em sua parede;

- Inteiramente sólido;

- Sólido com área líquida central;

- Misto ou complexo: com áreas líquidas dispersas em um nódulo sólido.

- Ecogenicidade:

- Isoecóico: nódulo sólido com amplitude de ecos igual ao do parênquima tireoidiano normal;

- Hipoecóico: nódulo sólido com amplitude de ecos menor do que o parênquima tireoidiano normal;

- Hiperecóico: nódulo sólido com amplitude de ecos maior que o parênquima tireoidiano normal.

- Contornos: regulares ou irregulares

- Microcalcificações: pequenos pontos hiperecogênicos, alguns com sombra acústica posterior, presentes no interior dos nódulos sólidos.

Além disso, avaliou-se o parênquima tireoidiano adjacente ao nódulo quanto à textura (homogênea ou heterogênea) e presença de outras imagens nodulares (sólidas, mistas ou císticas).

Baseado nestas características, todos os nódulos foram classificados em quatro grupos, correspondendo, progressivamente, à maior probabilidade de malignidade da lesão:

- Grau I (benigno): imagem anecóica arredondada, de paredes lisas e de conteúdo totalmente líquido;
- Grau II (benigno):
 - Nódulo de textura mista ou complexa, predominantemente sólido, ou predominantemente líquido;
 - Nódulo sólido isoecóico ou hiperecóico, acompanhado ou não de calcificações grosseiras (densas), componente líquido e com o restante do parênquima de ecogenicidade normal e textura heterogênea, podendo se identificar outras imagens nodulares sólidas, mistas ou císticas.
- Grau III (duvidoso):
 - Nódulo sólido hipoecóico, de contornos regulares e sem microcalcificações;
 - Nódulo sólido isoecóico ou hiperecóico, único, em glândula de textura homogênea;
 - Nódulo sólido com uma área líquida central;
 - Cisto com uma massa sólida em sua parede.

- Grau IV (suspeito para malignidade): nódulo sólido hipoecóico, de contornos irregulares e com microcalcificações.

Nos pacientes que apresentavam múltiplos nódulos, selecionavam-se para PAAF, os nódulos com o maior grau ultra-sonográfico ou o nódulo dominante, quando todos apresentavam o mesmo grau ultra-sonográfico.

Os nódulos foram submetidos à punção aspirativa por agulha fina dirigida pelo ultra-som, utilizando-se agulha 22G e seringas descartáveis de 10 cc, sem o dispositivo adaptador da seringa, utilizando-se o método descrito por Yokozawa⁴⁴.

As lâminas foram fixadas em álcool 96° e posteriormente coradas pela hematoxilina-eosina. As lâminas contendo o material citológico foram examinadas para avaliar a adequada celularidade, enquanto o paciente aguardava na sala de espera. Se o material celular era inadequado, uma nova punção biópsia era realizada. Este procedimento era realizado até obtenção de material adequado para análise citológica.

Quando após repetidas punções, a amostra ainda se mostrava insuficiente para o diagnóstico, o procedimento era interrompido e o exame citológico era considerado insatisfatório.

Os exames citológicos foram classificados, de acordo com suas características, em graus de I a IV, sendo:

- Grau I (benigno): citologia compatível com bócio colóide adenomatoso, nódulo adenomatoso ou tireoidite crônica auto-imune;
- Grau II (Indeterminado): citologia indeterminada para neoplasia de tireóide;

- Grau III (Suspeito): citologia suspeita para carcinoma de tireóide;
- Grau IV (Maligno): citologia compatível com carcinoma papilífero.

Para cada nódulo foi atribuído um escore referente ao grau de classificação ultra-sonográfica e citológica, da seguinte maneira:

- Classificação ultra-sonográfica:

- Grau I: escore 1;
- Grau II: escore 2;
- Grau III: escore 3;
- Grau IV: escore 4.

- Característica citológica:

- Grau I: escore 1;
- Grau II: escore 2;
- Grau III: escore 3;
- Grau IV: escore 6.

Os pacientes que apresentaram a soma dos escores da classificação ultra-sonográfica e citológica maior ou igual a cinco foram encaminhados para cirurgia.

Para o diagnóstico anátomo-patológico foram utilizados os critérios de classificação da Organização Mundial da Saúde⁴⁵.

3.4 Cintilografia e prova funcional de captação com Iodo-123

Os exames cintilográficos foram realizados após confirmação de assiduidade dos pacientes quanto ao preparo (restrição ao uso de

substâncias, medicamentos e alimentos com alta concentração de iodo), uma vez que todos receberam tabela (de substâncias, alimentos e medicamentos a serem evitados), padronizada pelo Centro de Medicina Nuclear do Instituto de Radiologia do HC-FMUSP.

A prova funcional de captação foi realizada com iodo-123 fornecido pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN). Solução diluída padronizada de iodo-123 foi previamente preparada para representar o padrão da dose administrada.

Após jejum de 12 horas, os pacientes receberam 56 MBq (1.5 mCi) de iodo-123 e foram orientados a permanecer em jejum por 2 horas após o horário de ingestão da dose. No restante do período, foi recomendado que seguissem as orientações de restrição dietética fornecida.

As provas de captação foram realizadas em equipamento Captus 600 (CAPINTEC, Londres, Inglaterra), com emprego de protocolo padronizado de captação. A dose padrão administrada para cada paciente foi diluída com fator 1:1000 em balão volumétrico e uma amostra de 1 mL foi retirada para registro de contagens. Por ajuste linear, o número de contagens obtido por período de 5 minutos multiplicado pelo fator de diluição forneceu o número total de contagens da dose total administrada.

O registro das contagens da região cervical e coxa (radiação de fundo) foi realizado 2 e 24 horas após ingestão da dose. Foram registradas contagens da tireóide e da coxa, a uma distância padrão, durante 5 minutos,

para cálculo do percentual de dose captada na glândula, através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ captação} = \text{contagens tireóide} - \text{contagens coxa} / \text{contagens padrão} \times 100$$

Os exames foram obtidos em câmara de cintilação de amplo campo de visão, equipada com colimador pinhole para magnificação das imagens e incremento da resolução espacial. As imagens planas com colimador pinhole foram obtidas com matriz 128 x 128, registrando-se 500.000 contagens nas incidências anterior, oblíqua anterior direita e oblíqua anterior esquerda da região cervical. A calibração do instrumento foi realizada para o fotopico de 159 keV do iodo-123, com janela simétrica de 15%.

3.5 Iodúria

Colheu-se a amostra de urina para dosagem de iodo antes do início da cintilografia de tireóide, para verificação do cumprimento da dieta pobre em iodo, pelo paciente. Após a coleta, a amostra foi acondicionada em dispositivo tipo *Monovette* (com capacidade para 10mL) e refrigerada.

As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de análise de iodo urinário da Universidade Peruana Cayetano Heredia, sob a supervisão do Prof. Eduardo Pretel, onde foram armazenadas a - 20°C, até a data de sua dosagem.

As amostras urinárias foram analisadas pelo método de digestão urinária *Sandell-Kolthoff* modificado, que usa o persulfato de amônio como agente oxidante, evitando o uso do ácido clórico que libera vapores tóxicos e explosivos⁴⁶.

Misturaram-se as amostras para a ressuspensão do sedimento, pipetou-se 200 µL da curva padrão (0-20 µg/ dL) e da amostra em tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 1 mL de persulfato de amônio 1M, sob agitação e as amostras foram aquecidas em banho seco a 90- 94°C por 30 minutos. Após os tubos retornarem à temperatura ambiente, foram colocados em banho-maria a 37° C por 10 minutos e acrescentou-se 2 mL de ácido arsenioso 0,2N, 1 mL de ácido sulfúrico 2,5 N e 1 mL de água milique e agitou-se. Em seguida os tubos foram mantidos por 15 minutos em repouso e adicionaram-se 500 µL de sulfato cérico amoniacal à mistura, sob agitação. Após 20 minutos, foi dosada a absorbância de cada amostra a 405 nm em espectrofotômetro, e o conteúdo de iodo nas amostras foi obtido por comparação de leituras com a curva-padrão e o resultado expresso em µg/ dL.

As concentrações de iodo urinário foram classificadas, de acordo com os valores obtidos, em:

- Baixa: iodúria abaixo de 100 µg/ dL;
- Normal: iodúria entre 100 e 299 µg/ dL;
- Alta: iodúria igual ou maior que 300 µg/ dL.

3.6 Coleta das amostras tumorais e não-tumorais

Foi colhida uma amostra de tecido tumoral e uma amostra de tecido não-tumoral de cada paciente e cada uma delas foi dividida ao meio. Uma amostra tumoral e uma não tumoral foram colocadas em formol tamponado, para posterior realização de técnica de imuno-histoquímica e as outras foram colocadas em tubo contendo 500 μ L de *RNA later* (Ambion, Austin, EUA) e armazenadas em nitrogênio líquido - 80° C, para posterior extração do RNAm.

3.7 Quantificação da expressão gênica do NIS

3.7.1 Extração do RNA total

Misturou-se 50 a 100mg de tecido congelado a 10 μ L de DEPC e pulverizou-se por 1 a 2 minutos no equipamento *Mikro dismembrator U* (B. Braun Biotech Internacional, Allentown, EUA); em seguida acrescentou-se 1 mL de trizol e homogeneizou-se por 10 segundos. O material foi transferido para tubo tipo *eppendorf* e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se 200 μ L de clorofórmio, homogeneizou-se e incubou-se por 2 a 3 minutos em temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12.000RPM durante 15 minutos a 4°C e a fase aquosa em suspensão foi transferida para outro tubo tipo *eppendorf* no qual se adicionaram 500 μ L de álcool isopropílico. O material foi incubado a - 20°C durante 16 horas e,

posteriormente, foi centrifugado a 12.000RPM, durante 20 minutos, a 4°C. Desprezou-se a fase líquida e adicionaram-se 500µL de etanol 70%. Após nova centrifugação a 12.000RPM durante 15 minutos, manteve-se somente o sedimento que foi seco e ressuspenso em 20 a 100 µL de água DEPC. O RNA foi conservado a - 70°C até a utilização.

3.7.2 Quantificação do RNA total

A quantidade e pureza do RNA foram avaliadas através da dosagem da absorbância da amostra em espectro-fotômetro (Pharmacia, Uppsala, Suécia) a 260nm e 280nm, sabendo-se que, para RNA $DO_{260}=1$, corresponde a 40 ug/µL e que o RNA de boa qualidade possui uma relação $DO_{260}/DO_{280} \geq 1,8$.

3.7.3 Avaliação da qualidade do RNA

Para avaliar a integridade do RNA foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TAE 1X, contendo 0,001mg/mL de brometo de etídeo. Utilizou-se 1µL de cada amostra, *stop mix* como tampão de amostra (azul de bromofenol 0,5%, EDTA pH 8 100mM, glicerol 50%) e *ladder* 1Kb (Invitrogen, Carlsbad, EUA) como padrão de tamanho molecular. A visualização das bandas correspondentes aos RNA 28S e 18S confirmou a boa qualidade do RNA (Figura 4).

Figura 4. Gel de agarose a 1,5% com amostras de RNAs de tecidos tireóideos (1-2-3-5) e 4: marcador de peso molecular *ladder* 1Kb

3.7.4 Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada empregando-se: 2µL de *random* hexâmeros (50µM), 1µL de dNTP (10mM), 1µg de amostras de RNA e água q.s.p. 13,5µL. Em seguida, incubou-se esta reação por 5 minutos, a 65°C e depois a 4°C, por pelo menos 1 minuto.

Posteriormente, acrescentou-se 4µL de tampão de reação 5X, 1µL de DTT(0,1M), 1µL de *RNAse Out* (20U/µL) e 0,5µL de *super script III RNA H* transcriptase reversa (Invitrogen, Carlsbad, EUA) (200U/µL) em volume final de 20µL. Incubou-se esta reação por 60 minutos a 50°C e, em seguida, por 15 minutos a 70°C. Por último, acrescentou-se 30µL de água.

3.7.5 Quantificação do cDNA

As amostras de cDNA foram quantificadas em espectro-fotômetro sendo lidas a DO_{260nm} e DO_{280nm} . Foi considerado $DO_{260nm}=1$ equivalente a 50ng/µL de cDNA.

3.7.6 Quantificação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real

A quantificação da expressão do gene NIS foi realizada pela técnica de PCR quantitativo em tempo real, empregando-se o aparelho *Rotor-Gene 3000* (Corbett Research, Mortlake, Austrália). Quantificou-se também a expressão dos genes *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) e *proteasome 26S ATPase subunit 6* (PSMC6), utilizados como controles internos, para a normalização dos valores de expressão gênica.

A reação de PCR foi padronizada considerando-se os seguintes parâmetros: melhor temperatura de anelamento para cada gene, concentração dos iniciadores e quantidade de cDNA utilizada. Foram escolhidas as condições que permitiram amplificação de boa qualidade, determinadas pela visualização de banda única em eletroforese em gel de agarose e pelo gráfico de semi-denaturação com um único pico para cada gene amplificado (Gráfico 1, Gráfico 2).

Gráfico 1. Gráfico de semi-denaturação dos fragmentos amplificados dos genes: A: GAPDH; B: NIS

Gráfico 2. Gráfico de semi-denaturação dos fragmentos amplificados do gene PSMC6

Para padronização das reações foi realizada curva padrão para cada gene, empregando-se diluição seriada de uma mesma amostra de cDNA controle (625ng, 312ng, 156,25ng, 78,125ng e 39,0625ng). Em todos os casos foram escolhidas as condições que permitiram obter valor de coeficiente de correlação (R^2) entre concentração e *threshold cycle* (CT: número de ciclos, na fase exponencial da curva de amplificação, em que a intensidade da fluorescência é proporcional à concentração de DNA inicial) de eficiência próxima a 1 (Figura 5).

Figura 5. Exemplo de curva padrão do PCR quantitativo em tempo real, R^2 : 0,9932; eficiência: 0,85908

Todas as amostras foram analisadas em duplicata e em todos os experimentos foi incluído um controle negativo (sem cDNA).

Inicialmente, o gene NIS foi avaliado utilizando-se o gene GAPDH como controle interno e a quantificação de ambos os genes foi determinada a partir de curva padrão presente em todos os experimentos⁴⁷. Os valores de expressão gênica obtidos foram, posteriormente, normalizados através do quociente entre expressão do gene NIS e a expressão do gene GAPDH e foram expressos em Unidades Arbitrárias (UA).

Para confirmação dos resultados da quantificação do RNAm de NIS nas amostras estudadas, foi realizada nova quantificação empregando-se um segundo gene controle interno, o PSMC6. Para estas quantificações foi empregado o método de análise delta-delta CT⁴⁷. O emprego desse método foi possível porque ambos os genes apresentaram a mesma eficiência de amplificação, verificada através da análise de correlação que mostrou coeficiente de inclinação da reta menor que 0,1 (em valores absolutos) (Figura 6). Em todos os experimentos também foi incluída uma única amostra cDNA de um indivíduo controle que serviu como calibrador para o cálculo de expressão gênica.

Figura 6. Correlação entre NIS e PSMC6

A reação de PCR quantitativo em tempo real foi realizada utilizando-se: 250ng de cDNA, 1X de *Absolute QPCR SYBR[®] Green Mix* (Abgene, Surrey, Reino Unido), 300nm de iniciadores (Tabela 1), para volume final de 15µL. Incubou-se por 15 minutos a 95°C e durante 40 ciclos por: 20 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C-62°C (GAPDH: 55°C; PSMC6: 56°C; NIS 62°C), 30 segundos a 72°C e finalmente por 15 segundos a 72°C. Todos os iniciadores empregados eram homólogos as sequências de dois exons consecutivos (*intron spanning primers*) (Tabela 1). Em todos os experimentos, os produtos amplificados foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, para afastar a possibilidade de amplificação de DNA genômico contaminante, que seria detectado neste gel como uma banda de maior tamanho. Estas análises evitaram a necessidade de tratamento do RNA com DNase (Figura 7, Figura 8, Figura 9).

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para amplificação dos genes estudados

GENE	INICIADOR SENSO	INICIADOR ANTISENSO	TAMANHO AMPLIFICADO
GAPDH ⁶²	5'GCCAAAAGGGTCATCATCTC3'	5'CAGGGATGATGTTCTGGAG3'	281pb
NIS ⁵³	5'ACACTGACTGCGACCCTCTCCT3'	5'TGCTGAGGGTGCCACTGTAA3'	141pb
PSMC6 ⁵⁴	5'GCTGCGTCCAGGAAGATTAG3'	5'TGCGAACATACCTGCTTCAG3'	196pb

pb: pares de bases

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. 1) marcador de peso molecular *ladder* 1Kb 2) controle negativo; 3-11) produtos da amplificação do gene PSMC6 de amostras de cDNA de pacientes por PCR em tempo real

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. 1) marcador de peso molecular *ladder* 1Kb; 2-9) produtos da amplificação do gene NIS de amostras de cDNA de pacientes por PCR em tempo real; 10) controle negativo

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. 1) marcador de peso molecular *ladder* 1Kb 2) controle negativo; 3-11) produtos da amplificação do gene GAPDH de amostras de cDNA de pacientes por PCR em tempo real

3.8 Análise imuno-histoquímica

Todas as análises imuno-histoquímicas foram realizadas no setor de patologia do Instituto Adolfo Lutz, sob a supervisão do Prof. Dr. Venâncio Avancini.

3.8.1 Análise imuno-histoquímica para NIS

A localização celular da proteína NIS foi realizada pela técnica de imuno-histoquímica. O tecido obtido foi fixado em formol a 4% tamponado, embebido em parafina e seccionado a 3 µm em lâminas silanizadas. Após desparafinização e re-hidratação, o material seccionado foi submetido à recuperação antigênica por calor úmido sob pressão, em tampão citrato 10mM / pH6,0 e em panela de pressão por três minutos. Em seguida, o material foi incubado em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, em dois banhos de 5 minutos cada (para inativar a atividade da peroxidase endógena) e, após lavagens em água destilada e solução salina tamponada com fosfatos (PBS, 10mM pH 7,4), foi incubado com soro normal (não imune) de cabra a 10% em PBS (para bloquear sítios antigênicos não específicos). Seguiu-se etapa de incubação com anticorpo primário monoclonal anti-NIS humano (clone FP5A), diluído a 1:1000 em solução de soro-albumina bovina a 1% em PBS, inicialmente por 30 minutos a 37° C e depois por 18 horas a 4° C, em câmara úmida. O material foi lavado três vezes em tampão PBS e então incubado com sistema de amplificação anti-imunoglobulinas de camundongo conjugadas com peroxidase (*kit Dako EnVision System-peroxidase*, Dako, Glostrup, Dinamarca) por 60 minutos, a 37°C em câmara úmida. O material foi novamente submetido a lavagens em PBS para ser incubado com solução contendo substrato cromogênico (peróxido de hidrogênio 0,1% + diaminobenzidina 100 mg%), seguido de contra-coloração e montagem para microscopia.

O anticorpo anti-NIS utilizado neste estudo reconhece as seqüências de aminoácidos 37 a 54 do segundo domínio intracelular e 625 a 643 da região carboxi-terminal da proteína NIS e foi gentilmente cedido pelo Dr. Jonh Morris (Mayo Clinic, Rochester, EUA) que o desenvolveu^{36,39}.

3.8.2 Análise imuno-histoquímica para TPO e rTSH

Para a pesquisa da tireoperoxidase (TPO) e receptor de hormônio tireoestimulante (rTSH), o material empregado foi submetido aos mesmos procedimentos iniciais realizados para a detecção da proteína NIS.

Os anticorpos monoclonais anti-receptor de TSH (clone 4C1/E1/G8, LabVision, Califórnia, EUA) e anti-TPO (Clone MoAb47, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), foram empregados diluídos a 1:100 e a 1:500, respectivamente. O material foi incubado com os anticorpos primários em câmara úmida, inicialmente a 37° C por 30 minutos e por 18 horas a 4° C. Posteriormente, procederam-se 3 lavagens com solução salina tamponada com Tris 0,05M / pH 7,4 (TBS), de 5 minutos cada e aplicou-se o sistema de amplificação anti-imunoglobulinas de coelho e de camundongo conjugadas com fosfatase alcalina (*Dako EnVision System AP*, Dako, Glostrup, Dinamarca). Realizou-se outra incubação a 37°C, por 60 minutos em câmara úmida, seguida de novas lavagens com TBS e aplicou-se o cromógeno *Red Fast* (fornecido pelo *kit EnVision*). Após incubação de 2 minutos seguiu-se nova etapa de lavagens em água destilada e contra coloração (leve) com hematoxilina. Após lavagens, as lâminas foram montadas para microscopia, inicialmente com meio de montagem de base aquosa *Dako Ultramount*

(Dako, Califórnia, EUA) e, posteriormente, com meio permanente *Entellan* (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.8.3 Avaliação da imuno-positividade das proteínas

A avaliação da expressão protéica de NIS, rTSH e TPO foi realizada seguindo os seguintes parâmetros:

- 0: ausência de reação;
- 1+ : até 20% de células positivas;
- 2+ : de 21 a 49% de células positivas;
- 3+ : acima de 50% de células positivas.

Toda a análise imuno-histoquímica foi realizada por dois patologistas experientes que não tinham acesso aos dados dos pacientes. O resultado final foi obtido através do consenso de ambos.

3.9 Análise Estatística

Para responder os objetivos do estudo foram utilizados os seguintes testes:

- Teste do sinal de Wilcoxon⁵⁰: para comparar a expressão gênica do NIS entre tecido tumoral e não tumoral dentro do grupo de nódulos benignos, dentro do grupo de nódulos malignos e dentro de cada um dos quatro grupos histológicos (bócio colóide, adenoma folicular, carcinoma papilífero e carcinoma folicular);

- Teste de Mann-Whitney⁵⁰: para avaliar a tireoglobulina, iodúrias, para comparar a expressão gênica do NIS entre os tecidos tumorais benignos e malignos entre si e para comparar os tecidos não tumorais;
- Teste de Kruskal-Wallis⁵⁰: para comparar a expressão gênica do NIS de todos os tipos histológicos de nódulos benignos entre si e também de todos os tipos histológicos de carcinoma entre si;
- Correlações de Spearman⁵⁰: para verificar se existe correlação entre a quantificação gênica utilizando os dois genes controles internos;
- Teste exato de Fisher e teste do qui-quadrado de homogeneidade⁵¹: para verificar se as características ultra-sonográficas dos nódulos benignos e malignos são diferentes e para verificar se alguma característica imuno-histoquímica está associada a algum tipo de tumor.

Todos os resultados foram fornecidos como mediana (mediana; valor mais baixo – valor mais alto). Foram considerados significantes valores com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Características dos pacientes

Dentre os 30 pacientes, 76,7% (23/30) eram do sexo feminino e 23,3% (7/30) do sexo masculino. A idade dos pacientes variou de 20 a 75 anos (48 anos), o tempo de evolução da doença variou de 4 meses a 15 anos (3 anos) e havia cinco portadores de hipotireoidismo clínico em tratamento com levotiroxina (Tabela 2).

No grupo de pacientes com nódulos malignos a idade variou de 25 a 75 anos (43,5 anos) e o tempo de doença variou de 4 meses a 10 anos (2 anos). Havia três pacientes com hipotireoidismo clínico.

No grupo de pacientes com nódulos benignos a idade variou de 20 a 74 anos (49 anos) e o tempo de evolução da doença variou de 1 a 15 anos (4 anos). Havia apenas dois pacientes com hipotireoidismo clínico.

Os dois grupos foram homogêneos quanto à idade, sexo e número de portadores de hipotireoidismo clínico, mas o tempo de evolução da doença foi menor nos pacientes com tumor maligno.

Tabela 2 - Dados clínicos dos pacientes

PACIENTE	SEXO	IDADE	TEMPO DE DOENÇA	REPOSIÇÃO COM LEVOTIROXINA
1	F	59	2 anos	Não
2	F	49	15 anos	Não
3	F	34	3 anos	Não
4	F	39	2 anos	Não
5	F	67	13 anos	Não
6	M	60	5 anos	Não
7	M	74	10 anos	Não
8	F	49	5 anos	Não
9	F	34	2 anos	Sim
10	M	60	1 ano	Não
11	M	20	4 anos	Sim
12	F	38	4 anos	Não
13	F	30	7 anos	Não
14	F	57	3 anos	Não
15	F	68	3 anos	Não
16	F	25	6 meses	Sim
17	M	31	1 ano	Não
18	F	40	1 ano	Não
19	F	75	9 meses	Não
20	F	49	4 meses	Sim
21	F	57	2 anos	Sim
22	F	49	2 anos	Não
23	F	47	1 ano	Não
24	F	40	2 anos	Não
25	F	31	3 anos	Não
26	F	26	9 anos	Não
27	M	27	3 anos	Não
28	M	48	7 meses	Não
29	F	73	3 anos	Não
30	F	39	10 anos	Não

4.2 Exames laboratoriais

Com relação à função tireoidiana (Tabela 3), notou-se que somente dois pacientes apresentaram TSH acima do limite da normalidade, entretanto, em

ambos, a dosagem de T4 livre era normal. Três pacientes apresentaram TSH baixo, sendo que um deles também estava com T4 livre alto, pois tinha hipotireoidismo e estava em tratamento com levotiroxina.

Identificaram-se oito pacientes com anticorpos anti-tiroperoxidase e/ou anti-tireoglobulina positivos, incluindo todos os que apresentavam hipotireoidismo clínico e faziam reposição com levotiroxina.

A tireoglobulina pré-operatória variou de 9,2 a 6.270 ng/mL (101 ng/mL) e, em três pacientes, sua dosagem foi prejudicada em virtude da presença de anticorpos anti-tireoglobulina. Os valores de tireoglobulina dos portadores de nódulos benignos (78,9 ng/mL) foi inferior ao valor dos portadores de nódulos malignos (165 ng/mL), mas não houve diferença estatística entre eles porque a variação dentro de cada grupo foi muito grande ($p=0,535$).

4.3 Anátomo-patológico

Com relação ao diagnóstico anátomo-patológico, 53,3% (16/30) dos pacientes eram portadores de nódulos malignos (13 carcinomas papilíferos e 3 carcinomas foliculares) e 46,7% (14/30) eram portadores de nódulos benignos (9 bócios e 5 adenomas foliculares).

A descrição dos tipos histológicos de todos os pacientes está apresentada na Tabela 4.

Tabela 3 - Exames laboratoriais da função tireoidiana dos pacientes

PACIENTE	T3 70-200 ng/dL	T4 4,5- 12 µg/dL	T4 L 0,6-1,54 ng/dL	TSH 0,5-4,2 µU/mL	ANTI-TG <35 U/ML	ANTITPO <35 U/mL	TG 1,7-35 ng/mL	TRAB <12%
1	146	11,9	1,3	1,29	11,83	<35	69	38%
2	149	10,4	1,2	1,71	<35	224	28,4	<12%
3	132	7,1	1,0	1,18	<35	<35	1380	ND
4	119	8,7	1,1	0,84	<35	<35	406	<12%
5	117	12	1,8	1,32	<35	<35	81,9	<12%
6	112	5,6	ND	3,73	ND	971	26,7	ND
7	107	8,0	1,0	0,99	<35	<35	26,2	<12%
8	195	11,9	0,9	0,42	<35	<35	ND	ND
9	150	10,7	1,1	1,83	298	>3000	14,4	12%
10	99	8,9	1,2	0,67	<35	<35	518	ND
11	119	12,5	1,6	1,13	ND	ND	ND	ND
12	163	11,7	1,3	2,84	<35	<35	75,9	<12%
13	139	6,3	0,8	0,27	<35	<35	101	<12%
14	137	8,3	1,1	0,64	<35	<35	173	<12%
15	123	7,9	1,0	3,04	855	<35	PREJ	<12%
16	155	14,1	2,5	0,11	<35	911	9,2	<12%
17	140	8,8	1,2	0,89	<35	64	1710	13%
18	117	8,1	0,9	2,83	<35	<35	146	17%
19	109	10,2	1,4	1,47	<35	<35	12,4	<12%
20	97	8,0	1,0	1,60	93	>3000	PREJ	<12%
21	115	6,1	1,0	0,75	>3000	877	PREJ	<12%
22	103	7,4	1,2	1,63	<35	<35	36,4	<12%
23	133	9,3	0,9	0,90	<35	<35	227	21%
24	117	8,4	1,2	6,84	<35	<35	41,8	<12%
25	138	9,4	0,9	1,20	<35	<35	165	<12%
26	138	9,7	1,0	1,04	<35	<35	305	<12%
27	143	9,6	1,0	1,04	<35	<35	175	<10%
28	176	10,7	1,3	1,96	<35	<35	6270	<12%
29	ND	ND	0,8	5,80	Neg	Neg	465	ND
30	117	8,2	1,2	2,57	<35	<35	56,3	14%

ND: não disponível; Neg: negativo; PREJ: dosagem prejudicada

Tabela 4 - Diagnóstico anátomo-patológico

PACIENTE	ANÁTOMO-PATOLÓGICO
1	Bócio Colóide Multinodular + Tireoidite Crônica
2	Bócio Colóide Multinodular 4cm + Tireoidite + Microcarcinoma Esclerosante Oculto 0,6 cm
3	Lobo Direito: Bócio Colóide Nodular 4,1 x 3,2cm + Carcinoma Papilífero variante folicular 0,6 x 0,3cm LoboEsquerdo: Bócio Colóide Nodular
4	Bócio Colóide com focos de hemorragia antiga
5	Bócio Colóide + Bócio Adenomatoso Difuso com áreas foliculares com diferenciação do tipo de células de Hürthle
6	Bócio Colóide Nodular com hiperplasia folicular no lobo direito
7	Bócio colóide multinodular
8	Bócio Colóide
9	Adenoma Folicular + Tireoidite Crônica
10	Adenoma Folicular
11	Adenoma Folicular
12	Adenoma Folicular
13	Bócio Adenomatoso com hiperplasia pseudopapilífera
14	Adenoma Folicular + Bócio Colóide
15	Carcinoma Papilífero + Tireoidite Crônica + Áreas com aspecto hiperplásico
16	Carcinoma Papilífero + Tireoidite Crônica
17	Carcinoma Papilífero
18	Carcinoma Papilífero variante esclerosante difuso
19	Carcinoma Papilífero variante de células altas
20	Carcinoma Papilífero em lobo direito e istmo
21	Carcinoma Papilífero clássico com áreas de variante folicular multicêntrico em ambos os lobos + Adenoma Folicular + Tireoidite Crônica
22	Carcinoma Papilífero em lobo direito de 0,5 cm e esquerdo de 1,1 cm
23	Carcinoma Papilífero em lobo direito de 0,6 cm e esquerdo de 1,5 cm + Bócio Colóide
24	Carcinoma Papilífero variante com estroma do tipo fasceíte nodular de 5 cm em lobo esquerdo + Bócio Adenomatoso em lobo direito
25	Carcinoma Papilífero
26	Carcinoma Papilífero variante de células claras
27	Carcinoma Papilífero variante folicular e oncocítica de 7x 6,7 x 5,3 cm
28	Carcinoma de Células de Hürthle de 5,5 x 3,5 x 3 cm
29	Carcinoma Folicular de 6,2 cm + Bócio Adenomatoso Multinodular + Tireoidite Crônica
30	Carcinoma Folicular de 3,5 cm + Carcinoma Papilífero variante folicular multicêntrico de 0,4 cm a direita e 0,3 cm a esquerda + Bócio Colóide

4.4 Dados ultra-sonográficos

Os dados ultra-sonográficos mostrados na Tabela 5 se referem ao nódulo de onde se colheu a amostra para realização do RT-PCR e imuno-histoquímica.

A calcificação foi a única característica ultra-sonográfica estatisticamente diferente entre os nódulos malignos e benignos e apareceu exclusivamente em seis pacientes do primeiro grupo ($p= 0,020$).

4.5 Cintilografia

A cintilografia com iodo-123 foi realizada em 83,3% (25/30) dos pacientes e mostrou que todos (15/15) os nódulos malignos e 85,7% (8/10) dos nódulos benignos eram hipocaptantes (Tabela 6).

Um paciente apresentou nódulo hipercaptante e o outro, nódulo normocaptante.

4.6 Iodúrias

As dosagens de iodo urinário foram realizadas em 76,7% (23/30) dos pacientes e estava: baixa em 8,7% (2/23) dos casos, normal em 56,5% (13/23) e elevada em 34,8% (8/23) dos casos (Tabela 6). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as iodúrias dos pacientes com

nódulos benignos (186 µg/L; 42-384 µg/L) e malignos (246 µg/L; 108 - 486 µg/L) (p= 0,159).

Tabela 5 - Aspectos ultra-sonográficos dos nódulos de tireóide

Paciente	Loc	Text	Ecogenic	Tam (cm)	Cont	Halo	Calcific	Grau	Outras lesões
1	D	S	Iso	4 x 3 x 3	IR	Não	Não	III	
2	D	M		5 x 4,3	R	Não	Não	II	
3	D	SAL	Iso	2,7x2,6x3,7	R	Sim	Não	III	
4	D	M		5,4x2,7x3,3	R	Não	Não	II	
5	D	S	Hipo	2 x1,5x1,5	R	Não	Não	III	M E
6	D	CPS		1,3x0,9x1,2	R	Não	Não	III	2 C D
7	E	S	Hipo	5,4x3,8x3,7	R	Não	Não	III	M 9mm D
8	E	M		6,3 x3,5 x4,5	R	Não	Não	II	C 5 mm D
9	D	S	Hipo	2,6 x2,1 x3,2	R	Sim	Não	III	
10	D	S	Hipo	4 x 2,3 x 3,9	R	Não	Não	III	
11	E	S	Hipo	1	R	Sim	Não	III	
12	E	S	Iso	4 x 1,8 x 2,9	R	Não	Não	III	
13	E	SAL	Iso	3,3x1,7x2,7	R	Não	Não	III	MD9x7mm
14	D/I	S	Hipo	2 x 1 x 1,5	R	Não	Não	III	2 C D
15	D	S	Hipo	3 x 2 x 2	IR	Não	Sim	IV	
16	D	S	Iso	1,4 x 1	R	Sim	Não	III	
17	D	S	Hipo	2,6 x1,7x2	IR	Não	Sim	IV	LD e E2cm
18	E	S	Hipo	1,8	IR	Não	Não	III	
19	E	S	Hipo	3 x2,7x2,8	IR	Não	Sim	III	
20	E	S		2,3x1,9 x1,3	R			III	
21	E	S	Hipo	1,8	IR	Não	Sim	IV	M5x3,5x4cm
22	E	S	Hipo	1,8x1,5x1,8	IR	Não	Não	III	
23	E	S	Hipo	1,8	R	Não	Sim	III	
24	E	S	Hipo	7x3,3x4,7	R	Não	Não	III	
25	D	S	Hipo	3,5x2,1x3	R	Não	Não	III	
26	D	SAL	Hipo	10x6x11,5	R	Não	Não	III	
27	D	M		7x4x4,3	R	Não	Não	II	
28	E	S	Hipo	4,8x3,8x3,4	IR	Parcial	Sim macro	IV	CD3x2x3m m
29	D	S	Hipo	5,7x2,9x2,3	R	Não	Não	III	
30	E	S	Iso	5x2,5x3,5	R	Não	Não	III	M D 7mm

C: cisto; Calcific: calcificação; Cont: contorno; CPS: cisto com projeção sólida; D: lobo direito; E: lobo esquerdo; Ecogenic: ecogenicidade; Hipo: hipoecóico; I: istmo; L: linfonodo; Loc: localização; M: misto; IR: irregular; Iso: isoecóico; R: regular; S:sólido; SAL: sólido com área líquida; Tam: tamanho; Text: textura

Tabela 6 - Resultados da expressão gênica do NIS, cintilografias e iodúrias

PACIENTE	EXPRESSÃO GÊNICA NIS/GAPDH		EXPRESSÃO GÊNICA NIS/PSMC6		CINTILOGRAFIA	IODÚRIA 100-300 µg/L
	NT	T	NT	T		
1	28,196	1,556	2,549	0,107	frio	186
2	1,937	0,735	0,253	0,078	frio	132
3	4,974	0,0004	4,112	0,005	frio	78
4	403,392	0,014	0,966	0,001	frio	42
5	175,515	16,324	0,202	0,036	frio	210
6	62,492	0	0,071	0,000	ND	ND
7	0,190	0,029	0,052	0,024	frio	108
8	9,577	0,039	1,619	0,046	ND	ND
9	2,320	0,021	0,418	0,006	frio	348
10	0,630	0,199	0,066	0,005	ND	ND
11	0,906	5,762	0,605	1,202	ND	ND
12	4,520	0,258	0,319	0,012	frio	ND
13	20,571	547,348	3,063	169,483	hipercaptante	384
14	0,034	0,119	0,004	0,042	normocaptante	198
15	19,914	0,035	5,579	0,043	frio	186
16	3,424	1,126	0,019	0,107	frio	156
17	153,728	15,968	0,337	0,779	frio	378
18	323,650	20,580	16,564	0,034	frio	324
19	214,284	0,407	0,940	0,069	frio	210
20	5239,227	0,034	1,945	0,001	frio	ND
21	2,748	0,721	0,847	0,001	frio	108
22	2953,72	0,252	0,812	0,054	frio	336
23	30,991	0,004	5,242	0,003	frio	144
24	1198,86	0,005	0,138	0,000	frio	174
25	903,731	0,002	0,396	0,000	frio	282
26	35,408	0,058	2,898	0,023	frio	432
27	0,007	0,001	0,002	0,002	frio	486
28	1,284	0,007	0,001	0,001	frio	432
29	80,986	0	1,597	0,000	ND	ND
30	0,260	0,022	0,000	0,001	frio	150

ND: não disponível; NT: não-tumoral; T: tumoral

4.7 Quantificação da expressão gênica do NIS

4.7.1 Quantificação gênica com o GAPDH

Utilizando-se o gene GAPDH como controle interno observou-se que os níveis de expressão do NIS apresentaram-se diminuídos em 90% (27/30) de todos os tecidos nodulares, em relação ao tecido não-nodular ($p < 0,001$). A análise dos resultados do grupo benigno ou maligno separadamente revelou

que, em 100% (16/16) dos nódulos malignos e em 78,6% (11/14) dos benignos houve menor expressão gênica no tumor do que no tecido não-tumoral (Tabela 6). Somente em 21,4% (3/14) das amostras benignas (pacientes 11, 13 e 14) se observou maior expressão do NIS no tecido nodular quando comparadas com o tecido não-nodular. O paciente 11 era portador de hipotireoidismo, estava em uso de levotiroxina e encontrava-se com nível de T4 livre acima da normalidade. O paciente 13 era portador de nódulo hipercaptante e teve aumento da expressão de NIS no tumor de 26 vezes e o pacientes 14 era portador de nódulo normocaptante e teve aumento da expressão de 3 vezes (Gráfico 3).

Gráfico 3. Gráfico de comparação de expressão gênica do NIS, utilizando GAPDH como controle interno, entre os tecidos tumorais e não-tumorais de pacientes com nódulos benignos e malignos. As linhas coloridas representam os pacientes que tiveram aumento da expressão gênica no tumor; --Paciente 18; --Paciente 11; --Paciente 14

Dentre os tipos histológicos benignos, observou-se que 88,9% (8/9) dos bócios tinham expressão de NIS diminuída quando comparada com a expressão do tecido não-nodular. Em 44,4% (4/9) deles a diminuição foi próxima de 100%, em 11,1% (1/9) foi de mais de 90%, em 11,1% (1/9) foi de mais de 80%, em 11,1% (1/9) foi maior que 60% e em 11,1% (1/9) foi menor que 50%. Dos cinco adenomas foliculares, houve diminuição do RNAm do NIS em três (60%) deles, sendo de quase 100% em um caso, de mais de 90% em outro e de 68,3% no último.

A expressão gênica de todos os nódulos benignos (0,15 UA; 0 - 547,35 UA) não foi diferente da expressão do tecido não-nodular (4,7 UA; 0,03 - 403,4 UA) ($p= 0,056$), mas, excluindo-se os pacientes sabidamente portadores de nódulos captantes, esta expressão foi significativamente menor nos tecidos tumorais ($p= 0,010$). A diferença estatística se manteve no grupo de pacientes com bócio ($p= 0,012$), mas não no grupo dos adenomas foliculares ($p= 0,715$).

A expressão gênica dos tumores malignos (0,03 UA; 0 - 20,6 UA) foi estatisticamente menor que a expressão nos tecidos não-tumorais correspondentes (58,2 UA; 0,07 - 5239,2 UA) ($p< 0,001$). A comparação entre o tecido tumoral e não tumoral dos carcinomas papilíferos e foliculares separadamente mostrou que a diferença estatística se manteve apenas no grupo dos carcinomas papilíferos, com $p=0,001$ e $p=0,109$, respectivamente, o que pode ter decorrido da pequena casuística dos carcinomas foliculares. Também não houve diferença estatística ao se analisar os dois grupos entre si ou os subtipos de carcinoma ($p= 0,296$).

Não foi encontrada diferença estatística entre a expressão gênica dos tumores benignos (0,16 UA; 0 - 547,35 UA) *versus* malignos (0,04 UA; 0 - 20,6 UA) ($p= 0,4$), ou seja, verificou-se diminuição da expressão gênica na maioria dos nódulos, independentemente de serem benignos ou malignos.

Apesar de se detectar grande variação nos valores de expressão gênica dos tecidos não-tumorais, não houve diferença estatística entre a expressão dos tecidos não-tumorais dos pacientes com nódulos benignos e malignos ($p= 0,077$).

Não foi encontrada alteração significativa na expressão gênica das amostras tumorais ($p= 0,264$) e não-tumorais ($p= 0,483$) dos pacientes que faziam reposição com levotiroxina, quando comparados com a expressão gênica de todos os outros.

4.7.2 Quantificação gênica com o PSMC6

A expressão gênica do NIS, utilizando o gene PSMC6 como controle interno, foi menor em 80% (24/30) e maior em 20% (6/30), de todos os tumores, em comparação com o tecido não-tumoral ($p= 0,001$) (Tabela 6) (Gráfico 4). A expressão gênica dos nódulos benignos (0,03 UA; 0 - 169,5 UA) não foi diferente da expressão do tecido não-tumoral (0,37; 0,004 - 4,11 UA) ($p= 0,084$), mas foi significativamente menor quando se excluíram os pacientes portadores de nódulos captantes ($p= 0,015$).

Gráfico 4. Gráfico de comparação de expressão gênica do NIS utilizando PSMC6 como controle interno, entre os tecidos tumorais e não- tumorais de pacientes com nódulos benignos e malignos. As linhas coloridas representam os pacientes que tiveram aumento da expressão gênica no tumor. --Paciente 18; -- Paciente 11; -- Paciente 14; -- Paciente 17; -- Paciente 16; -- Paciente 30

Dentre os nódulos benignos, 78,6% (11/14) apresentaram diminuição da expressão gênica e 21,4% (3/14) apresentaram maior expressão gênica no tumor quando comparado com o tecido não-tumoral. Os pacientes que apresentaram maior expressão no tumor (pacientes 11, 13 e 14) também tiveram maior expressão quando foi utilizado o gene GAPDH como controle interno. A amostra tumoral do paciente 13 apresentou aumento da expressão de NIS de 55 vezes e a do paciente 14 um aumento da expressão de 10 vezes.

Em relação aos subtipos dos tumores benignos, observou-se diminuição da expressão em 88,9% (8/9) dos bócios. Em três deles a diminuição se aproximou de 100%, em dois foi de mais de 90%, em um foi de mais de 80% e em dois foi de mais de 50%.

Dentre os adenomas foliculares, houve diminuição da expressão em 60% (3/5) dos casos e em todos eles, a diminuição foi de mais de 90%.

A análise estatística da expressão dos bócios e adenomas foliculares coincidiu com os achados de expressão com o GAPDH: diminuição significativa da expressão nos bócios ($p=0,012$), mas não nos adenomas ($p=0,715$). Esta diferença não se mantém quando os pacientes com nódulo captantes são incluídos na casuística ($p=0,110$ e $p=0,686$, respectivamente).

Já, nos carcinomas, houve diminuição da expressão maior que 90% em 81,2% (13/16) dos casos. Em 18,75% (3/16) dos carcinomas houve maior expressão no tumor do que no tecido não-tumoral, o que divergiu dos achados da quantificação obtidos com o GAPDH. Em um dos casos (paciente 16) o paciente estava em tratamento com dose elevada de levotiroxina, como mostra o T4 livre. No paciente 30 deve-se observar que a expressão gênica tanto no tecido tumoral como no tecido não-tumoral foi muito baixa.

A análise estatística da expressão gênica de todos os nódulos malignos (0,002 UA; 0 - 0,779 UA) *versus* o tecido não-tumoral (0,82UA; 0 - 16,6 UA) mostrou que houve redução significativa da expressão nos tumores ($p=0,005$), todavia, essa diferença ocorreu apenas nos portadores de carcinoma papilífero ($p=0,007$) e não nos carcinomas foliculares ($p=0,593$), de forma

semelhante ao resultado obtido com o GAPDH. Não houve diferença de expressão entre os vários tipos de carcinoma entre si ($p= 0,118$), nem tampouco entre nódulos benignos e malignos ($p= 0,275$).

Não se encontrou diferença estatisticamente significativa entre a expressão gênica dos tecidos não-tumorais pareados dos nódulos benignos e malignos ($p= 0,154$).

Não foi encontrada diferença significativa na expressão gênica das amostras tumorais ($p= 0,483$) e não-tumorais ($p> 0,999$) dos pacientes que faziam reposição com levotiroxina, quando comparados com os outros pacientes.

4.7.3 Correlação entre os genes GAPDH e PSMC6

Houve concordância entre a quantificação da expressão gênica do NIS pelo GAPDH e PSMC6 em 90% (27/30) de todos os casos.

A correlação de Spearman mostrou que existe correlação significativa entre a expressão tumoral com o gene GAPDH e o gene PSMC6 tanto para os nódulos benignos ($p< 0,001$) como para os nódulos malignos ($p= 0,001$).

4.8 Análise imuno-histoquímica

4.8.1 Análise imuno-histoquímica para NIS

A análise da localização da proteína NIS nos 30 pacientes revelou que ela foi positiva no citoplasma em 100% das amostras não tumorais, em

100% dos nódulos benignos e em 93,75% (15/16) dos nódulos malignos, não sendo estatisticamente diferentes entre si ($p= 0,063$). A única amostra de carcinoma que não mostrou expressão da proteína NIS (paciente 24) tratava-se de carcinoma papilífero variante fásceíte nodular, tipo histológico raro, constituído de traves fibróticas (Tabela 7).

A positividade na membrana basolateral ocorreu em 23,3% (7/30) das amostras não tumorais, em 14,3% (2/14) dos nódulos benignos e em 12,5% (2/16) dos nódulos malignos (Figura 7), não se detectando diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p= 0,163$).

Figura 7. Imuno-histoquímica para NIS em amostra de bócio colóide. Notar a imuno-expressão na membrana lateral

Tabela 7 - Resultado da imuno-histoquímica para NIS, receptor de TSH e tireoperoxidase

	NIS						rTSH		TPO	
	NT			T			NT	T	NT	T
	C	MB	MA	C	MB	MA				
1	1+	0	1+	1+	0	0	1+	1+	1+	2+
2	2+	0	0	3+	1+	0	1+	1+	2+	2+
3	1+	0	0	2+	0	0	2+	2+	1+	2+
4	1+	0	0	2+	0	0	0	1+	1+	1+
5	1+	0	0	2+	0	0	1+	1+	2+	2+
6	1+	1+	0	1+	0	0	2+	2+	1+	1+
7	1+	0	0	1+	0	0	1+	2+	2+	2+
8	1+	0	0	3+	0	0	0	1+	1+	2+
9	2+	0	0	3+	0	0	0	2+	2+	3+
10	1+	0	0	1+	0	0	1+	0	2+	1+
11	1+	0	0	1+	0	0	1+	0	1+	0
12	1+	0	0	3+	0	0	3+	3+	1+	3+
13	1+	0	0	2+	3+	0	0	1+	1+	2+
14	1+	0	0	2+	0	0	2+	0	2+	3+
15	1+	1+	0	3+	0	0	1+	1+	2+	0
16	1+	0	0	2+	0	0	0	1+	0	0
17	1+	0	0	3+	1+	0	1+	1+	2+	0
18	1+	0	0	3+	0	0	2+	1+	2+	0
19	1+	0	0	2+	0	0	1+	1+	2+	0
20	1+	0	0	3+	1+	0	2+	1+	2+	1+
21	2+	0	0	3+	0	0	1+	1+	2+	0
22	1+	1+	0	2+	0	0	1+	1+	1+	0
23	1+	1+	0	3+	0	0	1+	2+	1+	0
24	1+	1+	0	0	0	0	1+	0	2+	0
25	1+	0	0	2+	0	0	1+	1+	2+	0
26	1+	0	0	2+	0	0	0	0	0	0
27	1+	1+	0	2+	0	0	1+	0	3+	0
28	1+	0	0	3+	0	0	1+	1+	1+	2+
29	1+	0	0	1+	0	0	2+	0	1+	1+
30	1+	1+	0	2+	0	0	1+	1+	2+	2+

C: citoplasma; MA: membrana apical; MB: membrana basal; NT: não-tumoral; rTSH: receptor de TSH; T: tumor; TPO: tireoperoxidase. Escore da imuno-expressão: 0: ausência de reação; 1+ : até 20% de células positivas; 2+ : de 21 a 49% de células positivas; 3+ : acima de 50% de células positivas

A comparação da intensidade da imuno-expressão do NIS no citoplasma entre todos os nódulos *versus* todos os tecidos não-nodulares revelou que esta característica estava presente em 76,7% (23/30) dos nódulos, sendo estatisticamente significante ($p= 0,005$).

A comparação da intensidade da imuno-expressão do NIS no citoplasma dos nódulos benignos *versus* os tecidos não-nodulares mostrou que ela foi

maior em 64,3% (9/14) dos nódulos benignos e igual em ambos os tecidos em 35,7% (5/14) dos casos ($p= 0,424$) (Gráfico 5).

Gráfico 5. Gráfico de comparação da imuno-expressão citoplasmática da proteína NIS no tecido tumoral e não-tumoral de pacientes portadores de nódulos benignos. O eixo das ordenadas representa os níveis citoplasmáticos de NIS apresentados em escores: 1+, 2+ e 3+

Já, nos tumores malignos, a intensidade da imuno-expressão do NIS no citoplasma foi maior no tumor em 87,5% (14/16) dos casos, igual em 6,25% (1/16) dos casos e menor em 6,25% (1/16) (Gráfico 6). A comparação entre os nódulos malignos que tiveram maior imuno-expressão do NIS no citoplasma versus os nódulos malignos que não tiveram esta característica mostrou diferença estatisticamente significativa ($p= 0,04$).

Gráfico 6. Gráfico de comparação da imuno-expressão citoplasmática da proteína NIS no tecido tumoral e não-tumoral de pacientes portadores de nódulos malignos. O eixo das ordenadas representa os níveis citoplasmáticos de NIS apresentados em escores: 0, 1+, 2+ e 3+

No paciente portador de nódulo hipercaptante (paciente 13) a positividade no citoplasma também foi maior na amostra tumoral, porém ocorreu uma positividade ainda mais forte na membrana plasmática basolateral.

4.8.2 Análise imuno-histoquímica para receptor de TSH

Observou-se que 80% (24/30) das amostras não tumorais, 78,6% (11/14) dos tumores benignos e 75% (12/16) dos tumores malignos apresentaram expressão para o receptor de TSH (Tabela 7), não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p= 0,813$). Das seis

amostras não tumorais com ausência de expressão, quatro corresponderam a pacientes em uso de levotiroxina e/ou TSH suprimido.

A análise de todos os nódulos benignos revelou que houve igual expressão no tumor e no tecido não-tumoral em 42,8% (6/14), maior expressão no tumor em 35,7% (5/14) e menor expressão no tumor em 21,4% (3/14), não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Dentre os tipos histológicos benignos observou-se que a expressão esteve presente em todos os bócios, mas foi ausente em três adenomas foliculares.

Nos tumores malignos houve igual expressão entre tumor e tecido não-tumoral em 56,25% (9/16) dos casos (incluindo um paciente cuja expressão foi negativa em ambos tecidos), maior expressão no tumor em 12,5% (2/16) dos casos e menor expressão no tumor em 31,25% (5/16) dos casos, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Quatro amostras tumorais (pacientes 24, 26, 27 e 29) não expressaram o receptor, incluindo um paciente que teve ausência de expressão tanto na amostra tumoral como na não-tumoral (paciente 26). A paciente 24, corresponde à portadora do carcinoma papilífero variante fasceíte nodular.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os achados dos nódulos malignos e benignos ($p = 0,364$).

A porcentagem de amostras não-tumorais que apresentaram imuno-expressão para rTSH maior que um (1+) [29,2% (7/24)] *versus* as outras amostras não-tumorais [70,8% (17/24)] não foi estatisticamente diferente ($p =$

0,064). Também não foi diferente a porcentagem de nódulos benignos que tinham intensidade de imuno-expressão maior que um (1+) [45,6% (5/11)] *versus* os outros nódulos benignos [54,4% (6/11)] ($p > 0,999$), contudo constatou-se que a porcentagem de nódulos malignos que tinham intensidade de expressão maior que um (1+) [8,3% (1/12)] *versus* os outros nódulos malignos [91,7% (11/12)] foi estatisticamente menor ($p = 0,006$).

O paciente portador de nódulo hipercaptante (paciente 13), apresentou expressão leve somente no tumor e não no tecido não-tumoral, enquanto que o paciente portador de nódulo normocaptante (paciente 14) não apresentou expressão no tecido tumoral.

Figura 8. Imuno-histoquímica para rTSH em amostra de carcinoma folicular (A) e amostra não tumoral controle (B)

4.8.3 Análise imuno-histoquímica para TPO

Observou-se presença de imuno-expressão para TPO em 93,33% (28/30) das amostras não tumorais, 92,9% (13/14) dos nódulos benignos e em apenas 25% (4/16) dos nódulos malignos (Tabela 7). Houve diferença estatisticamente significativa quando se comparou os nódulos benignos e

malignos entre si ($p < 0,001$) e quando se comparou os malignos com os tecidos não-tumorais ($p < 0,001$).

A comparação da intensidade da imuno-expressão dos nódulos benignos com o tecido não-tumoral revelou que: em 50% (7/14) dos casos, houve maior expressão no tumor que no tecido não-tumoral; em 35,7% (5/14) dos casos houve igual expressão em ambos os tecidos e em 14,3% (2/14) houve maior expressão no tecido não-tumoral, incluindo neste grupo a única amostra tumoral que foi negativa para TPO (paciente 11), e que correspondeu ao portador de hipotireoidismo que estava em tratamento com dose elevada de levotiroxina (como mostra o T4 livre).

A comparação da intensidade da imuno-expressão dos nódulos malignos com o tecido não-tumoral, revelou maior imuno-expressão no tecido não-tumoral em 68,8% (11/16) dos casos (incluindo as 10 amostras tumorais que foram negativas para TPO), menor imuno-expressão no tecido não-tumoral em apenas um caso (6,3%) e igual imuno-expressão em 25% (4/16) dos casos (incluindo neste último grupo dois pacientes que não apresentaram imuno-expressão tanto no tecido tumoral como no não-tumoral).

Os pacientes portadores de nódulos funcionantes apresentaram maior expressão no tecido tumoral, quando comparados com o tecido não-tumoral.

Figura 9. Imuno-histoquímica para TPO em amostra de carcinoma folicular (A) e amostra não tumoral controle (B)

4.8.4 Correlação entre quantificação gênica e imuno-histoquímica

Dentre os nódulos benignos, notou-se associação entre diminuição da quantificação gênica tumoral e aumento da imuno-expressão da proteína NIS no citoplasma tumoral em 50% (7/14) dos casos (Gráfico 7). Em 28,6% (4/14) dos casos, houve associação entre diminuição da expressão gênica e igual imuno-expressão da proteína NIS no citoplasma do tumor *versus* o tecido não-tumoral. Em 14,3% (2/14) dos casos, houve associação entre aumento da expressão gênica e aumento da imuno-expressão da proteína NIS no citoplasma, correspondendo aos pacientes portadores de nódulos captantes. Finalmente, em apenas um caso (7,1%), houve associação entre aumento da expressão gênica e igual imuno-expressão da proteína NIS no citoplasma. Os resultados foram os mesmos, independente do controle interno utilizado na quantificação da expressão gênica ($p > 0,999$).

Realizando-se a mesma análise descrita acima, nos pacientes com nódulos malignos, utilizando-se o GAPDH como controle interno, observou-se que a porcentagem de pacientes com associação entre diminuição da

quantificação gênica tumoral e aumento da imuno-expressão da proteína NIS no citoplasma tumoral foi 87,5% (14/16) *versus* 12,5% (2/16), o que foi estatisticamente significativo ($p=0,04$) (Gráfico 7).

Realizando-se a mesma análise descrita acima, nos pacientes com nódulos malignos, porém utilizando o gene PSMC6 como controle interno, observou-se que a porcentagem de pacientes com associação entre diminuição da quantificação gênica tumoral e aumento da imuno-expressão da proteína NIS no citoplasma tumoral foi 68,75% (11/16) *versus* 31,25% (5/16), o que não foi estatisticamente significativo ($p=0,210$) (Gráfico 7).

Gráfico 7: Porcentagem de pacientes com associação entre aumento da expressão gênica (Malignos A: realizada utilizando GAPDH, Malignos B: realizada utilizando PSMC6 e Benignos: independente do controle interno) e aumento da imuno-expressão da proteína NIS no citoplasma (associação positiva) ou outras associações (associação negativa).

5 DISCUSSÃO

A integridade funcional do transporte de iodo nas células neoplásicas tireoidianas é essencial para assegurar captação suficiente de iodo para a detecção e erradicação dos tecidos tireoidianos neoplásicos.

Com o objetivo de aprofundar o conhecimento sobre a célula tireoidiana e sua capacidade de transporte de iodo, este estudo investigou a expressão gênica e imuno-expressão do NIS em nódulos benignos e malignos de tireóide, através da análise do transcrito (RNAm) e da proteína NIS nas mesmas amostras, sempre comparadas com o tecido não tumoral do mesmo paciente. Para isto, realizou-se avaliação da expressão e localização do conteúdo protéico do NIS através de imuno-histoquímica e quantificação do seu RNAm, através de RT-PCR em tempo real, além de avaliação clínica, ultra-sonográfica e laboratorial dos pacientes, o que ainda não havia sido feito em trabalhos previamente publicados.

Os achados da RT-PCR e da imuno-histoquímica em conjunto indicaram que as alterações do NIS ocorreram tanto em nível transcricional como pós-transcricional (tradução ou pós-tradução), pois se verificou diminuição de transcrição associada com alteração da localização da proteína, nos tumores estudados.

A variação na expressão do RNAm das amostras não-tumorais foi surpreendentemente ampla quando se utilizou o gene GAPDH como controle interno, por este motivo, decidiu-se realizar nova quantificação gênica utilizando outro gene controle interno, o gene PSMC6.

Vários trabalhos na literatura apontam a dificuldade na escolha do gene controle interno a ser utilizado^{52,53}. Recentemente foi mostrado que o GAPDH não é constitutivamente expresso em alguns tecidos já que apresenta variação em seus níveis de até 8 vezes, conforme o órgão estudado e também porque possui pseudo-gene (gene bem semelhante ao original que, apesar de não ser ativo, pode ser co-amplificado)⁵⁴. A escolha do gene PSMC6 se deu a partir do estudo de Sá et al.⁵⁵ que mostrou, através de hibridização de microarranjos, que este é um dos genes controles internos mais estáveis para amostras de insulinomas, quando comparado com outros controles internos. Não há, até o momento, trabalhos na literatura que estudaram genes controle internos em tecidos tireoidianos, o que gera dúvida para definir qual dos genes estudados é o melhor e qual resultado é o mais confiável. Os resultados deste trabalho mostraram que houve concordância na quantificação gênica em 90% dos casos com ambos os genes.

Os resultados da expressão gênica dos nódulos benignos foram concordantes em 100% dos pacientes. Houve diminuição da expressão gênica em 78,6% deles, independente de qual controle interno tenha sido utilizado. Os pacientes que tiveram maior expressão no nódulo do que no tecido não-nodular foram os dois portadores de nódulos captantes (pacientes 13 e 14) e o paciente 11 que estava em tratamento do hipotireoidismo clínico e apresentou T4 livre alto, mostrando que ingeria dose alta de levotiroxina. Isto pode ter levado à inibição da expressão gênica na tireóide como um todo, porém, mantendo maior expressão no tumor. Não

existem na literatura dados a este respeito, entretanto, recentemente, Bruno et al.²⁵ mostraram diminuição importante da transcrição do NIS no tecido tireoidiano não-tumoral, mas não no tecido tumoral, de pacientes que foram submetidos à tireoidectomia, após tratamento com doses supressivas de levotiroxina, o que foi atribuído ao TSH baixo. Trouttet-Masson et al.⁵⁶ analisaram a quantidade de transcrito do NIS e imuno-expressão da proteína de quatro pacientes com carcinoma papilífero, que estavam em tratamento com levotiroxina, e não encontraram diferenças na quantidade de transcrito entre as amostras tumorais e não-tumorais estudadas, mas só identificaram proteína NIS não glicosilada nos carcinomas, enquanto que nas amostras não-tumorais foi identificada adicionalmente proteína NIS glicosilada.

Já, dentre os malignos, houve discordância nos níveis de RNAm calculados com os dois genes controles internos em 3 pacientes. No caso do paciente 16 é compreensível a maior expressão gênica de NIS no tumor (que foi detectada utilizando-se o gene PSMC6), já que, da mesma forma que o paciente 11, ele fazia uso de dose elevada de levotiroxina e estava com TSH muito baixo. Contudo, não se encontrou justificativa para o achado de maior expressão gênica do NIS nos tumores dos pacientes 17 e 30 (também detectada usando o gene PSMC6 como controle interno).

Os nossos resultados de expressão gênica como um todo, mostraram diminuição da expressão gênica nos tumores em comparação com o tecido não-tumoral e estão de acordo com vários estudos que também utilizaram RT-PCR em tempo real^{32,33,35} para quantificação do NIS, publicados até o momento. No estudo de Ryu et al.³², a maioria dos carcinomas papilíferos

estudados apresentou níveis de RNAm menores que os tecidos não-tumorais, entretanto, a diferença não foi estatisticamente significativa, talvez porque algumas amostras não-tumorais apresentaram níveis tão baixos quanto os de alguns carcinomas. Vale ressaltar também que a grande maioria dos pacientes estava fazendo uso de levotiroxina, alguns apresentavam TSH suprimido e os tecidos não-tumorais usados para comparação não foram pareados em todos os casos. Lazar et al.³³ também avaliaram a quantificação do RNAm do NIS por RT-PCR em tempo real e encontraram diminuição da expressão e igual expressão em, respectivamente, 93% e 7% dos carcinomas estudados. Estes autores também não parearam as amostras nem tampouco avaliaram o uso de levotiroxina nem os níveis de TSH. Ringel et al.³⁵ já realizaram a quantificação do NIS em carcinomas de tireóide pareando metade das amostras com o tecido não tumoral do mesmo paciente e detectaram diminuição do RNA mensageiro em 100% dos carcinomas, mas também não fizeram referência ao valor do TSH dos pacientes nem ao uso de levotiroxina.

Como já foi dito anteriormente, houve grande variação nos valores de expressão gênica nos tecidos não-tumorais, havendo sobreposição destes com alguns valores tumorais. Os estudos de Ryu et al.³², Lazar et al.³³ e Ringel et al.³⁵, citados previamente, também mostraram ampla variação de expressão gênica no tecido não-tumoral, mas todos eles incluíram pequeno número de amostras ditas “normais” e ainda por cima apresentaram uma ou mais falhas metodológicas (já descritas), o que dificulta a comparação dos

resultados. Vários fatores que regulam a expressão do NIS podem estar relacionados a este fato como: concentração local e circulante do TSH, imunoglobulinas tireo-estimulantes, citocinas, concentração de iodo e, possivelmente, infiltração de áreas não-tumorais por células que não expressam o NIS, como por exemplo, os linfócitos. Hoje, há uma tendência em não considerar o tecido não-tumoral como tecido normal, o que explicaria a não homogeneidade da expressão de NIS nessas amostras.

Na tentativa de correlacionar expressão de NIS do tecido não-tumoral com alguma característica clínica ou laboratorial dos pacientes, os valores de RNAm dos tecidos não-tumorais de todos os pacientes foram ordenados, separadamente, em valores crescentes e, em seguida, analisados. Todavia, não se conseguiu estabelecer correlação entre expressão gênica do NIS e os seguintes dados pesquisados: sexo, idade, tempo de evolução da doença, dosagens hormonais, presença ou ausência de anticorpos, aspectos ultra-sonográficos, cintilografia, tipos histológicos, achados imuno-histoquímicos e iodúria. Para refinar ainda mais a pesquisa foi realizada nova análise excluindo todos os pacientes que apresentaram pelo menos uma das seguintes características: presença de anticorpos, uso de levotiroxina, níveis de T4 livre ou de TSH fora do limite da normalidade e presença de tireoidite no anátomo-patológico, restando assim 14 pacientes. Esta análise evidenciou que todos os pacientes do sexo masculino apresentaram os menores valores de expressão no tecido não tumoral, entretanto, a casuística foi pequena para permitir tal conclusão. Talvez a realização de um estudo com casuística maior, utilizando vários genes

controles internos e incluindo o maior número possível de informações clínicas e laboratoriais (como uso de levotiroxina e dosagem de TSH) dos pacientes, consiga apontar se existe valor de referência de RNAm para o tecido tireoidiano não tumoral.

Da mesma forma que os estudos de Arturi et al.³¹, Lazar et al.³³ e Trouttet-Masson et al.⁵⁶, este estudo não encontrou diferença estatisticamente significativa nos valores da expressão gênica do NIS entre os nódulos benignos e malignos.

Este estudo incluiu apenas cinco pacientes portadores de hipotireoidismo em tratamento com levotiroxina e a comparação deste grupo com todos os demais pacientes não mostrou alteração da expressão do gene ou da proteína NIS. Os pacientes que estavam com TSH normal não se comportaram diferente do restante do grupo, no que tange à quantificação do RNAm e imuno-histoquímica. Entretanto, os dois pacientes que apresentaram T4 livre alto apresentaram alguma alteração na imuno-histoquímica. O paciente 11 apresentou mesma intensidade de expressão da proteína NIS no citoplasma das células tumorais e não-tumorais, embora a TPO e o receptor de TSH não tenham sido detectados nas amostras tumorais. No paciente 16, a imuno-histoquímica para receptor de TSH foi positiva apenas no tumor.

Os exames imuno-histoquímicos mostraram que a proteína NIS foi mais expressa nos tecidos tumorais do que nos tecidos não-tumorais e que nos tumores ela estava localizada principalmente na região intracelular. Estes resultados são concordantes com quatro estudos publicados. O primeiro

estudo a mostrar “superexpressão” da proteína NIS foi publicado por Saito et al.⁴⁰ em 1998 e utilizou as técnicas de *Northern blot* e imuno-histoquímica com anticorpo policlonal. Apesar deste estudo ter mostrado “superexpressão” da proteína NIS, deve ser analisado de forma bastante cautelosa porque foi o único a mostrar associação de “superexpressão” com aumento na quantidade de RNAm. O resultado encontrado pelos autores pode ter decorrido de alguns motivos: 1) dentre todas as amostras de carcinomas estudados, apenas quatro foram pareadas com amostra não-tumoral do mesmo paciente; 2) somente algumas amostras tumorais foram submetidas às duas técnicas e 3) o tecido não-tumoral usado para comparação apresentava pouquíssima quantidade de RNAm e proteína NIS, o que poderia ser decorrente do uso de levotiroxina, o que não foi citado.

O segundo estudo, publicado em 2001 por Dohán et al.⁴¹, estudou 57 amostras de carcinomas de tireóide e encontrou superexpressão da proteína NIS em 70% delas, em comparação com o tecido perinodular. A positividade da proteína ocorreu predominantemente no citoplasma, distribuída, na maioria das vezes, de maneira uniforme em toda área tumoral e, em algumas amostras, foi possível à identificação da proteína na membrana basolateral, de forma bem semelhante ao encontrado em nosso estudo. O mérito do trabalho de Dohán et al.⁴¹ se deveu ao fato de ter apontado, pela primeira vez, a possibilidade de haver diferença na distribuição da proteína nos carcinomas *versus* o tecido não-tumoral, entretanto, deve ser analisado com restrição pela falta de informação sobre dados clínicos e laboratoriais dos pacientes.

O terceiro estudo que teve resultados muito semelhantes foi o de Wapnir et al.²² que mostrou adicionalmente, que vários carcinomas de outros órgãos expressaram a proteína NIS forte ou fracamente no compartimento intracelular, independente de ter existido expressão no tecido não-tumoral. Um total de 99 amostras de tecidos de doenças benignas e malignas de tireóide foi pareado com tecido não-tumoral, mas os autores não citaram exatamente de onde vieram estas amostras, o que seria importante, já que incluíram em sua casuística doenças difusas da tireóide, como por exemplo, doença de Graves. Mais uma vez faltou informação sobre dados clínicos e laboratoriais dos pacientes.

O quarto e último estudo sobre o assunto e também o que apresentou menos vieses mostrou aumento da imuno-expressão da proteína NIS em 54% das amostras tumorais e ausência em 46% delas⁴².

Apesar de haver concordância com vários estudos, os nossos resultados divergiram totalmente dos resultados de Trouttet-Masson et al.⁵⁶ que não identificaram o aumento da imuno-expressão da proteína NIS em caso algum de carcinoma. Deve-se ressaltar, porém, que os autores realizaram avaliação da proteína NIS através de outra técnica, o *Western blot* que também fornece resultado semiquantitativo. Além disso, esses resultados precisariam ser confirmados por outros estudos.

A questão central que precisa ser discutida é se se pode afirmar, com base nos dados disponíveis atualmente, que existe aumento da proteína NIS em nódulos de tireóide. A imuno-histoquímica é um método de análise semiquantitativo e os resultados, expressos em escores e não em valores

absolutos, dependem da interpretação pessoal do patologista e não de uma técnica que quantifica absolutamente a proteína. O anticorpo utilizado neste estudo (assim como os outros usados em todos os estudos já descritos) consegue detectar não só a molécula de NIS madura e glicosilada que se localiza na membrana basolateral, e que tem peso molecular em torno de 90 kDa, mas também partículas de NIS de pesos moleculares menores^{36,39}. Pode ser que estas partículas menores sejam detectadas na imuno-histoquímica. Esta hipótese foi levantada por Trouttet-Masson et al.⁵⁶ que detectaram proteína NIS madura em todas as amostras não tumorais, mas não nas amostras tumorais. Além disso, detectaram pequena quantidade de NIS de baixo peso molecular (identificado como NIS imaturo não glicosilado), com localização predominantemente intracelular, em 50% dos carcinomas.

Deve ser lembrado que a alteração na glicosilação não é, por si só, limitação para migração do NIS para a membrana plasmática, uma vez que foi relatado que NIS não glicosilado consegue ser transportado para a membrana citoplasmática e ser ativo⁶. Logo, outros fatores, como a fosforilação da região carboxi-terminal, podem estar envolvidos no defeito de migração da proteína NIS para a membrana.

Diante de tantos fatos podemos formular algumas hipóteses para os achados da imuno-histoquímica: 1) A imuno-histoquímica revelou um acúmulo de proteína que não conseguiu migrar para a membrana plasmática, devido à alteração/defeito no processo de migração, e, portanto, ficou concentrada no citoplasma; 2) A imuno-histoquímica revelou um acúmulo de proteína que não conseguiu evoluir para a forma madura, por

interferência de outros fatores independentes da glicosilação, e, portanto, ficou concentrada no citoplasma; 3) O que está sendo expresso é somente proteína que ainda está sendo sintetizada; 4) Nos carcinomas poderia haver diminuição do *turnover* protéico do NIS levando ao acúmulo do mesmo no citoplasma; 5) Uma associação destes fatores e 6) Verdadeira superexpressão da proteína NIS.

A co-existência de baixa concentração de RNAm com alta concentração de proteína, detectada pela imuno-histoquímica, faz levantar a hipótese sobre a existência de mecanismo de *feedback* negativo da proteína NIS sobre a própria transcrição do gene NIS. Este mecanismo já está descrito para várias proteínas e inclusive para a tireoglobulina. Suzuki e Kohn²⁷ mostraram que, nos folículos pobres em tireoglobulina, as células foliculares apresentaram forte imuno-expressão citoplasmática para TG e a expressão gênica da TG era máxima; entretanto, quando o folículo estava rico em TG, as células foliculares exibiram fraca imuno-expressão para TG e a expressão gênica era baixa.

Mesmo sabendo que a imuno-histoquímica não quantifica de maneira absoluta as proteínas, observou-se a positividade da expressão do receptor de TSH nos nódulos que o expressavam e constatou-se que ela era maior que um (1+) em 45,45% dos benignos *versus* 8,3% dos malignos. A partir dos nossos resultados, pode-se concluir que o receptor de TSH parece estar expresso nos nódulos, independente de serem benignos ou malignos, embora houvesse tendência à diminuição de sua expressão nos carcinomas. Poucos foram os estudos que analisaram o receptor de TSH por imuno-

histoquímica. Dentre eles, o de Caillou et al.²¹ também encontrou menor positividade desta proteína nos carcinomas. Estes dados podem indicar dois fatos: 1) a menor expressão do receptor poderia explicar a dificuldade de migração do NIS para a membrana plasmática e, conseqüentemente, levar ao seu acúmulo no interior do citoplasma e 2) já que o receptor estava presente nos carcinomas, talvez existam outros fatores que interagindo com ele, poderiam modular a expressão e migração da proteína NIS.

A imuno-histoquímica para TPO revelou que, em 75% dos carcinomas, houve perda da expressão desta proteína, o que não ocorreu nos nódulos benignos, mostrando que o processo de desdiferenciação da célula folicular envolve a perda de capacidade de organificação do iodo. Estes resultados estão de acordo com vários estudos que mostraram que a expressão da TPO está mantida nos nódulos benignos e diminuída ou ausente nos carcinomas^{33, 57, 58}.

Os nossos resultados servem como base para o desenvolvimento de futuros estudos que quantifiquem de maneira absoluta a proteína NIS, para que se alcance melhor entendimento sobre o defeito da captação de iodo nos tumores, de maneira que, no futuro, possamos tratar, cada vez melhor, os pacientes portadores de carcinoma de tireóide ou quem sabe até, portadores de outros carcinomas.

6 CONCLUSÕES

- 1) A quantidade de RNAm do gene NIS foi menor nos tecidos tumorais do que nos tecidos não tumorais;
- 2) Os exames imuno-histoquímicos mostraram que a proteína NIS foi mais expressa nos tecidos tumorais do que nos tecidos não tumorais, com localização predominantemente intra-citoplasmática, à exceção do nódulo hipercaptante no qual a localização foi maior na membrana citoplasmática basolateral;
- 3) A imuno-histoquímica para TPO mostrou que ela estava ausente na maioria dos carcinomas e expressa na maioria dos tecidos não-tumorais e nos nódulos benignos;
- 4) A imuno-histoquímica para receptor de TSH mostrou que ele estava presente na maioria dos nódulos e houve tendência à menor expressão nos carcinomas;
- 5) Houve correlação entre menor quantidade do RNAm do NIS com maior imuno-expressão da proteína NIS no citoplasma dos carcinomas;
- 6) Houve correlação entre a expressão da proteína NIS e do receptor do TSH;
- 7) A diminuição da expressão gênica do NIS associada a maior imuno-positividade intracitoplasmática da proteína NIS se deve a provável incapacidade de migração da proteína para a membrana plasmática.

7. REFERÊNCIAS

1. Dohán O, De la Vieja A, Carrasco N. Molecular study of the sodium-iodide symporter (NIS): a new field in thyroidology. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11:99-105.
2. Riedel C, Dohán O, De la Vieja A, Ginter CS, Carrasco N. Journey of the iodide transporter NIS: from its molecular identification to its clinical role in cancer. *Trends Biochem. Sci.* 2001;26:490-6.
3. Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature.* 1996;379:458-60.
4. Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL, Jiang SM. Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996;226:339-45.
5. Smanik PA, Ryu K, Theil KS, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology.* 1997;138:3555-8.
6. Levy O, De la Vieja A, Ginter CS, Riedel C, Daí G, Carrasco N. N-linked glycosylation of the thyroid Na^+/I^- symporter (NIS). Implications for its secondary structure model. *J. Biol. Chem.* 1998;273:22657-63.
7. Spitzweg C, Harrington KJ, Pinke LA, Vile RG, Morris JC. The sodium iodide symporter and its potential role in cancer therapy. *J. Endocrinol. Metab.* 2001;86:3327-35.
8. Dohán O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr. Rev.* 2003;24:48-77.
9. Eskandari S, Loo DD, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N. Thyroid Na^+/I^- symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J. Biol. Chem.* 1997;272: 27230–27238.
10. Dohán O, Carrasco N. Advances in $\text{Na}(+)/\text{I}(-)$ symporter (NIS) research in the thyroid and beyond. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2003;213:59-70.
11. Turk E, Wright EM. Membrane topology motifs in SGLT cotransporter family. *J. Membr. Bio.* 1997;159:1-20.
12. Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karniski LP. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat. Genet.* 1999;21:440–443.
13. De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of NADPH oxidase family. *J. Biol. Chem.* 2000;275:23337-23233.
14. Filetti S, Bidart JM, Arturi F, Caillou B, Russo D, Schlumberger M. Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism. *Eur. J. Endocrinol.* 1999;141:443-57.

15. Endo T, Kaneshige M, Nakazato M, Kogai T, Saito T, Onaya T. Autoantibody against thyroid iodide transporter in the sera from patients with Hashimoto's thyroiditis possesses iodide transport inhibitory activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996;228:199-220.
16. De la vieja A, Ginter CS, Carrasco N. Molecular analysis of a congenital iodide transport defect: G543E impairs maturation and trafficking of the Na⁺/I⁻ symporter. *Mol. Endocrinol.* 2005;19:2847-58.
17. Aijian RA, Kamaruddin NA, Crisp M, Watson PF, Ludgate M, Weetman AP. Regulation and tissue distribution of the human sodium iodide symporter gene. *Clin. Endocrinol.* 1998;49:517-23.
18. Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, Heufelder AE. Analysis of human iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998;83:1746-51.
19. Jhiang SM, Cho JY, Ryu KY, Deyoung BR, Smanik PA, Mcgaughy VR, Fischer AH, Mazzaferri EL. An immunohistochemical study of Na⁺/I⁻ symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues. *Endocrinology.* 1998;139:4416-9.
20. Vayre L, Sabourin JC, Caillou B, Ducreux M, Schlumberger M, Bidart JM. Immunohistochemical analysis of Na⁺/I⁻ symporter distribution in human extra-thyroidal tissues. *Eur. J. Endocrinol.* 1999;141:382-6.
21. Caillou B, Troalen F, Baudin E, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M, Bidart JM. Na⁺/I⁻ symporter distribution in human thyroid tissues: an immunohistochemical study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998;83:4102-6.
22. Wapnir IL, Van de Rijn M, Nowels K, Amenta PS, Walton K, Montgomery K, Greco R, Dohán O, Carrasco N. Immunohistochemical profile of the sodium/iodide symporter in thyroid, breast, and other carcinomas using high density tissue microarrays and conventional sections. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 88, p. 1880-8, 2003.
23. Weiss SJ, Philip NJ, Ambesi-Impimbato FS, Grollman EF. Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3'5'-monophosphate and dependent on protein synthesis. *Endocrinology.* 1984;114:1099-1107.
24. Riedel C, Levy O, Carrasco N. Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *J. Biol. Chem.* 2001;276:21458-21463.
25. Bruno R, Ferretti E, Tosi E, Arturi F, Giannasio P, Mattei T, Scipioni A, Presta I, Morisi R, Gulino A, Filetti S, Russo D. Modulation of thyroid-specific gene expression in normal and nodular human thyroid tissues from adults: an in vivo effect of thyrotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005;90:5692-7.

26. Plantin-Carrenard E, Foglietti MJ, Beaudeau JL. Sodium/iodide symporter: physiopathological aspects and therapeutic perspectives. *Pathol. Biol. (Paris)*. 2005;53:174-82.
27. Suzuki K, Kohn LD. Differential regulation of apical and basal iodide transporters in the thyroid by thyroglobulin. *J Endocrinol*. 2006;189(2):247-55.
28. Suzuki K, Mori A, Saito J, Moriyama E, Ulianich L & Kohn LD. Follicular thyroglobulin suppresses iodide uptake by suppressing expression of the sodium/iodide symporter gene. *Endocrinology*. 1999;140:5422–5430.
29. Elisei R, Vivaldi A, Pacini F. Biology and clinical application of the NIS gene. *Tumori*. 2003 v. 89, p.523-528, 2003.
30. Russo D, Manole D, Arturi F, Suarez HG, Schlumberger M, Filetti S, Derwahl M. Absence of sodium/iodide symporter gene mutations in differentiated human thyroid carcinomas. *Thyroid*. 2001;11:37–39.
31. Arturi F, Russo D, Schlumberger M, Du Villard JA, Caillou B, Vigneri P, Wicker R, Chiefari E, Suarez HG, Filetti S. Iodide symporter gene expression in human thyroid tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1998;83:2493-6.
32. Ryu KY, Senokozlieff ME, Smanik PA, Wong MG, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Development of reverse transcription-competitive polymerase chain reaction method to quantitate the expression levels of human sodium iodide symporter. *Thyroid*. 1999;9(4):405-9.
33. Lazar V, Bidart JM, Caillou B, Mahé C, Lacroix L, Filetti S, Schlumberger M. Expression of the Na⁺/I⁻ symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1999;84:3228-34.
34. Neumann S, Schuchardt K, Reske A, Reske A, Emmrich P, Paschke R. Lack of correlation for sodium iodide symporter mRNA and protein expression and analysis of sodium iodide symporter promoter methylation in benign cold thyroid nodules. *Thyroid*. 2004;14:99-111.
35. Ringel MD, Anderson J, Souza SL, Burch HB, Tambascia M, Shriver CD, Turttle RM. Expression of the sodium iodide symporter and thyroglobulin genes are reduced in papillary thyroid cancer. *Mod. Pathol*. 2001;14(4):289-96.
36. Castro MR, Bergert ER, Beito TG, Mciver B, Goellner JR, Morris JC. Development of monoclonal antibodies against the human sodium iodide symporter: immunohistochemical characterization of this protein in thyroid cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1999;84:2957-62.
37. Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P. A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications. *Eur J Endocrinol*. 2006;155(4):495-512.

38. Bernier-Valentin F, Trouttet-Masson S, Rabiloud R, Selmi-Ruby S, Rousset B. Three-dimensional organization of thyroid cells into follicle structures is a pivotal factor in the control of sodium/iodide symporter expression. *Endocrinology*. 2006;147(4):2035-42.
39. Castro MR, Bergert ER, Beito TG, Roche PC, Ziesmer SC, Jhiang SM. Monoclonal antibodies against the human sodium iodide symporter: utility for immunocytochemistry of thyroid cancer. *J. Endocrinol.* 1999;163:495-504.
40. Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Katoh R, Kawaoi A, Muramatsu A, Onaya T. Increased expression of the sodium/iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. *J. Clin. Invest.* 1998;101:1296-300.
41. Dohán O, Baloch Z, Bánrévi Z, Livolsi V, Carrasco N. Predominant intracellular overexpression of the Na⁺/I⁻ symporter (NIS) in a large sampling of thyroid cancer cases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:2697-700.
42. Tonacchera M, Viacava P, Agretti P, De Marco G, Perri A, Di Cosmo C, De Servi M, Miccoli P, Lippi F, Naccarato AG, Pinchera A, Chiovato L, Vitti P. Benign nonfunctioning thyroid adenomas are characterized by a defective targeting to cell membrane or a reduced expression of the sodium/iodide symporter protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87:352-7.
43. Camargo RYA, Tomimori EK. Diagnóstico dos nódulos tireóideos baseado na avaliação ultra-sonográfica e citológica combinada. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 1998;42(4):273-6.
44. Yokozawa T, Miyauchi A, Kuma K, Sugawara M. Accurate and simple method of diagnosing thyroid nodules by the modified technique of ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy. *Thyroid*. 1995;5(2):141-5.
45. Hedinger C, Williams ED, Sobin LH. The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition. *Cancer*. 1989;63: 908-11.
46. Pino S, Fang SL, Braverman LE. Ammonium persulfate: a safe alternative oxidizing reagent for measuring urinary iodine. *Clin. Chem.* 1996;42:239-43.
47. User Bulletin # 2. ABI Prism 7700 sequence detection system [cited 2006 Oct 10]. Available from: <http://keck.med.yale.edu/affymetrix/rtpcr/quantitative/RelativeQuantitationofGeneExpressionuserbulletin.pdf>
48. ABgene [homepage on the internet]. United Kingston: ABgene House; c2003-2006 [cited 2006 Oct 15]. Available from: <http://www.abgene.com>

49. Sá SV, Corrêa-Giannella ML, Machado CM, Souza JJS, Albergaria MA, Patzina RA, Siqueira SAC, Machado MCC, Giannella-Neto D. Somatostatin receptor subtype 5 (SSTR5) mRNA expression is related to histopathological features of cell proliferation in insulinomas. *Endocr Relat Cancer*. 2006;3(1):69-78.
50. Conover WJ. *Practical nonparametric statistics*. 2a. ed. New York: Wiley; 1980.
51. Agresti A. *Categorical Data Analysis*. New York: Wiley; 1990.
52. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):1-12.
53. Lupberger J, Kreuzer KA, Baskaynak G, Peters UR, Le Coutre P, Schmidt CA. Quantitative analysis of beta-actin, beta-2-microglobulin and porphobilinogen deaminase mRNA and their comparison as control transcripts for RT-PCR. *Mol Cell Probes*. 2002;16(1):25-30.
54. Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M, Tsyganskaya M. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping maintenance genes. *Physiol Genomics*. 2000;2(3):143-7.
55. Sá SV, Corrêa-Giannella ML, Machado CM, Krogh K, Almeida MQ, Albergaria MA, Siqueira SAC, Patzina RA, Ibuki FS, Sogayar MC, Machado MCC, Giannella-Neto D. SERPINA 1 (Alpha-1-antitrypsin) as a potencial marker for malignancy of insulinomas. *Clin Cancer Res*. 2006. In press 2006.
56. Trouttet-Masson S, Selmi-Ruby S, Bernier-Valentin F, Porra V, Berger-Dutrieux N, Decaussin M, Peix JL, Perrin A, Bournaud C, Orgiazzi J, Borson-Chazot F, Franc B, Rousset B. Evidence for transcriptional and posttranscriptional alterations of the sodium/iodide symporter expression in hypofunctioning benign and malignant thyroid tumors. *Am J Pathol*. 2004;165:25-34.
57. Savin S, Cvejic D, Isic T, Paunovic I, Tatic S, Havelka M. The efficacy of the thyroid peroxidase marker for distinguishing follicular thyroid carcinoma from follicular adenoma. *Exp Oncol*. 2006;28(1):70-4.
58. Savin S, Cvejic D, Isic T, Paunovic I, Tatic S, Havelka M. Thyroid peroxidase immunohistochemistry in differential diagnosis of thyroid tumors. *Endocrinol Pathol*. 2006;17(1):53-60.