Elaine Oliveira Dias

**Expressão do fator de crescimento similar à insulina 1 e 2 (IGF1 e IGF2)
e receptor de IGF1 (IGF1R) no carcinoma papilífero da tireoide**

VERSÃO CORRIGIDA

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

Programa de: Endocrinologia

Orientadora: Dra. Rosalinda Yossie Asato de Camargo

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de Dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2015

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Valdívia Oliveira Dias e José Wellington Gonçalves Dias que sempre acreditaram em mim e na importância dos estudos nas nossas vidas.

Ao meu noivo, Alexandre Kosuta que está ao meu lado me apoiando, amando e me completando.

Aos meus irmãos, Leonardo, Bethânia, Patrícia e Verônica e aos meus amados sobrinhos.

A todos os meus mestres, que de alguma forma são responsáveis por essa conquista.

Aos meus amigos, sem vocês nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha existência e por abençoar o meu caminho e das pessoas que amo, agradeço por tudo que conquistei.

Aos pacientes, que, durante toda a minha vida médica, permitiram-me ajudá-los e acumular novos conhecimentos.

À minha orientadora Dra. Rosalinda Camargo, por sua imensa dedicação aos pacientes e à pesquisa, pelos seus ensinamentos diários, por suas palavras amigas, pela sua confiança depositada em mim. Agradeço por tê-la como amiga e orientadora.

Ao Dr. Eduardo Tomimori, meu grande mestre e amigo, agradeço pelo apoio, carinho e por compartilhar seus valiosos conhecimentos em tireoide.

À Dra Monique Basso, Dra Cristina Kanamura e Dra Claudia Kliemann por todo importantíssimo auxílio prestado.

À Ana Luiza Galvão, pela imensa ajuda prestada.

À Dra Suemi Marui, Erika Urbano, Dr Madson Almeida e Dr Marcos Tavares pela ajuda e apoio à pesquisa

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica em especial ao Douglas.

Aos meus colegas e amigos da pós graduação, Ana Paula e Cley Rocha.

Às amigas Andrea, Selma, Roselly e Cida pelo apoio e ajuda.

À amiga Daniela Miranda que foi uma grande incentivadora desta conquista.

A todos os médicos e funcionários da Unidade de Tireoide, pelo apoio à pesquisa.

“Nossa maior fraqueza está em desistir.

O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez.”

Thomas Edison

Essa tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento da publicação:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de Apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviaturas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	2
1.1-O sistema IGF/ Insulina	4
1.2-Insulina, IGF e Câncer	14
1.3-Insulina, IGF e neoplasias tireoidianas	15
2. OBJETIVOS	21
3. POPULAÇÃO E MÉTODOS	23
3.1-População	23
3.2-Exame imuno-histoquímico	26
3.3-Avaliação da expressão proteica de IGF1, IGF2 e IGF1R nos tecidos tumorais e não tumorais	28
3.4 Análise estatística	29
4. RESULTADOS	31
4.1-Resultados da expressão protéica do IGF1, IGF2 e IGF1R, através de exame imuno-histoquímico	36
4.1.1-IGF1	36
4.1.2- IGF2	40
4.1.3-IGF1R	45
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC/UICC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ALS	Subunidade Acidolábil
ATA	<i>American Thyroid Association</i>
AKT1	<i>V-akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1</i>
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CDT	Carcinoma Diferenciado de Tireoide
CPT	Carcinoma Papilífero da Tireoide
ERK1/2	<i>kinases Extracelulares Sinalizadoras</i>
<i>et al.</i>	e outros colaboradores
GH	Hormônio de Crescimento
GTP	Guanosina Trisfosfatase
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IGF1	Fator de Crescimento Similar à Insulina Tipo 1
IGF2	Fator de Crescimento Similar à Insulina Tipo 2
IGF1R	Receptor do Fator de Crescimento Similar à Insulina Tipo 1
IGFBP	Proteína Ligadora do Fator de Crescimento Similar à Insulina
INSR	Receptor de Insulina
INSR-A	Receptor de Insulina Isoforma A
INSR-B	Receptor de Insulina Isoforma B
INSR/IGF1R	Receptor Híbrido de Insulina e do Fator de Crescimento Similar à Insulina Tipo 1

INSR-A/IGF1R	Receptor Híbrido de Insulina Isoforma A e do Fator de Crescimento Similar à Insulina Tipo 1
INSR-B/IGF1R	Receptor Híbrido de Insulina Isoforma B e do Fator de Crescimento Similar à Insulina Tipo 1
IRS1	Substrato 1 do Receptor de Insulina
IRS	<i>Insulin-Receptor Substrate</i>
MAPK1	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 1</i>
MCPT	Microcarcinoma Papilífero da Tireoide
MEK	<i>Mitogen-activated Quinase</i>
MTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin (Serine/Threonine Kinase)</i>
p110 (SART3)	<i>Squamous Cell Carcinoma Antigen Recognized by T-cells 3</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>
P.Tyr	Tirosina Fosforilada
RAF	<i>Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
RAS	<i>Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
RPS6KB1	<i>Ribosomal Protein S6 Kinase 70 KDa Polypeptide 1</i>
Shc e Grb2	<i>Growth Factor Receptor-Bound Protein 2</i>
SLC2A4	<i>Solute Carrier Family Facilitated Glucose Transporter, Member 4</i>
SOS1	<i>Son of Sevenless Homolog 1</i>
TNM	Sistema Internacional de Classificação de Tumores Malignos (T: tamanho do tumor no exame histopatológico, N: metástase linfonodal, M: metástase à distância)

RESUMO

Dias EO. *Expressão do fator de crescimento similar à insulina 1 e 2 (IGF1 e IGF2) e receptor de IGF1 (IGF1R) no Carcinoma Papilífero da Tireoide (CPT)* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: Acredita-se que os fatores de crescimento insulina símile 1 (IGF1) e IGF2 tenham um papel chave na progressão de tumores, resistência à apoptose e terapias. A resistência à insulina tem sido associada ao aumento do volume tireoidiano e aumento do risco de desenvolver nódulos e câncer de tireoide; no entanto, há poucos estudos que avaliaram o papel dos IGFs e seus receptores no carcinoma papilífero de tireoide (CPT) e, até o momento, nenhum estudo foi conclusivo sobre a relação entre a via insulina/IGF e o comportamento do CPT. **OBJETIVOS:** 1) Estudar a expressão do IGF1, IGF2 e o IGF1R no CPT, incluindo o microcarcinoma papilífero; 2) Correlacionar essa expressão com as características clínicas, variante histopatológica, estadiamento e estratificação de risco. **MÉTODOS:** Foram selecionados, retrospectivamente, 110 pacientes operados por CPT e atendidos no Ambulatório do Serviço de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da FMUSP e separados em dois grupos: 62 microcarcinomas papilíferos (MCP) e 48 CPT > 1,0 cm. A presença e expressão do IGF1, IGF2 e IGF1R foi avaliada, através de exame imunohistoquímico, em 110 tecidos tumorais e 98 tecidos não tumorais (controle). Os casos positivos foram classificados, de acordo com a quantidade de células coradas, em: + (menos de 10% das células); ++ (em 10-50% das células) e +++ (mais de 50% das células). O grau da expressão foi classificada em leve, moderada e forte. A presença e intensidade desses marcadores foram correlacionados com as características clínicas, variante histopatológico, TNM e estratificação de risco. **RESULTADOS:** O IGF1 e o IGF1R estiveram presentes em 100% e 99% dos CPTs e mostraram-se significativamente hiperexpressos, tanto nos MCPs quanto nos CPTs > 1,0 cm, quando comparados ao tecido adjacente não tumoral ($p < 0,001$). O IGF2 esteve expresso em 46,7% dos CPTs e mostrou fraca expressão em apenas um tecido não tumoral ($p < 0,001$). O IGF1 apresentou expressão significativamente maior nos microcarcinomas nos estágios III e IVA quando comparados aos estágios I e II ($p = 0,022$). Não houve diferença significativa na quantidade e intensidade de expressão do IGF1 e IGF1R nos MCT quando comparados aos CPTs > 1,0 cm. O IGF2 apresentou expressão significativamente maior nos MCTs e, nesse grupo, apresentou maior expressão nos tumores multicêntricos ($p = 0,017$) e nos estágios III e IVA, quando comparados aos estágios I e II ($p = 0,041$). **CONCLUSÕES:** No presente estudo, observamos que o IGF1 e IGF2 foram significativamente mais expressos nos microcarcinomas em estágios mais avançados. O IGF2 apresentou maior expressão nos microcarcinomas papilíferos e esta expressão foi significativamente maior nos tumores multicêntricos.

Descritores: Carcinoma papilífero de tireoide, IGF1, IGF2, IGF1R, imunohistoquímica.

SUMMARY

Dias EO. *Expression of Insulin-like growth factor 1 and 2 (IGF-1 and IGF-2), and IGF-1R in Papillary Thyroid Carcinoma* [thesis]. São Paulo: University of São Paulo Medical School; 2014.

INTRODUCTION: Insulin-like growth factor-1 and 2 (IGF-1 and IGF-2) are believed to play a key role in the progression of tumors, resistance to apoptosis and therapies. The insulin resistance has been associated with increased thyroid volume and increased risk in developing thyroid nodules and thyroid cancer. However, few studies have evaluated the role of IGFs and their receptors on papillary thyroid carcinomas (PTC), and there is no conclusive studies about the relationship between IGF axis and PTC behavior. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to investigate the expression of IGF-1, IGF-2, and IGF-1R in PTC, including papillary microcarcinoma (PTMC), and correlate the expression data with clinical, histologic variants, TNM staging, and risk of recurrence. **METHODS:** We retrospectively selected 110 paraffin-embedded tumoral tissues from patients with PTC who underwent thyroidectomy at Hospital das Clínicas of FMUSP. These patients were divided into two groups: 62 microcarcinomas (PTMC) and 48 PTC > 1.0 cm. The presence and intensity of expression of IGF-1, IGF-2, and IGF-1R were evaluated through immunohistochemical staining in 110 tumoral tissues, and in 98 non-tumoral tissues (control group). Positive cases were classified according to the numbers of staining cells in: + less than 10% of staining cells; ++ in 10-50% of the staining cells, and +++ in more than 50% of staining cells. The degree of expression was classified as mild, moderate and strong. The presence and degree of IGF1, IGF2, and IGF1R staining were correlated with clinical features, histologic type, TNM staging, and risk stratification. **RESULTS:** IGF-1 and IGF-1R were expressed in 100% and 99% of PTC, and were significantly overexpressed in both PTMC and PTC>1.0 cm, in comparison with non-tumoral tissues (control group) ($p<0.001$). IGF-2 was expressed in 46.7% of PTC and had mild positivity expression in only one non-tumoral tissue ($p<0.001$). IGF1 was significantly overexpressed in PTMC on stage III and IVa and was less expressed in stage I and II. There was no significant difference on IGF1 and IGF1R expression between PTMC and PTC>1.0 cm. IGF-2 presented greater expression in multicentric PTMC ($p=0.017$), specially in stage III and IVa. **CONCLUSIONS:** In our study, both IGF-1 and IGF2 were significantly overexpressed in PTMC group in advanced stages. IGF-2 was also significantly overexpressed in PTMC multicentric tumors.

Keywords: Thyroid Papillary Carcinoma, IGF1, IGF2, IGF1R, Immunohistochemical.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de tireoide é o câncer do sistema endócrino mais comum sendo que, dos subtipos histológicos de carcinoma diferenciado da tireoide (CDT), o carcinoma papilífero (CPT) é o tipo histológico mais frequentemente diagnosticado, representando em torno de 90% dos casos. (Ardito *et al.*, 2013)

Nas duas últimas décadas, dados americanos têm demonstrado aumento de sua incidência, particularmente nos países mais desenvolvidos (Davies & Welch 2014) (Figura 1). No Brasil, a incidência deste carcinoma em mulheres é de 5,27 casos/100.000 e, em homens, é de 1,16/100.000 em regiões desenvolvidas (Brito *et al.*, 2011). Fatores ambientais incluindo radiação, hábitos nutricionais e alterações hormonais têm sido relatados como possíveis causas (Pellegriti *et al.*, 2013). De acordo com as características histopatológicas, os CPTs são subdivididos em: variante clássica (45-90%), folicular (4,9-31,6%), células altas (4-10%), esclerosante difusa (1,8%), de células de Hürthle (1-11%) e colunares (0,1-0,2%) (Jemal *et al.*, 2008).

Figura 1: Incidência e mortalidade do carcinoma diferenciado de tireoide (1973-2009) nos Estados Unidos. (Davies & Welch. *Jama*, 140(4):317-22, 2014- modificado).

Em relação ao tamanho dos nódulos, os microcarcinomas papilíferos (MCPT) são, em sua maioria, da variante clássica, não encapsulados, geralmente localizados em região subcapsular e apresentam infiltração no parênquima tireoidiano (Ardito *et al.*, 2013). Os MCPTs são frequentemente identificados incidentalmente, apresentam um curso indolente, prognóstico favorável a longo prazo e uma expectativa de vida similar à população normal (Ardito *et al.*, 2013). Porém, tem sido constatado um aumento no número de casos de comportamento mais agressivo, isto é, que desenvolvem recidivas locorregionais e metástases à distância, não somente no início do diagnóstico mas também durante o acompanhamento, após tireoidectomia (Ardito *et al.*, 2013). É desejável que tenhamos marcadores que possam prever quais carcinomas considerados de baixo risco e muito baixo risco apresentam um potencial mais agressivo, o que poderia nos orientar um tratamento e planejamento cirúrgico mais adequado.

1.1 O sistema IGF/ Insulina

Evidências sugerem uma importante participação do sistema IGF (fator de crescimento semelhante à insulina) e insulina no crescimento e comportamento clínico de vários tipos de tumores do sistema endócrino, como os de tireoide, ovário e adrenal (Malaguarnera *et al.*, 2012) e não endócrino como o carcinoma de mama, cólon e próstata (LeRoith & Roberts, 2003). Acredita-se que a ativação do sistema IGF seja um fator chave na progressão dos tumores, resistência à apoptose e ao êxito terapêutico (Malaguarnera *et al.*, 2012).

O sistema IGF inclui quatro receptores (o receptor de insulina, receptor de IGF1, receptor manose-6-fosfato/IGF2 e o receptor híbrido de insulina e IGF1 (INSR/IGF1), quatro ligantes (IGF1, IGF2, pró-insulina e insulina), seis proteínas ligadoras de IGF (IGFBP1 a 6) e as proteínas intracelulares sinalizadoras associadas ao IGF1R, que incluem os membros da família do IRS (*insulin-receptor substrate*), AKT1 (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*), MTOR [*mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)*] e a RPS6KB1 (*ribosomal protein S6 kinase 70 KDa polypeptide 1*) (Seccareccia & Pnina, 2012)

IGF1

O IGF1 é produzido, em sua grande maioria, no fígado, sob o estímulo do hormônio de crescimento (GH) e também em outros tecidos, dentre eles, o tecido tireoidiano (Van der Laan *et al.*, 1995). Este hormônio presente na circulação e no fluido extracelular encontra-se ligado a uma

família de proteínas transportadoras de alta afinidade, as IGFBPs (*IGF-binding proteins*). Atualmente, estão bem caracterizadas, do ponto de vista molecular e bioquímico, seis IGFBPs, denominadas IGFBP1 a IGFBP6. As IGFBPs regulam a disponibilidade das IGFs para seus sítios de ação no receptor IGF1R, modulando as diferentes ações das IGFs em nível autócrino, parácrino e endócrino. No soro, 70% a 80% do IGF1 encontram-se sob a forma de um complexo ternário com a IGFBP3 e a subunidade acidolábil (ALS). Aproximadamente 20% do IGF1 encontra-se ligado a outras IGFBPs e menos de 5% são encontrados sob a forma livre. O IGF1 presente no complexo ternário (IGF1/IGFBP3/ALS) é incapaz de passar para o compartimento extravascular e, desta forma, exercer a sua ação nos tecidos alvo. Por meio deste mecanismo, o complexo ternário prolonga a meia vida do IGF1 circulante livre, de 6 horas para 20 horas, e modula a atividade biológica (Castro & Junior, 2005).

O IGF1 possui ações estimuladoras da divisão celular (ações mitogênicas) e inibidoras da morte celular programada (ações antiapoptóticas) que têm sido associadas ao risco de aparecimento de uma série de tumores sólidos, infiltração, crescimento tumoral e metástases (LeRoith & Roberts, 2003). Além disso, possui um papel central na progressão e transformação do ciclo celular e, juntamente com o seu receptor (IGF1R), estão altamente expressos na maioria dos tecidos malignos e, como agentes antiapoptóticos, contribuem para a sobrevivência das células tumorais.

Alguns estudos epidemiológicos descreveram a relação entre os

valores de IGF1 e o risco de desenvolvimento do câncer; outros descreveram que indivíduos não acromegálicos, mas com o valores de IGF1 sérico no limite superior da normalidade, apresentam um risco aumentado de desenvolver certos tipos de tumores malignos (cólon, mama e próstata) (Renehan *et al.*, 2004). Já, em indivíduos que apresentam deficiência do receptor de hormônio de crescimento (GH), síndrome de Laron (deficiência congênita de IGF1 e insensibilidade ao GH) e indivíduos com deficiência de GH isolada congênita, parece haver uma proteção contra o surgimento de câncer, quando comparados com os parentes sem deficiência hormonal (Steerman *et al.*, 2011).

Alterações na sinalização do IGF1 foram descritas em vários tumores, incluindo o osteossarcoma, tumores ginecológicos, gastrointestinais, próstata e pulmão. Estudos em animais e humanos demonstraram que o IGF1, além de ser um hormônio endócrino, também possui ação parácrina e autócrina, sendo produzido pelas células tumorais e interagindo com o seu receptor que, frequentemente, está hiperexpresso no tecido neoplásico (DeOstrovich *et al.*, 2008).

IGF2

O IGF2 é produzido no fígado e, de forma semelhante ao IGF1, também possui ação hormonal parácrina; encontra-se em altas concentrações nos embriões, e após o nascimento, continua a ser expresso e secretado pelo fígado (Vella *et al.*, 2001). Esse hormônio encontra-se hiperexpresso em alguns tipos de células tumorais como tumores

gastrointestinais e ginecológicos e também é expresso nos tireócitos malignos. Estudos *in vitro* mostraram que o IGF2 também possui ação antiapoptótica e efeito proliferativo (Murphy *et al.*, 2006).

Estudos em animais e humanos demonstraram que o IGF2, além de ser um hormônio endócrino, também possui ação parácrina e autócrina, sendo produzido pelas células tumorais e interagindo com o receptor de insulina, isoforma A que, frequentemente, está hiperexpresso no tecido neoplásico, principalmente nos carcinomas de tireoide pouco diferenciados (Vella *et al.*, 2001 e 2002).

IGF1R e IGF2R

Os IGFs exercem suas ações pela interação com dois tipos diferentes de receptores denominados IGFR tipo 1 e 2 (IGF1R e IGF2R). A grande maioria das ações conhecidas do IGF1 e 2 são mediadas via receptor tipo 1 (IGF1R) (Castro & Junior, 2005). O IGF1R apresenta estrutura semelhante ao receptor da insulina (INSR), sendo membro da família dos receptores de membrana com atividade tirosina-quinase. O IGF2R não apresenta homologia com os IGF1R ou INSR. Trata-se de proteína monomérica com um grande domínio extracelular, sem atividade tirosina-quinase, que contém sítios de ligação para IGF2 e para manose-6-fosfato. A principal função do IGF2R é ser um regulador negativo da biodisponibilidade da IGF2 (Nakae *et al.*, 2001) (Figura 2).

Figura 2: Proteínas transportadoras de IGF1, as IGFbps (IGFBP1 a IGFBP6). O IGF1R apresenta estrutura semelhante ao receptor da insulina (INSR), sendo membro da família dos receptores de membrana com atividade tirosina-quinase. O IGF2R, trata-se de proteína monomérica com um grande domínio extracelular, sem atividade tirosina-quinase, que contém sítios de ligação para IGF2 e para manose-6-fosfato. (Scarfó RL. Efdeportes, 10:83; 2005-modificada)

O receptor de insulina possui duas isoformas (INSRA e INSRB). A isoforma A se expressa no tecido fetal e menos no tecido diferenciado do adulto; contudo, ainda encontra-se expressa, especialmente em tecidos que normalmente não sofrem ação da insulina. A isoforma B encontra-se expressa especialmente no fígado, músculo e gordura, que são os clássicos alvos da insulina para realizar o seu efeito metabólico. Enquanto o INSRB tem alta afinidade pela insulina, o INSRA tem maior relação com o IGF2 e menor com o IGF1 (Pollak M, 2012) (Figura 3).

Figura 3: Desenho esquemático do receptor de insulina, isoforma A e B, receptor de IGF1 e receptor híbrido. (Pollak M. Nature Reviews Cancer 12(3):159-169, 2012 - modificado)

Os receptores de insulina (INSR) e de IGF1 (IGF1R) possuem uma grande homologia estrutural, porém, com diferentes funções. Em consequência, podem formar os receptores híbridos (INSR/IGF1R) (Belfiore *et al.*, 2009) (Figura 3). O IGF1 se liga com alta afinidade ao seu receptor IGF1R, ao receptor híbrido (INSR/IGF1R) e com pouca afinidade ao receptor de insulina INSR. O IGF2 se liga ao IGF1R, INSR e ao receptor híbrido INSR/IGF1R (Belfiore *et al.*, 2009) (Figura 4).

Figura 4: Sinalização endócrina, parácrina e autócrina da insulina, IGF1 e IGF2 na célula tumoral. Efeito da resistência à insulina sobre a produção de GH e IGF1 hepático, bem como a produção autócrina e parácrina de IGF1 e IGF2 pela célula tumoral. Setas da insulina, IGF1 e IGF2 demonstrando a interação desses ligantes com os receptores de insulina, IGF1R e receptores híbridos (INSRA/IGF1R e INSRB/IGF1R). (Gallagher & LeRoith. *Endocrinology*, 2011- modificado)

A ligação do IGF1 ao seu receptor promove a ativação da sua atividade tirosina quinase intrínseca, resultando na autofosforilação de sítios de tirosina. Por sua vez, as tirosinas fosforiladas (P.) servem como sítios acopladores (*docking sites*) para diversas proteínas intracitoplasmáticas que contêm domínio de reconhecimento destas P., conhecidos como domínio SH2. Duas principais vias de sinalização são ativadas pela fosforilação em tirosina do IGF1R, a *phosphatidylinositol 3-kinase* (PIK3), responsável principalmente pelas ações das IGF1/2 e a via *mitogen-activated protein kinase 1* (MAPK1), principal modulador dos efeitos proliferativos das IGF1/2, sendo as principais vias associadas ao CPT (Figura 5) (Jain *et al.*, 1998).

Uma importante proteína recrutada e ativada pelo IGF1R é o substrato 1 do receptor de insulina (IRS1), uma fosfoproteína hidrofílica que pode recrutar e regular a atividade de outras proteínas intracelulares. O IRS1 funciona como uma molécula adaptadora, ativando a cascata de sinalização da via PIK3. A proteína PIK3 é composta por 2 subunidades: a p110 (SART3) considerada como a subunidade catalítica e a p85 (PIK3R1) que inibe a atividade catalítica da subunidade p110 e contém dois domínios SH2 que permite a ligação desta proteína IRS1. A ligação entre a IRS1 com a subunidade p85 libera a subunidade p110 para exercer sua atividade catalítica de converter fosfolípidos de membrana, como 3,4 inositol fosfato, para inositol trifosfato e outras moléculas lipídicas sinalizadoras. Esses lipídios se combinam com fosfoinositídeos dependente de quinase para ativar AKT1 (serina/treonina kinase). A AKT1, por sua vez, promove síntese de glicogênio e captação de glicose via SLC2A4 (*solute carrier family facilitated glucose transporter, member 4*), efeito semelhante ao da insulina (Figura 5) (Leal *et al.*, 2011).

Outra via de sinalização do IGF1R ocorre pela ativação do complexo RAS/MAPK, fortemente associado ao CPT. Para a ativação da via MAPK, proteínas Shc e Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) são recrutadas pelo IGFIR ativado. A Grb2 está associada à SOS1 (*Son of Sevenless Homolog 1*), proteína que catalisa a conversão de RAS (*Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*) inativo (associado à guanosina trisfosfatase RAS-GTP). Uma vez ativado, RAS ativa RAF (*Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog*), que por sua vez, ativa MEK (*Mitogen-activated*

Quinase) que, por fim, ativam *kinases* extracelulares sinalizadoras conhecidas como ERK1/2. Estas últimas proteínas atuam como fatores de transcrição e promovem atividades mitóticas e inibição da apoptose (Figura 5) (Jain *et al.*, 1998). Devido a estas características, a via insulina/IGF1 apresenta um papel crucial durante a transformação maligna, estando associada ao aumento da proliferação, sobrevivência, angiogênese e metástase (Belfiore & Frasca, 2008; de Freitas *et al.*, 2013; Pollak M, 2008). Com base nestes dados, estudos recentes apontam para a importância desta via na perda de características epiteliais de células tumorais (de Freitas *et al.*, 2013).

Figura 5: Via de sinalização do IGF1 com ativação do complexo RAS/MAPK e via PI3-Kinase (Siddle K J. Mol Endocrinol 47:R1-R10; 2011- modificado)

1.2 Insulina, IGF e Câncer

Nos últimos anos, a via Insulina/IGF vem sendo associada ao crescimento tumoral. A insulina, essencial regulador do metabolismo de glicose, tem sido introduzida como um importante fator no desenvolvimento do câncer; também possui uma ação antiapoptótica e proliferativa, indicando um efeito mitogênico através do seu receptor (INSR). Estudos iniciais também observaram um aumento do risco em desenvolver câncer em pessoas que apresentam obesidade e diabetes tipo 2, atribuído à hiperinsulinemia, aumento do IGF1 ou, potencialmente, ambos os fatores (Hemkels *et al.*, 2009, Currie *et al.*, 2009). Por outro lado, pessoas com baixas taxas de insulina, IGF1 e IGF2, índice de massa corporal normal ou sem diabetes, mostraram ser relativamente mais protegidos contra o desenvolvimento do câncer (Coughlin *et al.*, 2004; Calle *et al.*, 2003).

A resistência à insulina em tecidos metabólicos como músculo, fígado e tecido adiposo, ocorre, com frequência, na obesidade e no diabetes do tipo 2, levando ao desenvolvimento de hipereinsulinemia compensatória (Belardi *et al.*, 2013). Estudos populacionais têm evidenciado que pacientes com resistência à insulina e hiperinsulinemia são fortes candidatos a apresentarem maior risco de desenvolver câncer (Vigneri *et al.*, 2009). Alguns estudos mostraram que células tumorais apresentam uma maior expressão de INSR e, na tentativa de regular a hiperinsulinemia, certos tumores apresentam aumento da ativação da via Insulina/IGF (Papa *et al.*, 1990; Novosyadly *et al.*, 2010). A hiperinsulinemia pode aumentar a quantidade de IGF1 biodisponível, agindo direta ou indiretamente na

redução das proteínas de ligação IGFBP, levando a um aumento da interação entre o IGF1 e seu receptor (IGF1R), causando uma hiperativação da via (Frystyk *et al.*, 1995; Grinspoon *et al.*, 1995).

O receptor de IGF1 frequentemente se encontra hiperexpresso no câncer de mama e agentes terapêuticos estão sendo desenvolvidos em função desta hiperexpressão (Jones *et al.*, 2009). O aumento da expressão do IGF1 (Hadsell *et al.*, 2000) ou IGF2 (Bates *et al.*, 1995) e a ativação do receptor de IGF1 no tecido mamário resultam em desenvolvimento e crescimento rápido do tumor (Jones *et al.*, 2007). O IGF1, IGF2 e IGF1R foram identificados no câncer de cólon, onde a expressão do IGF1R apresentou correlação com indicadores de mau prognóstico como crescimento rápido, angiogênese e metástase (Reinmuth *et al.*, 2002). O IGF2 foi observado estar hiperexpresso no carcinoma adrenocortical no adulto e o IGF1R estava significativamente hiperexpresso no carcinoma adrecortical na criança quando comparado com o adenoma (Almeida *et al.*, 2008).

Durante a tumorigênese, a hiperexpressão de IGF1R presumivelmente aumentaria a capacidade de resposta celular ao IGF1 e IGF2, em relação à proliferação e inibição de apoptose. Em um modelo *in vivo*, Resnicoff *et al.* mostraram que a inibição do IGF1R levou a um aumento da apoptose de células tumorais, sendo o inverso também observado, isto é, o aumento da expressão de IGF1R reduziu o processo de apoptose (Resnicoff *et al.*, 1995). A inibição do receptor de IGF1 impediu a capacidade de transformação celular e atividade mitogênica em linhagens de

células de fibroblastos, frente a vários agentes oncogênicos (Sell *et al.*, 1993; Coppola *et al.*, 1994; Morricone *et al.*, 1995).

1.3 Insulina, IGF e neoplasias tireoidianas

O sistema IGF possui uma importante participação no crescimento e desenvolvimento normal da tireoide e parece estar envolvido também na tumorigênese (Malaguarnera *et al.*, 2011).

Estudos demonstraram que o IGF1 possui uma importante participação no crescimento da tireoide e formação de nódulos benignos e malignos, devido a sua atividade mitótica e antiapoptótica e que altas concentrações de IGF1 apresentam efeito mitogênico nos tireócitos de camundongos, deste modo, aumentando o tamanho dessas tireoides (LeRoith & Roberts, 2003). Além disso, em camundongos transgênicos que apresentam hiperexpressão de IGF1 e IGF1R humanos, ocorre aumento da tireoide devido ao aumento do lúmen folicular (Clement *et al.*, 2001).

Em humanos, a concentração de IGF1 sérico é maior nos pacientes com bócio multinodular do que em pacientes não apresentam problemas de tireoide (Volzke *et al.*, 2007). Células do adenoma tireoidiano são capazes de sintetizar IGF1 por mecanismo autócrino e, dessa forma, estimular o crescimento celular (Williams *et al.*, 1998). Em acromegálicos, ocorre aumento da vascularização tireoidiana, em comparação com indivíduos saudáveis e, tanto o volume da tireoide como a presença de nódulos, estão associados com a atividade e duração da doença (Gasperi *et al.*, 2002).

A resistência à insulina também tem sido associada ao aumento do

volume tireoidiano e risco de desenvolver nódulos e câncer de tireoide (Rezzonico *et al.*, 2008; Ayturk *et al.*, 2009).

Em algumas células cancerígenas observa-se um aumento da expressão do receptor de insulina e, em pacientes com hiperinsulinemia, ocorre o aumento da ativação do mesmo (Vella *et al.*, 2001). Esses achados sugerem que o aumento da incidência mundial do câncer da tireoide pode estar relacionado também com o aumento do aparecimento de resistência à insulina e síndrome metabólica, associados ao aumento da incidência de obesidade observada nos países mais desenvolvidos.

Durante a última década, estudos mostraram que o câncer de tireoide no adulto expressa IGF1, IGF2, IGF1R, as duas isoformas do receptor de insulina (INSR) e o receptor híbrido (INSR/IGF1R), mas o impacto clínico dessa expressão ainda não está claro (Malaguarnera *et al.*, 2011). O IGF-1 é expresso em 90% do carcinoma papilífero (CPT) e, em estudos *in vitro*, o mesmo estimula o crescimento de células derivadas do CPT (Belfiore *et al.*, 1999; Belfiore *et al.*, 2009). O IGF1R é expresso na maioria dos cânceres de tireoide e possui relação com tumores maiores e os INSR e INSR/IGF1R são encontrados em todos os tipos histológicos do carcinoma de tireoide, sendo o INSR predominando nos tumores pouco diferenciados (Belfiore *et al.*, 1999; Belfiore *et al.*, 2009).

Em um estudo realizado na Itália, Vella et al (2001) evidenciaram que os IGFs são produzidos localmente no câncer de tireoide: IGF1 pelas células estromais e IGF2 pelos tireócitos malignos. Além disso, estavam significativamente aumentados no tecido maligno quando comparados com o

tecido normal. Os receptores de IGF1 estavam hiperexpressos no carcinoma papilífero, mas não nos carcinomas pouco diferenciados ou indiferenciados enquanto que os receptores de insulina estavam hiperexpressos em todos os tipos histológicos do carcinoma de tireoide, com uma tendência a apresentarem valores maiores em tumores pouco diferenciados. Como consequência da hiperexpressão dos receptores de insulina, verificou-se um aumento dos receptores híbridos INSR/IGF1R (que possuem maior afinidade de ligação com o IGF1) e estes também estavam presentes em todos os tipos histológicos do carcinoma de tireoide. Esse estudo também demonstrou que a hiperexpressão dos INSRs ocorre, principalmente, através da isoforma A (INSRA) no câncer de tireoide e, tanto os receptores híbridos INSR/IGF1R quanto o INSRA, possuem uma importante participação na hiper ativação do sistema IGF no câncer de tireoide e no sinal mitogênico do IGF1 e IGF2 nesses tumores (Vella *et al.*, 2001).

Gydee *et al* (2004) observaram que o IGF1 e IGF1R estão expressos em alguns cânceres de tireoide em crianças e adolescentes, incluindo carcinoma papilífero e folicular. Tanto o IGF1 quanto o IGF1R não foram detectados em tecido de tireoide normal, sugerindo que a expressão deles seja limitada à doença neoplásica da tireoide ou que a intensidade de expressão no tecido tireoidiano normal está abaixo do limite de sensibilidade do exame imunohistoquímico. Esses autores compararam os seus resultados com os de estudos anteriores e mostraram que a expressão do IGF1 no carcinoma papilífero das crianças (39%) é bem menor do que a do carcinoma papilífero no adulto (90%). Gydee *et al* (2004) observaram que o

tumor mais agressivo e com maior recorrência na criança apresentou uma maior expressão de IGF1R. Esses achados sugerem que a expressão do IGF1R pode ter uma importante participação no comportamento mais agressivo do câncer de tireoide na criança.

Na última década, temos presenciado um aumento da prevalência de carcinomas papilíferos da tireoide, principalmente dos microcarcinomas (<1,0 cm). A cirurgia é o tratamento de escolha para estes tumores e costuma ser bem sucedida na maioria dos casos. No entanto, uma parte desses tumores apresenta um comportamento mais agressivo, desenvolvendo metástase linfonodais e à distância, independente do seu tamanho. É preocupante observar pacientes portadores de microcarcinomas papilíferos de histologia clássica, considerados de muito baixo risco, apresentarem múltiplas metástases linfonodais, recidiva tumoral e metástase à distância resistentes a radioiodoterapia (Ardito *et al.*, 2013).

A via Insulina/IGF está relacionada à ativação de vias clássicas associadas à tumorigênese tireoidiana, como PIK3 e MAPK, mas há poucos estudos que avaliaram o papel dos IGFs e seus receptores no carcinoma papilífero e, até o momento, nenhum estudo foi conclusivo sobre a relação entre a via insulina/IGF e as características clínicas e histopatológicas de maior agressividade do CPT. A análise e compreensão da relação destas vias insulina/IGF com o processo de progressão tumoral tireoidiano poderiam auxiliar, não só a identificar tumores com potencial mais agressivo, como também identificar aqueles pacientes portadores de metástases resistentes ao radioiodo e que poderiam se beneficiar com tratamento com

drogas seletivas para inibição de IGF1-kinase. Isso já é possível em outros tipos de câncer. Recentemente, o inibidor seletivo de IGF1-kinase (NVP-AEW541) tem se mostrado eficaz em bloquear a proliferação de células de tumores adrenocorticais, carcinoma de próstata, mamas e carcinoma colorretal. CPTs com alterações na via insulina/IGF, PIK3 e MAPK, também poderiam vir a se beneficiar com terapia utilizando o NVP-AEW541 (Almeida *et al.*, 2008).

Esse trabalho estudou, pela primeira vez, a expressão conjunta do IGF1, IGF2 e IGF1R nos carcinomas papilíferos de tireoide, incluindo o microcarcinoma papilífero (MCPT), correlacionando a presença e intensidade da expressão com os achados clínicos, histopatológicos e fatores de risco. A finalidade desse estudo foi avaliar o eixo IGF e o seu possível papel no comportamento do câncer de tireoide no adulto, com ênfase nos carcinomas considerados de baixo risco, incluindo o microcarcinoma papilífero. Saber como os CPTs mais agressivos expressam esses fatores de crescimento e seus receptores pode auxiliar a identificar aqueles tumores que apresentam maior potencial de recidiva. Além disso, podemos identificar, através do resultado dessa expressão, quais tumores resistentes ao tratamento com radioiodo poderiam se beneficiar com terapias com o inibidor seletivo de IGF1-kinase.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- I. Estudar a expressão do IGF1, IGF2, IGF1R, no carcinoma papilífero da tireoide, incluindo o microcarcinoma papilífero.

- II. Correlacionar os dados de expressão com as características clínicas, o diagnóstico histológico, o estadiamento e a estratificação de risco do carcinoma papilífero da tireoide.

POPULAÇÃO E MÉTODOS

3. POPULAÇÃO E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq, da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (processo nº 0397/11)

3.1 População

Trata-se de um estudo retrospectivo, baseado em dados obtidos de prontuários de pacientes operados por nódulos de tireoide e atendidos no Serviço de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e que foram submetidos a tireoidectomia, no período de 2002 a 2012. Foi realizado o levantamento de prontuários de 619 pacientes, desses, foram selecionados 110 pacientes operados por carcinoma papilífero de tireoide e subdivididos nos seguintes grupos: 48 casos com carcinoma papilífero > 1 cm e 62 casos com microcarcinoma papilífero.

O estadiamento e a estratificação de risco foram feitos por intermédio da análise dos prontuários, tendo como critérios a idade à época do diagnóstico, tamanho e extensão do tumor, variante histopatológica, presença ou não de metástases linfonodais ou metástase à distância. Foram considerados para o estadiamento os seguintes exames realizados: cintilografia de corpo inteiro (PCI) após dose de iodo, exame ultrassonográfico cervical, tomografia computadorizada e PET-SCAN, quando realizado.

As amostras de tecido tumoral foram provenientes do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da FMUSP. Todas as lâminas arquivadas coradas pela hematoxilina-eosina foram revistas pelas patologistas Dra. Monique Basso e Dra. Claudia Kliemann, para confirmação dos resultados anatomopatológicos definitivos.

Os pacientes foram estadiados, segundo o sistema TNM (T: tamanho do tumor no exame histopatológico, N: metástase linfonodal, M: metástase à distância) da AJCC/UICC (Wittekind *et al.*, 2002) (Tabela 1) e estratificados, de acordo com o risco de recidiva, em 3 grupos: baixo risco, risco intermediário e alto risco (Cooper *et al.*, 2009), obedecendo os seguintes critérios:

- Baixo risco: ausência de metástases locais ou à distância; dissecação macroscópica total do tumor, ausência de invasão tumoral dos tecidos ou estruturas loco-regionais; sem histologia agressiva (por ex., carcinoma de células altas, insular ou colunar) ou invasão vascular.

- Risco intermediário: invasão microscópica do tumor para os tecidos moles peritireoidianos na cirurgia inicial, tumor com histologia agressiva ou invasão vascular e metástase linfonodais.

- Alto risco: invasão tumoral macroscópica, ressecção incompleta do tumor, metástases à distância e tireoglobulina sérica elevada, muito acima da média após tratamento com RIT.

Tabela 1: Parâmetros utilizados na classificação TNM para câncer da tireoide.

T (Tumor)	N (Metástases Linfonodais)	M (Metástases distantes)	
T1 ≤ 2 cm (T1a ≤ 1 cm T1b 1-2 cm)	N0 ausentes	M0 ausentes	
T2 2 - 4 cm	N1a presente no nível VI	M1 presentes	
T3 > 4 cm limitado à tireoide ou com invasão extra-tireoidiana mínima	N1b metástase cervical lateral ou em mediastino superior		
T4a invasão de subcutâneo, laringe, traquéia, esôfago ou recorrente laríngeo			
T4b invasão de fáscia pré-vertebral, de carótida ou vasos mediastinais			
Tx desconhecido, sem invasão extra-tireoidiana	Nx não avaliados	Mx não avaliado	
Estágios			
Pacientes com < 45 anos			
Estágio I	T1, T2, T3	N0, N1a, N1b, Nx	M0
Estagio II	T1, T2, T3	N0, N1a, N1b, Nx	M1
Pacientes com 45 anos ou mais			
Estágio I	T1	N0	M0
Estágio II	T2	N0	M0
Estágio III	T3	N0	M0
	T1	N1a	M0
	T2	N1a	M0
	T3	N1a	M0
Estágio IVa	T4a	N0	M0
	T4a	N1a	M0
	T1	N1b	M0
	T2	N1b	M0
	T3	N1b	M0
	T4a	N1b	M0
Estágio IVb	T4b	N0, N1a, N1b, Nx	M0
Estágio IVc	T1, T2, T3	N0, N1a, N1b, Nx	M1

3.2 Exame imuno-histoquímico

Análise da expressão de IGF1, IGF2, IGF1R

Após seleção dos blocos de parafina contendo o tecido tumoral, estes foram cortados para a obtenção de 11 lâminas para o exame imuno-histoquímico. As reações imuno-histoquímicas foram realizadas pela Dra. Cristina Kanamura, na Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz e a leitura das lâminas foram realizadas por duas médicas patologistas do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, as doutoras Monique Basso e Claudia Kliemann. Elas não tinham o conhecimento prévio do estadiamento e estratificação de risco dos pacientes estudados.

Foram estudados a presença e intensidade da expressão do IGF1, IGF1R e IGF2 nos tecidos tumorais tireoidianos e no tecido não tumoral adjacente (grupo controle) .

Protocolo da reação imuno-histoquímica:

1. Desparafinização dos cortes histológicos em xilol.
2. Hidratação dos esfregaços através da imersão em álcool absoluto (3 banhos), álcool a 95% e álcool a 80%, seguida de lavagens em água corrente e água destilada.
3. Recuperação antigênica com solução de TRIS-EDTA 1mM, PH 9,0 por dois minutos em panela de pressão.
4. Bloqueio da peroxidase endógena feito pela incubação com água oxigenada a 3% (10 vol) em metanol, em 2 banhos de 5 min, seguido de lavagens em água corrente, água destilada e tampão PBS, 0,01

molar, pH 7,4.

5. Incubação com anticorpo primário (específico contra cada antígeno) por 18 a 72 horas a 4°C. O anticorpo não ligado ou ligado de maneira não específica são removidos por 3 lavagens subsequentes em tampão PBS.
6. Incubação com polímero conjugado com anti-imunoglobulinas de coelho e camundongo e enzima peroxidase por 30 minutos a 37°, seguida de 3 lavagens em tampão PBS.
7. Revelação com substrato Diaminobenzidina (DAB).
8. Contracoloração com hematoxilina de Harris, desidratação e montagem com Entellan e lamínula.

Para leitura das reações imuno-histoquímicas foi utilizado microscópio de luz, inicialmente em pequeno aumento (objetiva 10x), para localização da área de lesão de maior marcação e, a partir daí, contagem de 100 células no campo, com objetiva de 40x. A reação positiva é indicada pela presença de precipitado granulado castanho no citoplasma das células dos tecidos tireoidianos dos espécimes. Os casos positivos foram classificados, de acordo com a quantidade relativa de células positivas em 1+ a 3+ (tabela 2). Os casos positivos também foram classificados, de acordo com a intensidade da reação, em leve (1), moderado (2) e forte (3). Foram considerados negativos os que apresentaram positividade em menos de 1% das células analisadas. Foram utilizados como controles positivos, cortes histopatológicos de adenocarcinoma de mama e cólon. Com a finalidade de

facilitar a análise estatística dos resultados, foi calculado o escore H, resultado da multiplicação do escore da quantidade de células imunorreativas pelo escore da intensidade da reação (Detre *et al.*, 1995).

As informações dos anticorpos para análise imuno-histoquímica estão na tabela 3.

Tabela 2: Faixas percentuais de imunorreatividade utilizadas para avaliação quantitativa.

Leve + em + + +	positividade em menos de 10% das células no local examinado.	Valor no escore : 1
Moderada ++ em + + +	positividade de 11 a 50% das células	Valor no escore : 2
Intenso +++ em + + +	positividade estimada em mais de 50% das células	Valor no escore : 3

Tabela 3: Anticorpos utilizados para análise imuno-histoquímica.

Anticorpo	Clone	Fornecedor	Título	Compartimento celular relevante
Anti-IGF1	Policlonal	<i>Abcam</i>	1:100	Citoplasma
Anti-IGF1R	Policlonal	<i>Abcam</i>	1:50	Citoplasma
	W3D9			
Anti-IGF2	(Monoclonal)	<i>Abcam</i>	1:500	Citoplasma

3.3 Avaliação da expressão proteica de IGF1, IGF2 e IGF1R nos tecidos tumorais e não tumorais

A avaliação da expressão proteica de IGF1, IGF2 e IGF1R nos tecidos tumorais foi comparada com a expressão nos tecidos não tumorais

adjacentes. Os dados clínicos (idade e sexo), histopatológicos (variante histológica, tamanho do tumor, multicentricidade, presença de invasão vascular, extensão extratireoidiana, presença de metástase linfonodais ao diagnóstico), estratificação de risco (baixo, intermediário e alto risco) e estadiamento TNM, foram correlacionados com a intensidade da expressão proteica e também com a quantidade de células positivas para IGF-1, IGF-2 e IGF1R, através do escore H.

3.4 Análise estatística

Pela natureza dos dados semi-contínuos do IGF1, IGF1R e IGF2 (com amplitude de 0 e 9), foi aplicado o teste de Mann-Whitney nos comparativos entre duas categorias de variáveis categóricas e essas variáveis. Foi utilizado também o teste não paramétrico de **Wilcoxon** que é indicado quando se quer comparar dois grupos de informações com nível de mensuração numérica e as amostras são pareadas e não se deseja assumir suposições acerca da distribuição das amostras analisadas. É especialmente indicado em estudos com amostras pequenas.

Dados categóricos foram representados por frequência absoluta (n) e relativa (%) e comparados, utilizando o teste de Qui-quadrado de Pearson.

Foi considerado para todo estudo, nível de significância de $\alpha \leq 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Foram analisadas 110 amostras de tecido tumoral, 95 (86,4%) do sexo feminino e 15 (13,6%) do sexo masculino, sendo 48 carcinomas papilíferos > 1,0 cm e 62 microcarcinomas papilíferos.

No grupo com microcarcinoma papilífero, a média de idade foi de 46,18±14,26 anos, com tamanho médio dos nódulos de 0,76±0,2 cm. Neste grupo, observamos somente dois casos (3,2%) de invasão vascular, extensão extratireoidiana ocorreu em 22,6% (14/62), metástases linfonodais em 29,0% (18/62) e multicentricidade em 54,8% (34/62). Em relação ao estadiamento TNM, 82,3% (51/62) estavam no estágio I, 0% estavam no estágio II, 6,4% (4/62) estavam no estágio III e 11,3% (7/62) estavam no estágio IVA. Com relação a extratificação de risco, 53,2% (33/62) eram de baixo risco, 45,2% (28/62) de risco intermediário e 1,6% (1/62) de alto risco. Ao exame histopatológico, 77% (48/62) dos casos eram da forma clássica, 21% (13/62) da variante folicular e tivemos 1 caso (2%) da variante Warthin-like. (tabelas 4 e 5).

No grupo com carcinoma papilífero >1,0 cm, a idade média foi de 47,0±14,64 anos, com tamanho médio dos nódulos de 3,12±1,77 cm. Neste grupo, 27,08% (13/48) apresentaram invasão vascular, 27,08% (13/48) extensão extratireoidiana, 35,41% (17/48) metástases linfonodais e 45,83% (22/48) eram multicêntricos. Em relação ao estadiamento TNM, 56,25% (27/48) estavam no estágio I, 8,33% (4/48) no estágio II, 16,66% (8/48) no estágio III e 18,75% (9/48) no estágio IVA. Com relação à estratificação de risco, 50,0% (24/48) foram considerados de baixo risco, 35,41% (17/48) de

risco intermediário e 14,58% (7/48) de alto risco. Dos 48 carcinomas papilíferos > 1cm, 37,50% (18/48) eram da forma clássica, 50,0% (24/48) eram variantes foliculares, 8,33% (4/48) variante oncocítica, um com áreas focais de padrão insular (2,08%) e uma variante com estroma do tipo fasceíte nodular (2,08%) (tabela 5 e 6).

Tabela 4. Dados clínicos e patológicos de pacientes portadores de microcarcinoma papilífero da tireoide

MICROCARCINOMA PAPILÍFERO										
Pac.	Sexo	Idade (anos)	Anatomo Variante	Tamanho (cm)	Invasão Vascular	Ex. Extra-Tiroideana	Multi-centric.	Metastase	TNM	Estratificação de risco
1	F	72	folicular.	1,00	não	não	não	não	I	baixo
2	M	40	Clássica	0,50	não	não	não	não	I	baixo
3	F	51	Clássica	0,40	não	sim	não	não	III	intermediário
4	F	51	Clássica	0,70	não	não	sim	não	I	baixo
5	F	45	Clássica	0,90	não	não	não	não	I	baixo
6	F	47	folicular.	0,70	sim	não	sim	não	I	intermediário
7	F	57	warthin-like	1,00	não	não	sim	não	I	baixo
8	F	30	Clássica	0,60	não	não	não	sim	I	intermediário
9	F	49	Clássica	0,90	não	não	sim	não	I	baixo
10	F	51	Folicular	1,00	não	sim	sim	não	IVA	alto
11	F	37	Clássica	1,00	não	não	não	não	I	baixo
12	F	33	Folicular	1,00	não	não	sim	sim	I	intermediário
13	F	36	Folicular	0,30	não	não	não	não	I	baixo
14	F	42	Clássica	0,70	não	não	sim	sim	I	intermediário
15	F	37	Clássica	1,00	não	sim	não	não	I	intermediário
16	M	23	Clássica	0,70	não	não	não	sim	I	intermediário
17	F	27	Clássica	1,00	não	não	não	não	I	baixo
18	F	53	Clássica	0,70	não	não	sim	não	I	baixo
19	F	75	Folicular	0,60	não	não	não	não	I	baixo
20	F	37	Clássica	0,30	não	não	sim	não	I	baixo
21	M	73	Clássica	1,00	não	não	não	não	I	baixo
22	M	46	Clássica	0,30	não	não	não	não	I	baixo
23	M	55	Clássica	0,50	não	não	sim	não	I	baixo
24	F	46	Folicular	1,00	não	não	não	não	I	baixo
25	F	33	Clássica	0,60	não	não	sim	sim	I	intermediário
26	F	48	Folicular	0,90	não	não	sim	não	I	baixo
27	F	20	Clássica	1,00	não	não	não	não	I	baixo
28	M	63	Clássica	0,90	não	não	não	não	I	baixo
29	F	53	Clássica	1,00	não	sim	sim	não	III	intermediário
30	F	25	Clássica	0,90	não	sim	sim	não	I	intermediário
31	F	38	Clássica	0,60	não	não	não	não	I	baixo
32	F	55	Folicular	0,80	não	não	não	não	I	baixo
33	F	67	Clássica	0,60	não	não	sim	não	I	baixo
34	F	36	Clássica	0,80	não	não	não	não	I	baixo
35	F	41	Clássica	0,70	não	não	não	não	I	baixo
36	F	36	Clássica	0,70	não	sim	sim	não	I	intermediário
37	F	43	Clássica	0,90	não	não	não	sim	I	intermediário
38	F	54	Clássica	0,80	não	não	não	não	I	baixo
39	F	51	Clássica	1,00	não	sim	sim	sim	IVA	intermediário
40	F	63	Clássica	1,00	não	sim	não	sim	IVA	intermediário
41	F	45	Clássica	0,50	não	não	não	não	I	baixo
42	F	43	Clássica	0,60	não	não	sim	sim	I	intermediário
43	F	64	Folicular	0,40	não	não	sim	não	I	baixo
44	F	18	Clássica	1,00	não	não	não	não	I	baixo
45	F	33	Clássica	0,70	não	não	sim	sim	I	intermediário
46	F	29	Clássica	0,5	sim	sim	não	não	I	intermediário
47	F	64	Clássica	0,6	não	sim	não	não	III	intermediário
48	F	37	Clássica	0,9	não	não	sim	não	I	intermediário
49	F	25	Clássica	0,5	não	não	sim	sim	I	intermediário
50	F	49	Clássica	1,0	não	não	sim	não	I	baixo
51	F	31	Clássica	0,9	não	não	sim	sim	I	intermediário
52	F	58	Clássica	0,9	não	não	não	não	I	baixo
53	F	28	Clássica	1,0	não	sim	sim	não	I	intermediário
54	F	47	Clássica	0,6	não	não	sim	sim	III	intermediário
55	F	58	Clássica	0,8	não	sim	sim	sim	IVA	intermediário
56	M	63	Clássica	0,5	não	sim	sim	sim	IVA	intermediário

Continua

Tabela 4. Dados clínicos e patológicos de pacientes portadores de microcarcinoma papilífero da tireoide (continuação)

MICROCARCINOMA PAPILÍFERO										
Pac.	Sexo	Idade (anos)	Anatomo Variante	Tamanho (cm)	Invasão Vascular	Ex. Extra-Tiroideana	Multi-centric.	Metastase	TNM	Estratificação de risco
57	F	59	Clássica	1,0	não	não	sim	não	I	baixo
58	F	53	folicular	0,9	não	não	sim	não	I	baixo
59	F	75	oncocítica	0,6	não	não	sim	não	I	baixo
60	F	29	Clássica	1,0	não	não	sim	sim	I	intermediário
61	F	65	Clássica	0,7	não	sim	sim	sim	IVA	intermediário
62	F	51	Folicular	0,9	não	não	sim	sim	IVA	intermediário
Media		46,2		0,76	3,2%	22,6%	54,8%	29,0%		
DesvPad		14,26		0,21	(2/62)	(14/62)	(34/62)	(18/62)		

Tabela 5. Dados clínicos e patológicos de pacientes portadores de microcarcinoma papilífero da tireoide versus carcinoma papilífero > 1 cm

variável		<u>Microcarcinoma</u> (n total=62)		<u>Carcinoma</u> (n total=48)		<u>Teste</u>	
		%	n	%	n		
Idade	média±DP	46,18±14,26	-	47,00±14,64	-	Mann-Whitney	p=0,821
Sexo	Feminino	88,7%	55	83,3%	40	qui-quadrado	p=0,593
	Masculino	11,3%	7	16,7%	8		
TNM	I + II	82,3%	51	64,6%	31	qui-quadrado	p=0,059
	III + IVa	17,7%	11	35,4%	17		
Estratificação de risco	Baixo	53,2%	33	50,0%	24	qui-quadrado	p=0,886
	Intermediário + Alto	46,8%	29	50,0%	24		

Tabela 6. Dados clínicos e patológicos de pacientes portadores de carcinoma papilífero da tireoide > 1 cm

CARCINOMA PAPILÍFERO > 1 cm										
Pac.	Sexo	Idade (anos)	Anatomo Variante	Tamanho (cm)	Invasão Vascular	Ex. Extra-Tiroideana	Multi-centric.	Metastase	TNM	Estratificação de risco
63	F	48	Folicular	1,40	não	não	não	não	I	baixo
64	F	55	Clássica	1,10	não	sim	não	não	III	intermediário
65	M	30	Clássica	5,00	sim	não	não	não	I	intermediário
66	F	68	Clássica	3,00	sim	sim	sim	sim	IVA	alto
67	M	41	Clássica	1,40	não	não	sim	sim	I	intermediário
68	F	44	Folicular	9,00	não	não	não	não	I	baixo
69	F	45	Folicular	2,80	sim	sim	sim	sim	IVA	intermediário
70	M	54	oncoc.	3,00	não	não	não	sim	IVA	intermediário
71	F	73	Folicular	2,70	não	não	não	não	II	baixo
72	F	45	Folicular	1,50	não	não	sim	sim	I	baixo
73	F	85	Folicular	3,00	não	não	não	não	II	baixo
74	F	55	Clássica	6,00	não	não	não	não	III	baixo
75	F	61	Folicular	4,00	não	não	não	não	II	baixo
76	F	32	Clássica	1,20	não	não	não	não	I	baixo
77	F	60	Folicular	3,50	sim	não	não	não	IVA	alto
78	M	46	Folicular	1,50	não	não	não	não	I	baixo
79	M	33	Folicular	4,00	sim	não	sim	não	I	intermediário
80	F	48	Clássica	1,50	não	não	sim	não	I	baixo
81	M	28	Folicular	6,00	sim	não	não	não	I	intermediário
82	F	70	oncoc.	1,30	não	sim	não	não	III	intermediário
83	F	37	Clássica	1,30	não	não	sim	sim	I	intermediário
84	F	38	Folicular	4,00	não	não	não	não	I	baixo
85	F	42	Folicular	2,00	não	não	não	não	I	baixo
86	F	50	oncoc.	4,50	não	não	não	sim	III	intermediário
87	F	60	Folicular	1,80	não	não	não	não	I	baixo
88	F	49	Clássica	2,50	não	sim	sim	não	III	alto
89	F	13	Clássica	2,50	não	sim	não	sim	I	intermediário
90	F	50	Folicular	1,20	não	não	sim	sim	III	intermediário
91	F	27	Clássica	1,50	sim	sim	sim	sim	I	intermediário
92	F	30	Folicular	1,90	não	não	sim	não	I	baixo
93	F	58	Clássica	2,80	sim	sim	sim	sim	IVA	alto
94	F	61	Folicular	6,00	não	não	sim	não	III	baixo
95	F	30	Clássica	1,50	não	não	sim	não	I	baixo
96	F	50	folicular.	2,50	não	não	sim	não	II	baixo
97	F	58	oncoc.	4,00	sim	sim	sim	sim	IVA	intermediário
98	F	50	Folicular	5,00	sim	sim	sim	sim	IVA	alto
99	F	56	Clássica	4,00	sim	sim	sim	sim	IVA	alto
100	F	44	Folicular	4,00	não	não	sim	não	I	baixo
101	F	33	Folicular	5,00	não	não	não	não	I	baixo
102	F	24	Clássica	5,50	sim	sim	sim	sim	I	intermediário
103	F	27	Clássica	1,20	não	não	não	sim	I	intermediário
104	M	63	com áreas de padrão Insular	5,00	sim	não	não	não	III	intermediário
105	F	44	Folicular	4,00	não	não	não	não	I	baixo
106	F	72	Folicular	1,50	não	não	sim	não	I	baixo
107	F	52	Clássica	1,50	não	não	não	Não	I	baixo
108	M	40	Clássica	1,20	não	não	não	Não	I	baixo
109	F	37	Folicular estroma fasceíte nodular	4,00	não	não	sim	Não	I	baixo
110	F	40		5,00	não	sim	não	Sim	IVA	alto
Media		47		3,12	27,1%	27,1%	45,8%	35,4%		
DesvPad		14,6		1,77	(13/48)	(13/48)	(22/48)	(17/48)		

4.1 Resultados da expressão proteica do IGF1, IGF2 e IGF1R, através de exame imunohistoquímico

4.1.1- IGF1

A análise da imunorreatividade do IGF1 mostrou uma hiperexpressão do mesmo em 100% das amostras tumorais, quando comparado aos tecidos não tumorais adjacentes (grupo controle) ($p=0,001$) (figuras 6 e 7). Quando comparamos a expressão proteica do IGF1 nos microcarcinomas com a expressão dos carcinomas > 1 cm, não houve diferença significativa ($p=0,286$) (figura 8). Não houve diferença significativa entre a quantidade e intensidade de expressão do IGF1 para idade (figura 9), sexo (figura 10), variante histológica (figura 11), invasão vascular (figura 12), extensão extratireoidiana (figura 13), multicentricidade (figura 14), metástase linfonodal (figura 15) e estratificação de risco (figura 16). No entanto, observamos nos microcarcinomas uma expressão significativamente maior naqueles com estágio mais avançado ($p=0,022$) (figura 17).

Figura 6: Expressão do IGF1 do tumor (Estudo) X não-tumor (Controle).
A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1 cm

Figura 7: Imunohistoquímica para IGF 1 em carcinoma papilífero variante folicular com invasão vascular (A) e em Ca papilífero variante folicular com metástases linfonodais (B)

Figura 8: Expressão do IGF1: microcarcinoma X Carcinoma >1cm.

Figura 9: Expressão do IGF1 em relação à idade. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 10: Expressão do IGF1 em relação ao sexo. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 11: Expressão do IGF1 em relação a variante. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 12: Expressão do IGF1 em relação a invasão vascular. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 13: Expressão do IGF1 em relação a extensão extratiroideana. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 14: Expressão do IGF1 em relação a multicentricidade. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 15: Expressão do IGF1 em relação a metástases linfonodais. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 16: Expressão do IGF1 em relação a estratificação de risco. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 17: Expressão do IGF1 em relação ao TNM. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

4.1.2- IGF2

A análise da imunorreatividade do IGF2 mostrou expressão em 46,7% dos carcinomas papilíferos e verificamos uma maior expressão nos tecidos tumorais, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$) (figura 18 e 19).

Um dado que chamou a atenção foi a expressão nuclear presente e expressão citoplasmática ausente na maioria dos casos. A expressão proteica do IGF2 foi significativamente maior nos microcarcinomas que nos carcinomas >1 cm ($p=0,006$) (figura 20). Não houve diferença significativa entre a quantidade e intensidade de expressão do IGF2 para sexo (figura 21), variante histológica, (figura 22) extensão extratireoidiana (figura 23), metástase linfonodal (figura 24) e estratificação de risco (figura 25). Quando avaliamos a expressão do IGF2 em pacientes acima de 45 anos, observamos uma maior expressão neste grupo, porém sem diferença significativa ($p=0,078$) (figura 26). Observamos expressão de IGF2 significativamente maior nos microcarcinomas multicêntricos ($p=0,017$) (figura 27) e naqueles com estadiamento mais avançado ($p=0,041$) (figura 28). O IGF2 também se mostrou mais expresso nos tumores sem invasão vascular ($p=0,017$) (figura 29).

Figura 18: Expressão do IGF2 do tumor (Estudo) X não-tumor (Controle). A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 19: Reação imunohistoquímica do anticorpo monoclonal IGF2 com positividade nuclear em paciente com Ca papilífero clássico (A) e em Ca papilífero variante folicular (B)

Figura 20: Expressão do IGF2: microcarcinoma X Carcinoma >1cm.

Figura 21: Expressão do IGF2 em relação ao sexo. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 22: Expressão do IGF2 em relação a variante. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 23: Expressão do IGF2 em relação a extensão extratiroideana. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 24: Expressão do IGF2 em relação a metástase linfonodal. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 25: Expressão do IGF2 em relação a estratificação de risco. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 26: Expressão do IGF2 em relação à idade. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 27: Expressão do IGF2 em relação a multicentricidade. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 28: Expressão do IGF2 em relação ao TNM. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 29: Expressão do IGF2 em relação à invasão vascular nas amostras analisadas (microcarcinomas e carcinomas > 1cm).

4.1.3- IGF1R

A análise da imunorreatividade do IGF1R nos 110 carcinomas papilíferos (62 microcarcinomas e 48 carcinomas >1,0 cm) também mostrou uma hiperexpressão nos tecidos tumorais, quando comparados aos tecidos não tumorais (grupo controle) ($p < 0,001$) (figuras 30 e 31). O IGF1R esteve expresso em 99,0 % dos carcinomas papilíferos e não houve diferença significativa entre os microcarcinomas em comparação com carcinomas > 1 cm ($p = 0,860$) (figura 32). Também não houve diferença significativa entre a

quantidade e intensidade de expressão do IGF1R para idade (figura 33), sexo (figura 34), variante histológica (figura 35), invasão vascular (figura 36), extensão extratireoidiana (figura 37), multicentricidade (figura 38), metástase linfonodal (figura 39), estadiamento (figura 40) e estratificação de risco (figura 41).

Figura 30: Expressão do IGF1R do tumor (Estudo) X não-tumor (Controle).
A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 31: Reação imunohistoquímica para IGF1R em paciente com Ca papilífero variante folicular com invasão vascular (A) e em Ca papilífero variante clássica sem invasão ou metástases (B)

Figura 32: Expressão do IGF1R: microcarcinoma X Carcinoma >1cm.

Figura 33: Expressão do IGF1R em relação à idade. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 34: Expressão do IGF1R em relação ao sexo. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 35: Expressão do IGF1R em relação a variante. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 36: Expressão do IGF1R em relação a invasão vascular. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 37: Expressão do IGF1R em relação a extensão extratiroideana. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 38: Expressão do IGF1R em relação a multicentricidade. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 39: Expressão do IGF1R em relação a metástase linfonodal. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 40: Expressão do IGF1R em relação ao TNM. A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

Figura 41: Expressão do IGF1R em relação a estratificação de risco.

A) microcarcinomas B) Carcinomas > 1cm

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Em face ao aumento da prevalência de carcinoma papilífero nas últimas décadas e com a finalidade de avaliar o papel dos fatores de crescimento similares à insulina IGF1, IGF2 e o receptor de IGF1 nesses tumores, resolvemos estudar a expressão e a intensidade da expressão desses fatores de crescimento, através de exame imunohistoquímico. Com o intuito de estudar o comportamento dos microcarcinomas papilíferos, dividimos os pacientes em dois grupos: microcarcinomas e carcinomas >1,0 cm de diâmetro.

Em nosso estudo, observamos maior imunorreatividade do IGF1, IGF2 e IGF1R no CPT, quando comparado com o grupo controle, independente do tamanho do tumor ($p<0,001$); os nossos achados foram concordantes com um estudo realizado na Itália por Vella *et al.* (2002) que observaram que o IGF1 e IGF2 estavam significativamente aumentados no tecido maligno quando comparados com o tecido normal e que os receptores de IGF1 estavam hiperexpressos no carcinoma papilífero e não no carcinoma pouco diferenciado. Ying-Jian Liu *et al.* (2013) também observaram hiperexpressão imunohistoquímica do IGF1 e do IGF1R em nódulos benignos e malignos de tireoide, quando comparados com o tecido não tumoral adjacente. Nesse estudo, a expressão proteica no IGF1 e IGF1R foi maior no CPT do que no adenoma folicular e no bócio coloide adenomatoso.

Em nosso trabalho, observamos maior expressão do IGF2 nuclear do

que no citoplasma. Vella *et al.* (2002) mostraram que os tireocitos malignos expressam e produzem IGF2, de forma autócrina e hiperexpressam o receptor de insulina, principalmente através da isoforma A. O IGF2 se liga a esse receptor com alta afinidade, ativa o crescimento e pode afetar o comportamento do carcinoma de tireoide.

Com a finalidade de avaliar se havia diferença de expressão nos tumores que apresentavam estágios mais avançados, analisamos o estadiamento e estratificação de risco de cada paciente, nos dois grupos.

Quando avaliamos a expressão proteica do IGF1 e IGF1R nos microcarcinomas e comparamos com o CPT > 1 cm, não houve diferença significativa ($p=0,286$ e $p=0,860$; respectivamente). Com relação ao IGF2, porém, a expressão foi significativamente maior no grupo de microcarcinomas ($p=0,006$). Não encontramos nenhum estudo na literatura que avaliou a expressão do IGF1, IGF2 e IGF1R nos microcarcinomas e comparou essa expressão com a de tumores maiores; no entanto, Maiorano *et al.* (2000) observaram que os carcinomas de tireoide que apresentavam maior diâmetro, apresentavam maior expressão do IGF1 e IGF1R.

Gydee *et al.* (2004) observaram que o IGF1 e IGF1R estão expressos em alguns cânceres de tireoide em crianças e adolescentes, incluindo o carcinoma papilífero e o carcinoma folicular. Nesse trabalho, tanto o IGF1 quanto o IGF1R não foram detectados em tecidos tireoidianos normais. Em nosso estudo, também observamos maior expressão protéica do IGF1 e IGF1R no carcinoma papilífero, porém, a nossa casuística incluiu somente adultos. Diferente dos achados de Gydee *et al.*, verificamos

imunorreatividade do IGF1 e IGF1R em quase todos os tecidos não tumorais analisados (89%) porém, a quantidade de células coradas e a intensidade da reação foi significativamente muito menor que nos carcinomas ($p < 0,001$). Quando avaliamos a expressão do IGF2, no entanto, verificamos que apenas uma amostra de tecido não tumoral apresentava uma leve expressão enquanto que todos os outros tecidos controle foram negativos. Isso pode ter ocorrido por termos utilizado um anticorpo monoclonal de IGF2 que, diferente do anticorpo policlonal, pode ter diminuído a sensibilidade do teste porém, com aumento da especificidade. Podemos concluir, em nosso estudo, que o IGF2 não está expresso no tecido tireoidiano não tumoral ou que a expressão seja tão pequena que permaneça abaixo da sensibilidade do teste.

Em nosso estudo, quase 100% dos carcinomas papilíferos apresentavam uma hiperexpressão do IGF1 e IGF1R, do mesmo modo que outros estudos na literatura (Silva Filho *et al.* 1999; Yashiro *et al.* 1989). Silva Filho *et al.* (1999) observaram imunorreatividade do IGF1 em mais de 90% dos carcinomas papilíferos e das metástases linfonodais, não indicando diferença significativa da expressão do IGF1 entre o tumor primário e as metástases.

Quando avaliamos a expressão protéica do IGF1 e correlacionamos com idade, sexo, variante histológica, invasão vascular, extensão extratireoidiana, multicentricidade, metástases linfonodais e estratificação de risco, não identificamos diferença significativa, conforme observado também por Silva Filho *et al.* (1999). No entanto, observamos uma expressão

significativamente maior nos tumores mais avançados (estágios III e IVA), quando comparados com os menos avançados (estágios I e II) ($p=0,022$). Silva Filho *et al.* (1999) observaram que o IGF1 encontrava-se significativamente mais expresso em pacientes acima de 40 anos ($p<0,01$) e isso pode estar associado a tumores com estadiamento mais avançado. Maiorano *et al.* (2000), de modo semelhante ao nosso estudo, também não observaram diferença significativa entre a imunorreatividade do IGF1 e IGF1R em relação ao gênero, idade, metástases linfonodais e estratificação de risco; no entanto, identificaram diferença significativa em relação a extensão extratireoidiana e tamanho do tumor.

Quando avaliamos a expressão protéica do IGF1R e correlacionamos com idade, sexo, variante histológica, invasão vascular, extensão extratireoidiana, multicentricidade, metástases linfonodais, TNM e estratificação de risco, não identificamos diferença significativa, conforme observado também por Silva Filho *et al.* (1999). Diferentemente, Gydee *et al.* (2004) observaram hiperexpressão significativa do IGF1R em tumores com características mais agressivas (invasão, metástase, persistência ou recorrência da doença), quando comparados com tumores com características indolentes (tumores confinados à glândula) ($p=0,029$), em uma população de crianças e adolescentes. Porém, quando esses autores avaliaram a expressão do IGF1 com os mesmos parâmetros por nós utilizados, não encontraram diferença significativa. Em nosso estudo, observamos uma expressão significativamente maior do IGF1 nos tumores mais agressivos, ($p=0,022$). Essa diferença de achados, pode ser devido a

diferença da população estudada por eles (crianças e adolescentes) e o número de casos (n=29) ser muito menor que o nosso (n=110).

Quando avaliamos a expressão protéica do IGF2 e correlacionamos com sexo, variante histológica, extensão extratireoidiana, metástases linfonodais e estratificação de risco, não identificamos diferença significativa. Mas, observamos uma expressão significativamente maior nos microcarcinomas multicêntricos ($p=0,017$) e naqueles em estágio mais avançado (estágios III e IVA), quando comparados com os menos avançados (I e II) ($p=0,041$). Observamos também uma maior expressão do IGF2 nos pacientes mais velhos, acima de 46 anos, quando comparados com os mais jovens, com 45 anos ou menos, porém, sem diferença significativa ($p=0,078$). Almeida *et al.* (2008), observaram uma expressão significativamente maior do IGF2 em carcinomas adrenocorticais em adultos, quando comparados com adenoma ($p<0,001$) e observaram também maior expressão no adenoma e carcinoma adrenocortical no adulto do que na criança. No estudo realizado por Vella *et al.* (2002), os autores observaram uma expressão do IGF2 significativamente maior nos carcinomas de tireoide, principalmente nos poucos diferenciados, quando comparados com o tecido tireoidiano normal. Em nosso estudo observamos uma expressão significativamente maior nos carcinomas sem invasão vascular, quando comparados com os que tinham invasão vascular ($p=0,017$).

Não existe nenhum estudo na literatura que avaliou a relação entre a expressão do IGF2 no carcinoma papilífero e características clínicas, estadiamento TNM e estratificação de risco. Em nosso estudo, observamos

maior expressão do IGF1 e IGF2 nos microcarcinomas papilíferos mais avançados. Os nossos resultados sugerem que eles possam ser utilizados, no futuro, como marcadores de melhor ou pior prognóstico.

Os resultados do nosso estudo, juntamente com o de outros autores, permitem abrir caminho para o desenvolvimento e utilização de novos alvos terapêuticos, direcionados para pontos específicos da vias sinalizadoras do IGF1 e seus receptores. A análise e compreensão da relação destas vias insulina/IGF com o processo de progressão tumoral tireoidiano poderão, futuramente, auxiliar a identificar tumores com potencial mais agressivo, como também identificar aqueles pacientes portadores de metástases resistentes ao radioiodo que poderão se beneficiar com tratamento com drogas seletivas para inibição de IGF1-kinase.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6. CONCLUSÕES

- 1) No presente estudo, observamos que o IGF1 e IGF2 foram significativamente mais expressos nos microcarcinomas em estágios mais avançados.
- 2) IGF2 apresentou maior expressão nos microcarcinomas papilíferos e esta expressão foi significativamente maior nos tumores multicêntricos.

PERSPECTIVAS

- 1) A análise da expressão do IGF1 e IGF2 poderá ser utilizada para identificar os microcarcinomas com potencial para apresentar comportamento mais agressivo. Esses pacientes talvez possam se beneficiar com um tratamento e seguimento diferenciado.
- 2) Os nossos resultados permitem abrir caminho para o desenvolvimento e utilização de novos alvos terapêuticos, direcionados para pontos específicos das vias sinalizadoras do IGF1 e seus receptores e também identificar aqueles pacientes que poderão ser tratados com drogas seletivas para inibição de IGF1-kinase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Almeida MQ, Fragoso MCBV, Lotfi CFP, Santos MG, Nishi MY, Costa MHS, Lerario AM, Maciel CC, Mattos GE, Jorge AAL, Mendonça BB, Latronico AC. Expression of Insulin-like Growth Factor-II and Its Receptor in Pediatric and Adult Adrenocortical Tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 93(9): 3524-3531, 2008.
- 2) Ayturk S, Gursoy A, Kut A, Anil C, Nar A, Tutuncu NB. Metabolic syndrome and its components are associated with increased thyroid volume and nodule prevalence in a mild-to-moderate iodine-deficient area. *Eur J Endocrino* 161:599-605, 2009.
- 3) Ardito G, Revelli L, Giustozzi E, Salvatori M, Fadda G, Ardito F, Avenia N, Ferretti A, Rampin L, Chondrogiannis S, Colletti PM, Rubello D. Aggressive papillary thyroid microcarcinoma: prognostic factors and therapeutic strategy. *Clin Nucl Med*. 38(1):25-8, 2013.
- 4) Bates P, Fisher R, Ward A, Richardson L, Hill DJ, Graham CF. Mammary cancer in transgenic mice expressing insulin-like growth factor II. *J Cancer* 72:1189-1193, 1995.
- 5) Belardi V, Gallagher EJ, Novosyadlyy R, LeRoith D. Insulin and IGFs in Obesity-Related Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 18: 277-289, 2013.
- 6) Belfiore A, Frasca F. IGF and insulin receptor signaling in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13(4): 381-406, 2008.
- 7) Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocrine Reviews* 30:586-623, 2009.
- 8) Belfiore A, Pandini G, Vella V, Squatrito S, Vigneri R. Insulin/IGF-1 hybrid receptors play a major role in IGF-1 signaling in thyroid câncer. *Biochemie* 81:403-407, 1999.
- 9) Brito AS, Coeli CM, Barbosa FS, Caetano R, Santos MO, Vaisman M. Estimates of thyroid câncer incidence in Brazil: na approach using polynomial models. *Cad Saúde Pública* 27: 1441-1444, 2011.
- 10) Castro AS, Junior GG. GH/IGF e neoplasia: O que há de novo nesta associação? *Arq Bras Endocrinol Metab* 49:833-842, 2005.
- 11) Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ 2003 Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively

- studied cohort of U.S. adults. *New Engl J Med* 348:1625–1638, 2003.
- 12)Clement S, Refetoff S, Robaye B, Dumont JE, Schurmans S. Low TSH requirement and goiter in transgenic mice overexpressing IGF-1 and IGF-1-R in the thyroid gland. *Endocrinology* 142:5131-5139, 2001.
 - 13)Cooper D, Doherty G, Haugen B, Kloos R, Lee S, Mandel S, Mazzaferri E, Molver B, Pacini F, Schlumberger M, Sgerman S, Steward D, Tuttle M. Revised American Thyroid Association Management Guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 19:1167-1215, 2009.
 - 14)Coppola D, Ferber A, Miura M, Sell C, D'Ambrosio C, Rubin R, et al. A functional insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 14(7): 4588-95, 1994.
 - 15)Coughlin SS, Calle EE, Teras LR, Petrelli J, Thun MJ. Diabetes mellitus as a predictor of cancer mortality in a large cohort of US adults. *Am J Epidemiol* 159:1160–1167, 2004.
 - 16)Currie CJ, Poole CD, Gale EA. The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes. *Diabetologia* 52: 1766–1777, 2009.
 - 17)Davies L, Welch HG. Current Thyroid Cancer trends in the United States. *Jama Otolaryngol Head Neck Surg* 140(4): 317-22, 2014.
 - 18)Detre S, Jotti GS, Dowsett M. A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: validation for estrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol* 48:876-878, 1995.
 - 19)de-Freitas-Junior JC, Carvalho S, Dias AM, Oliveira P, Cabral J, Seruca R, Oliveira C, Morgado-Díaz JA, Reis CA, Pinho SS. Insulin/IGF-I Signaling Pathways Enhances Tumor Cell Invasion through Bisecting GlcNAc N-glycans Modulation. An Interplay with E-Cadherin. *PLoS One* 25;8(11):e81579, 2013.
 - 20)DeOstrovich KK, Lambertz I, Colby JK, Tian J, Rundhaug JE, Johnston D, Conti CJ, DiGiovanni J, Fuchs-Young R. Paracrine overexpression of insulin-like growth factor-1 enhances mammary tumorigenesis in vivo. *Am J Pathol* 173:824 – 834, 2008.
 - 21)Frystyk J, Vestbo E, Skjaerbaek C, Morgensen CE, Orskov H. Insulin-Like Growth Factors in Human Obesity. *Metabolism* 44(Suppl 4):35–44, 1995.
 - 22)Gallagher EJ, LeRoith D. Minireview: IGF1, Insulin, and Cancer. *Endocrinology* 152: 2546-2551, 2011.

- 23) Gasperi M, Martino E, Mannetti L, Aroiso M, Porreti S, Faglia G, Mariotti S, Colao AM, Lombardi G, Baldelli R, Camanni F, Liuzzi A. Prevalence of thyroid diseases in patients with acromegaly: results of an Italian multi-center study. *J Endocrinol Invest* 25:240-245, 2002.
- 24) Giovannucci E, Pollak M, Platz EA, Willett WC, Stampfer MJ, Majeed N, et al. A prospective study of plasma insulin-like growth factor-1 and binding protein-3 and risk of colorectal neoplasia in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:345-9, 2000.
- 25) Grinspoon S, Clemmons D, Swearingen B, Klibansk A. Serum insulin like growth factor binding protein-3 levels in the diagnosis of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 80:927-932, 1995.
- 26) Gyda H, O'Neil JT, Patel A, Bauer AJ, Tuttle RM, Francis GL. Differentiated thyroid carcinomas from children and adolescents Express IGF-1 and the receptor (IGF-1-R). Cancer with the most intensive IGF-1-R expression may be more aggressive. *Pediatr Res* 55:709-715, 2004.
- 27) Hadsell DL, Murphy KL, Bonnette SG, Reece N, Laucirica R, Rosen JM. Cooperative interaction between mutant p53 and IGF1 accelerates mammary tumorigenesis. *Oncogene* 19:889-898, 2000.
- 28) Hellawell GO, Turner GD, Davies DR, Poulosom R, Brewster SF, Macaulay VM. Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. *Cancer Res* 2002;62:2942-50.
- 29) Hemkens LG, Grouven U, Bender R, Gu"nster C, Gustschmidt S, Selke GW, Sawicki PT. Risk of malignancies in patients with diabetes treated with human insulin or insulin analogues: a cohort study. *Diabetologia* 52:1732-1744, 2009.
- 30) Jain S, Golde DW, Bailey R, Geffner ME 1998 Insulin-like growth factor-I resistance. *Endocr Rev* 19:625-46, 1998.
- 31) Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* Mar-Apr; 58(2):71-96, 2008.
- 32) Jones RA, Campbell CI, Gunther EJ, Chodosh LA, Petrik JJ, Khokha R. Transgenic overexpression of IGF-1R disrupts mammary ductal morphogenesis and induces tumor formation. *Oncogene* 26:1636-1644, 2007.

- 33) Jones RA, Campbell CI, Wood GA, Petrik JJ, Moorehead RA. Reversibility and recurrence of IGF-IR-induced mammary tumors. *Oncogene* 28:2152-2162, 2009.
- 34) Leal Ade C, Canton AP, Montenegro LR, Coutinho DC, Arnhold IJ, Jorge AA Mutations in insulin-like growth factor receptor 1 gene (IGF1R) resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 55(8):541-9, 2011.
- 35) LeRoith D, Roberts CT Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 195:127-137, 2003.
- 36) Leung KC, Doyle N, Ballesteros M, Waters MJ, Ho KK. Insulin regulation of human hepatic growth hormone receptor: divergent effect on biosynthesis and surface translocation. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4712-4720, 2000.
- 37) Maiorano E, Ciampolillo A, Viale G, Maisonneuve P, Ambrosi A, Triggiani V, Marra E, Perlino E. Insulin-like growth factor I expression in thyroid tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 8:110-119, 2000.
- 38) Malaguarnera R, Marcavallo A, Belfiori A. The insulin and IGF-1 pathway in endocrine glands carcinogenesis. *Journal of Oncology* 2012.
- 39) Malaguarnera R, Frasca F, Garozzo A, Giani F, Pandini G, Vella V, Viguineri R, Belfiori A. Insulin receptor isoforms and insulin-like growth factor receptor in human follicular cell precursor from papillary thyroid cancer and normal thyroid. *Endocrine research* 96:766-774, 2011.
- 40) Morrione A, DeAngelis T, Baserga R. Failure of the bovine papillomavirus to transform mouse embryo fibroblasts with a targeted disruption of the insulin-like growth factor I receptor genes. *J Virol* 69(9): 5300-3, 1995.
- 41) Murphy SK, Huang Z, Wen Y, Spillman MA, Whitaker RS, Simel LR, Nichols TD, Marks JR, Berchuck A. Frequent IGF2/H19 domain epigenetic alterations and elevated IGF2 expression in epithelial ovarian cancer. *Mol Cancer Res* 4:283 – 292, 2006.
- 42) Nakae J, Kido Y, Accili D. Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-1 receptors. *Endocr Rev* 22:818-835, 2001.
- 43) Novosyadlyy R, Lann DE, Vijayakumar A, Rowzee A, Lazzarino DA, Fierz Y, Carboni JM, Gottardis MM, Pennisi PA, Molinolo AA, Kurshan N, Mejia W, Santopietro S, Yakar S, Wood TL, LeRoith D. Insulin-mediated acceleration of breast cancer development and progression

- in a nonobese model of type 2 diabetes. *Cancer Res* 70:741–751, 2010.
- 44) Papa V, Pezzino V, Costantino A, Belfiore A, Giuffrida D, Frittitta L, Vannelli GB, Brand R, Goldfine ID, Vigneri R. Elevated insulin receptor content in human breast cancer. *J Clin Invest* 86: 1503–1510, 1990.
- 45) Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R. Wordwilde Increasing Incidence of Thyroid Cancer: Update on Epidemiology and Risk Factors. *Journal of Cancer Epidemiology*, volume 2013, 10 páginas, ID do artigo: 965212, 2013
- 46) Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer* 8(12): 915-928, 2008.
- 47) Pollak M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nature Reviews Cancer* 12(3):159-169, 2012.
- 48) Reinmuth N, Fan F, Liu W, Parikh A, Stoeltzing O, Jung Y, Bucana C, Radinsky R, Gallick G, Ellis L. Impact of insulin-like growth factor receptor-I function on angiogenesis, growth, and metastasis of colon cancer. *Laboratory Investigation* 82(10):1377-89, 2002.
- 49) Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, O'Dwyer ST, Shalet SM, Egger M. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet* 363:1346 – 1353, 2004.
- 50) Resnicoff M, Abraham D, Yutanawiboonchai W, Rotman HL, Kajstura J, Rubin R, et al. The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo. *Cancer Res* 1995; 55(11): 2463-9.
- 51) Rezzonico J, Rezzonico M, Pusiol E, Pitoia F, Niepomnischce H. Introducing the thyroid gland as another victim of the insulin resistance syndrome. *Thyroid* 18:461-464, 2008.
- 52) Rezzonico JN, Rezzonico M, Pusiol E, Pitoia F, Niepomnischce H. Increased prevalence of insulin resistance in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Metab Syndr Relat Disord* 7:375-380, 2009.
- 53) Scarfó RL. Los factores de crecimiento muscular y los ejercicios de fuerz. *Efdeportes* 10:83; 2005
- 54) Seccareccia E, Pnina B. The role of the insulin-like growth factor-I receptor in malignancy: An update. *Growth Hormone and IGF Research* 22: 193-199, 2012.

- 55) Sell C, Rubini M, Rubin R, Liu JP, Efstratiadis A, Baserga R. Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(23): 11217-21, 1993.
- 56) Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *Journal of Molecular Endocrinology* 47: 1-10, 2011.
- 57) Silva Filho GB, Maciel RM, Takahashi MH, Alberti VN, Castro IV, Saldiva PH, Durazzo MD, Ferraz AR. Study of immunohistochemical expression of insulin-like growth factor I and proliferating cell nuclear antigen in thyroid gland papillary carcinoma and its metastasis. *Head Neck* 21:723-727, 1999.
- 58) Steuerman R, Shevah O, Laron Z. Congenital IGF-I deficiency tends to confer protection against pos-natal development of malignancies. *Eur J Endocrinol* 164:485 – 489, 2011.
- 59) Williams DW, Williams ED, Thomas DW. Loss of dependence on IGF-I for proliferation of human thyroid adenoma cells. *British Journal of Cancer* 57:535-539, 1988.
- 60) Wittekind C, Compton CC, Greene FL, Sobin LH. TNM residual tumor classification revisited. *Cancer* 1;94(9):2511-6, 2002.
- 61) Van der Laan BF, Freeman JL, Asa SL. Expression of growth factors and growth factor receptors in normal and tumorous human thyroid tissues. *Thyroid* 5:67-73, 1995.
- 62) Vella V, Sciacca L, Pandini G, Mineo R, Squatrito S, Vigneri R, Belfiore A. The IGF system in thyroid cancer: new concepts. *Mol Pathol* 54:121-124, 2001.
- 63) Vella V, Pandini G, Sciacca L, Mineo R, Pezzino V, Belfiore A. A novel autocrine loop involving IGF-II and the insulin receptor isoform-A stimulates growth of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 87(1):245-254, 2002.
- 64) Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. Diabetes and Cancer. *Endocrine Related Cancer* 16:1103-1123, 2009.
- 65) Volzke H, Friedrich N, Schipf S, Haring R, Ludemann J, Nauck M, Dorr M, Brabant G, Wallaschofski H. Association between serum insulin-like growth factor-1 levels and thyroid disorders in a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 92:4039-4045, 2007.
- 66) Yashiro T, Ohba Y, Murakami H, Obara T, Tsushima T, Fujimoto Y, Shizume K, Ito K. Expression of insulin-like growth factor receptors in

primary human thyroid neoplasm. *Acta Endocrinol* 121: 112-120, 1989.

- 67) Ying-Jian Liu, Wei Qiang, Xing-Jun Liu, Li Xu, Hui Guo. Association of insulin-like growth factor-1 with thyroid nodules. *Oncology Letters* 2:1297-1301, 2011.
- 68) Ying-Jian Liu, Wei Qiang, Jing Shi, Si-Quing Lv, Bing-Yin Shi. Expression and significance of IGF-1 and IGF-1R in thyroid nodules. *Endocrine* 44:158-164, 2013.