RENÊ GERHARD

Avaliação do papel diagnóstico e prognóstico da expressão imunoistoquímica de NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α e galectina-3 em espécimes tireoideanos por *tissue microarrays*

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

Área de concentração: Oncologia
Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai

São Paulo
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gerhard, Renê
Avaliação do papel diagnóstico e prognóstico da expressão imunoistoquímica de NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α e galectina-3 em espécimes tireoideanos por *tissue microarrays* / Renê Gerhard. -- São Paulo, 2009.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Radiologia.
Área de concentração: Oncologia.
Orientadora: Maria Aparecida Nagai.

Descritores: 1.Glândula tireóide 2.Neoplasias da glândula tireóide 3.Imunoistoquímica 4.Agentes moduladores da angiogênese 5.Análise serial de tecidos

USP/FM/SBD-275/09

Dedicatória

"Ao chegar em casa, tenho de falar com minha esposa, conversar com as crianças (...). Vejo tudo isso como parte de meus afazeres; são coisas que precisam ser feitas, a menos que um homem se contente em ser um estranho na própria casa. Além disso, todos temos a obrigação de portar-nos do modo mais cortês possível com aqueles que a natureza, o acaso ou a própria vontade nos deram como companheiros de vida".(*Utopia*, Thomas More).

Durante estes anos encontrei enorme dificuldade em conciliar minhas atividades como médico (patologista da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas e de um laboratório privado em São Paulo) com aquelas necessárias à execução deste trabalho. Os afazeres foram muitos e os anos passaram rápido. Não raro, a família ficou em segundo plano. Não sei se souberam compreender a minha ausência, mas dedico a elas - Luci, Luísa e Letícia - a conclusão deste trabalho.

Agradecimentos

À Professora Dra. Maria Aparecida Nagai, orientadora deste trabalho, modelo de pesquisadora, meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos, pelas críticas e observações argutas e pela paciência.

Ao Professor Dr. Augusto Fernando Soares, pelo acolhimento e oportunidade de realizar parte deste estudo no Departamento de Patologia do Hospital A. C. Camargo.

À Suely Nonogaki, pelo apoio fundamental na realização da técnica de imunoistoquímica, sem o qual seria impossível a realização desse trabalho.

Ao Dr. José Humberto Fregnani pelo auxílio imprescindível na análise cuidadosa dos dados estatísticos e pela compreensão dos propósitos deste trabalho.

À Sibeli Salaorni, experiente técnica do laboratório, pela paciência e carinho durante os "trabalhos de bancada" realizados durante as fases iniciais deste estudo.

Aos funcionários Rômulo e Carlinhos, do Departamento de Patologia do Hospital A. C. Camargo, pelo cuidado na separação dos blocos de parafina e construção do bloco de TMA.

Aos funcionários Douglas, Rafael, Ângela e Simone da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas, pela laboriosa tarefa de separar os blocos e as lâminas arquivadas e pelo auxílio na separação dos históricos e laudos anátomo-patológicos.

Aos demais pós-graduandos do laboratório pelo carinho e convivência fraterna.

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

Referências: adaptado de *International Committe 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 Julia 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 figuras
Lista de tabelas
Resumo
Summary
1 INTRODUÇÃO..... 1
1.1 Patogênese molecular do câncer de tireóide..... 2
1.2. Angiogênese..... 9
1.3 Biomarcadores em tireóide..... 13
1.4 NDRG1..... 17
1.5 Osteonectina..... 20
1.6 Fatores da família do VEGF e seus receptores..... 24
1.7 HIF-1α..... 28
1.8 Galectina-3..... 32
2 OBJETIVOS..... 37
3 MÉTODOS..... 39
3.1 Casuística..... 39
3.2 *Tissue microarray*..... 44
3.3 Técnica imunoistoquímica..... 46
3.4 Avaliação imunoistoquímica..... 52
3.5 Análise estatística..... 57
4 RESULTADOS..... 60
5 DISCUSSÃO..... 93
6 CONCLUSÕES..... 125
7 ANEXOS..... 127
8 REFERÊNCIAS..... 140
Apêndice

Lista de figuras

Gráfico 1 – Modelo hierarquizado teórico para explicar os desfechos relacionados ao câncer..... 59

Figura 1 - Expressão imunoistoquímica de NDRG1 em lesões da tireóide..... 63

Figura 2 - Expressão imunoistoquímica de osteonectina em lesões da tireóide.... 64

Figura 3 - Expressão imunoistoquímica de VEGF-A em lesões da tireóide..... 65

Figura 4 - Expressão imunoistoquímica de VEGF-C em lesões da tireóide..... 66

Figura 5 - Expressão imunoistoquímica de Flk-1/KDR em lesões da tireóide.....69

Figura 6 - Expressão imunoistoquímica de HIF-1α em lesões da tireóide..... 70

Figura 7 - Expressão imunoistoquímica de galectina-3 em lesões da tireóide..... 71

Gráfico 2 - Modelo hierarquizado teórico dos fatores de risco relacionados aos possíveis eventos (recorrência, óbito) em pacientes com carcinoma de tireóide.....91

Gráfico A1- Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma de tireóide de acordo com o diagnóstico histológico..... 127

Gráfico A2 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma de tireóide de acordo com o estadiamento TNM.....128

Gráfico A3 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma de tireóide de acordo com o índice prognóstico de *AMES*.....129

Gráfico A4 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma de tireóide de acordo com o tamanho do tumor..... 130

Gráfico A5 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma de tireóide de acordo com a idade..... 131

Gráfico A6 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma papilífero de tireóide (clássico e variante folicular) de acordo com a multicentricidade do tumor.....132

Gráfico A7 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma papilífero de tireóide (clássico e variante folicular) de acordo com a extensão tumoral extra-tireoideana..... 133

Gráfico A8 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma de tireóide de acordo com a expressão imunoistoquímica de galectina-3.....134

Gráfico A9 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma de tireóide de acordo com a co-expressão imunoistoquímica de VEGF-C e galectina-3..... 135

Gráfico A10 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma de tireóide de acordo com a co-expressão imunoistoquímica de Flk-1/KDR e galectina-3.....136

Lista de tabelas

Tabela 1 - Dados demográficos dos 225 pacientes incluídos neste estudo..... 40

Tabela 2 – Seguimento clínico (*status* clínico) dos pacientes com carcinoma de tireóide..... 41

Tabela 3 – Relação dos blocos adicionais selecionados para este estudo..... 43

Tabela 4 – Diagnósticos histológicos dos fragmentos presentes no TMA de tireóide..... 44

Tabela 5 - Lista de anticorpos utilizados.....46

Tabela 6 – Resultados da expressão imunoistoquímica..... 72

Tabela 7 – Associação entre a expressão imunoistoquímica de Flk-1/KDR com VEGF-A e VEGF-C nas lesões benignas e malignas da tireóide..... 73

Tabela 8 – Associação entre a expressão imunoistoquímica de HIF-1α com NDRG1 e VEGF-A nas lesões benignas e malignas da tireóide..... 74

Tabela 9 – Associação entre a expressão imunoistoquímica de VEGF-A em carcinomas papilíferos da tireóide (tumores primários) e suas respectivas metástases.....74

Tabela 10 – Associação entre a expressão imunoistoquímica de VEGF-C em carcinomas papilíferos da tireóide (tumores primários) e suas respectivas metástases.....75

Tabela 11 - Valor diagnóstico das proteínas diferencialmente expressas nas lesões de tireóide.....76

Tabela 12 - Valor diagnóstico da co-expressão de galectina-3 com as demais proteínas (NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR e HIF-1α) nas lesões de tireóide..... 76

Tabela 13 – Distribuição dos pacientes com carcinoma de tireóide segundo o estadiamento TNM.....78

Tabela 14 – Distribuição dos pacientes com carcinoma de tireóide segundo o índice prognóstico de *AMES*.....78

Tabela 15 – Associação entre a expressão imunoistoquímica de NDRG1 e as variáveis demográficas e clínico-patológicas em pacientes com carcinoma de tireóide.....79

Tabela 16 - Associação entre a expressão imunoistoquímica de VEGF-A e as variáveis demográficas e clínico-patológicas em pacientes com carcinoma de tireóide.....80

Tabela 17 - Associação entre a expressão imunoistoquímica de VEGF-C e as variáveis demográficas e clínico-patológicas em pacientes com carcinoma de tireóide.....81

Tabela 18 - Associação entre a expressão imunoistoquímica de Flk-1/KDR e as variáveis demográficas e clínico-patológicas em pacientes com carcinoma de tireóide.....81

Tabela 19 - Associação entre a expressão imunoistoquímica de osteonectina e as variáveis demográficas e clínico-patológicas em pacientes com carcinoma de tireóide.....82

Tabela 20 - Associação entre a expressão imunoistoquímica de HIF-1α e as variáveis demográficas e clínico-patológicas em pacientes com carcinoma de tireóide.....83

Tabela 21 - Associação entre a expressão imunoistoquímica de galectina-3 e as variáveis demográficas e clínico-patológicas em pacientes com carcinoma de tireóide.....84

Tabela 22 – Análise univariada da sobrevida livre de evento para alguns parâmetros individuais em pacientes com carcinoma da tireóide.....88

Tabela 23 – Análise univariada da sobrevida livre de evento para a expressão imunoistoquímica dos marcadores moleculares (NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α e galectina-3) nos pacientes com carcinoma da tireóide.....89

Tabela 24 – Análise univariada da sobrevida livre de evento para a co-expressão de galectina-3 com as demais proteínas (NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR e HIF-1α) nos pacientes com carcinoma da tireóide.....90

Tabela 25 – Fatores de risco independentes relacionados ao evento (recorrência, óbito) em pacientes com carcinoma de tireóide.....92

Tabela A1 – Classificação TNM do carcinoma da glândula tireóide.....137

Tabela A2 - Estadiamento do carcinoma bem diferenciado (papilífero e folicular) da glândula tireóide com base no TNM.....138

Tabela A3 – Índice prognóstico de *AMES*[1].....139

Resumo

Gerhard R. *Avaliação do papel diagnóstico e prognóstico da expressão imunoistoquímica de NDRG1, Osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α e Galectina-3 em espécimes tireoideanos por tissue microarrays* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 164p

INTRODUÇÃO: O crescimento e a progressão de diversos tipos de tumores dependem da angiogênese, isto é, a formação de novos vasos sanguíneos. Fatores da família do VEGF (VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR) são potentes mediadores da angiogênese e níveis elevados destes fatores podem ser detectados em vários tumores humanos. Outras proteínas como NDRG1, osteonectina, HIF-1α e galectina-3 encontram-se associadas, de modo indireto, à angiogênese. MÉTODOS: O objetivo deste estudo foi analisar a expressão imunoistoquímica de NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α e galectina-3 em 265 lesões benignas e malignas da tireóide por *tissue microarray* (TMA), incluindo tireóide normal, bócio, adenoma folicular, carcinoma papilífero, carcinoma folicular e metástases de carcinoma papilífero e folicular da tireóide. Lâminas em diferentes níveis do bloco de TMA foram submetidas à reação imunoistoquímica utilizando-se anticorpos específicos contra NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α, galectina-3. Foi realizada uma avaliação semiquantitativa da expressão destas proteínas, analisando-se a intensidade de coloração e a porcentagem de células positivas para cada marcador. RESULTADOS: De um modo geral, a expressão de NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α e galectina-3 foi maior nos carcinomas de tireóide em relação ao bócio e adenoma folicular. Dentre as proteínas estudadas, a galectina-3 foi aquela que apresentou melhor acurácia diagnóstica na distinção entre lesões benignas e malignas da tireóide, com uma sensibilidade 64,1% e especificidade de 94,4%. Nos carcinomas de tireóide, a expressão de NDRG1, VEGF-A, VEGF-C e HIF-1α apresentou correlação estatística significativa com estádio TNM mais avançado e alto risco pelo método *AMES*. A análise multivariada revelou que a idade ≥ 45 anos, o tamanho tumoral maior do que 4,0 cm, o estádio IV do TNM e a perda de expressão de galectina-3 foram fatores que contribuíram para a recorrência ou óbito em pacientes com carcinoma de tireóide. CONCLUSÕES: Nos carcinomas de tireóide, a expressão de NDRG1, VEGF-A, VEGF-C, HIF-1α se correlacionou com tumores mais avançados. Com exceção da galectina-3, nenhuma das proteínas estudadas apresentou impacto na sobrevida dos pacientes com carcinoma de tireóide. Nestes pacientes, a perda de expressão de galectina-3 foi um fator de risco para recorrência ou óbito.

Descritores: 1.Glândula tireóide 2.Neoplasias da glândula tireóide 3.Imunoistoquímica 4.Agentes moduladores da Angiogênese 5.Análise serial de tecidos

Summary

Gerhard R. *Study of the diagnostic and prognostic role of immunohistochemical expression of NDRG1, osteonectin, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α and galectin-3 in thyroid specimens by tissue microarray*. [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 164p.

INTRODUCTION: The growth and progression of different types of tumors depend on angiogenesis, i.e., the formation of new blood vessels. Members of the VEGF family (VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR) are potent mediators of angiogenesis and elevated levels of these factors can be detected in various human tumors. Other proteins such as NDRG1, osteonectin, HIF-1α and galectin-3 are indirectly associated with angiogenesis. METHODS: The objective of this study was to investigate the immunohistochemical expression of NDRG1, osteonectin, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α and galectin-3 in 265 benign and malignant thyroid lesions by tissue microarray (TMA), including normal thyroid, goiter, follicular adenoma, papillary carcinoma, follicular carcinoma, and papillary and follicular thyroid carcinoma metastases. Slides obtained from different levels of the TMA block were submitted to immunohistochemistry using specific antibodies against NDRG1, osteonectin, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α, and galectin-3. The expression of these proteins was analyzed semiquantitatively, evaluating the intensity of staining and the percentage of positive cells for each marker. RESULTS: In general, the expression of NDRG1, osteonectin, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α and galectin-3 was higher in thyroid carcinomas when compared to goiter and follicular adenoma. Among the proteins studied, galectin-3 presented the best diagnostic accuracy in the distinction between benign and malignant thyroid lesions, with a sensitivity of 64.1% and specificity of 94.4%. In thyroid carcinomas, the expression of NDRG1, VEGF-A, VEGF-C and HIF-1α was significantly correlated with a more advanced TNM stage and AMES high risk. Multivariate analysis revealed that age ≥ 45 years, tumor size > 4.0 cm, TNM stage IV and loss of expression of galectin-3 were associated with recurrence or death in patients with thyroid carcinoma. CONCLUSIONS: In thyroid carcinomas, the expression of NDRG1, VEGF-A, VEGF-C and HIF-1α is correlated with more advanced tumors. Except for galectin-3, none of the proteins studied had an impact on the survival of patients with thyroid carcinoma. In these patients, loss of expression of galectin-3 was a risk factor for recurrence or death.

Descriptors: 1.Thyroid gland 2.Thyroid neoplasms 3.Immunohistochemistry 4.Angiogenesis modulating agents 5.Tissue array analysis

1. INTRODUÇÃO

Embora represente menos de 1% de todos os tumores malignos, o câncer de tireóide é o tumor maligno mais comum do sistema endócrino, com taxas de incidência global variando de 0,5 a 10 casos por 100.000 habitantes (DeLellis et al., 2004). No Brasil, a taxa de incidência de câncer de tireóide foi analisada num período de 20 anos (1980 a 1999) e variou, entre os homens, de 0,7 a 3,0 casos por 100.000 habitantes e, nas mulheres, de 0,8 a 10,9 casos por 100.000 habitantes, nas cidades de Belém e São Paulo, respectivamente (Coeli et al., 2005). Para o ano de 2008, eram esperados cerca de 1,44 milhões de novos casos de câncer invasivo nos EUA, incluindo 37.340 casos novos de câncer de tireóide, dos quais 28.410 ocorreriam apenas em mulheres (Jemal et al., 2008).

Os tumores malignos da glândula tireóide compreendem um grupo heterogêneo de neoplasias que apresentam características clínico-patológicas distintas. Os tumores epiteliais são os mais freqüentes, sendo que o carcinoma que se origina do epitélio folicular corresponde à cerca de 90 a 95% dos carcinomas de tireóide. Em geral, os carcinomas derivados do epitélio folicular são indolentes e potencialmente curáveis por tratamento cirúrgico, com ou sem radioiodoterapia. Apenas uma pequena fração destes tumores apresenta um comportamento clínico mais agressivo e não responde ao tratamento usual (DeLellis et al., 2004; Kondo et al., 2006).

1.1 Patogênese molecular do câncer de tireóide

De acordo com achados clínicos e critérios morfológicos (histológicos) bem estabelecidos, os carcinomas tireoideanos derivados do epitélio folicular podem ser classificados como carcinomas bem diferenciados (incluem os carcinomas papilífero e folicular), pouco diferenciados e indiferenciados (ou anaplásicos). Evidências clínico-patológicas sugerem uma progressão tumoral do câncer de tireóide a partir de um carcinoma bem diferenciado (papilífero ou folicular), progredindo para um carcinoma pouco diferenciado e, finalmente, evoluindo para uma forma clinicamente mais agressiva e histologicamente menos diferenciada, isto é, o carcinoma indiferenciado da tireóide. Alterações moleculares distintas ou prevalentes em um ou outro destes tumores também suportam o modelo de progressão tumoral no câncer de tireóide (DeLellis et al., 2004; Nikiforov, 2004; Kondo et al., 2006).

O carcinoma papilífero é a neoplasia maligna mais comum da glândula tireóide e corresponde a cerca de 90% dos casos de câncer de tireóide. Este tumor é constituído por células foliculares bem diferenciadas que apresentam alterações nucleares típicas (fendas e pseudoinclusões nucleares, cromatina em “vidro fosco” e irregularidade da membrana nuclear), bem como padrões arquiteturais variados como a formação de papilas (padrão clássico, o mais comum) ou folículos (variante folicular) ou, ainda, aspectos citológicos diversos como a presença de células oncocíticas (variante oncocítica) ou de células altas (variante de células altas). Os microcarcinomas papilíferos são tumores menores do que 1,0 cm na sua maior dimensão, geralmente são ocultos e podem ser encontrados em até 30% das

glândulas tireóides examinadas em necrópsias. A maioria dos carcinomas papilíferos ocorre em adultos entre 20 e 50 anos de idade, sendo mais comuns em mulheres (DeLellis et al., 2004; Kondo et al., 2006).

Uma das anormalidades genéticas mais comuns do carcinoma papilífero envolve o proto-oncogene *RET* (*rearranged during transfection*), que codifica um receptor tirosina-quinase transmembrana normalmente expresso no sistema nervoso em desenvolvimento. No carcinoma papilífero, as anormalidades do gene *RET* ocorrem devido a rearranjos cromossômicos que levam à fusão do seu domínio tirosina-quinase com seqüências terminais 5´ de genes heterólogos expressos nas células foliculares, resultando na formação de oncogenes e proteínas quiméricas denominadas *RET/PTC* (*rearranged during transfection/papillary thyroid carcinoma*). Foram descritas várias quimeras *RET/PTC*, sendo que as mais freqüentes envolvem os genes *H4* e *ELE1* e são denominadas *RET/PTC1* (60 a 70% dos casos) e *RET/PTC3* (20 a 30% dos casos), respectivamente. Os rearranjos *RET/PTC* são mais comuns nos carcinomas papilíferos clássicos, nos microcarcinomas papilíferos e em pacientes mais jovens (50 a 60% dos pacientes pediátricos) (Kondo et al., 2006; Santoro et al., 2006; Ciampi, Nikiforov, 2007).

Mutações somáticas do gene *BRAF* têm sido reconhecidas como uma das alterações genéticas mais comuns do carcinoma papilífero de tireóide em adultos (29 a 69% dos casos). O gene *BRAF* codifica uma serina/treonina quinase citoplasmática (BRAF) que pertence à família das proteínas RAF (ARAF, BRAF, CRAF). *BRAF* é a isoforma predominante nas células foliculares da tireóide. Dentre as mutações do

gene *BRAF* em tireóide, a mutação puntiforme $BRAF^{V600E}$ é a mais frequente e mais comumente detectada no carcinoma papilífero clássico, nos microcarcinomas papilíferos e nas variantes de células altas e oncocítica. Tal mutação corresponde à transversão de timina para adenina no nucleotídeo 1799 do exon 15 do gene *BRAF*, resultando na substituição do aminoácido valina por glutamato no resíduo de número 600 da proteína correspondente (V600E). Mutações do gene *BRAF* são raras em carcinomas papilíferos de pacientes jovens, tanto em sua forma esporádica, quanto aquelas associadas com exposição à radiação ionizante. (Kimura et al., 2003; Nikiforova et al., 2003; Sobrinho-Simões et al., 2005; Kondo et al., 2006; Ciampi, Nikiforov, 2007).

Outras anormalidades genéticas do carcinoma papilífero da tireóide incluem mutações dos proto-oncogenes da família *RAS* e rearranjos do gene *NTRK1* (Segev et al., 2003a; Sobrinho-Simões et al., 2005; Kondo et al., 2006). As alterações genéticas acima descritas - mutações dos genes *RAS* e *BRAF* e rearranjos dos genes *RET* e *NTRK1* - resultam na ativação constitutiva das proteínas efetoras envolvidas na via de sinalização da MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), propiciando a transformação maligna da célula tireoideana para o carcinoma papilífero. Tais alterações genéticas encontram-se presentes em mais de 70% dos carcinomas papilíferos da tireóide, porém raramente se superpõe, ou seja, tumores que apresentam qualquer uma destas alterações geralmente não apresentam as demais (Kondo et al., 2006; Ciampi, Nikiforov, 2007).

A variante folicular do carcinoma papilífero apresenta algumas peculiaridades genéticas que o diferem do carcinoma papilífero clássico. Cerca de 7% dos casos apresentam uma mutação *BRAF* específica, denominada $BRAF^{K601E}$, que não é observada na forma clássica ou em outras variantes do carcinoma papilífero. Além disso, nota-se uma maior freqüência de mutações dos proto-oncogenes *RAS* nesta variante quando comparada à sua forma clássica (Sobrinho-Simões et al., 2005). Por outro lado, mutações $BRAF^{V600E}$ e rearranjos *RET/PTC* são raras na variante folicular quando comparadas ao carcinoma papilífero clássico (Santoro et al., 2006; Ciampi, Nikiforov, 2007).

O carcinoma folicular corresponde a cerca de 10% dos cânceres da tireóide. Este tumor é formado por células foliculares bem diferenciadas que não apresentam alterações nucleares típicas do carcinoma papilífero e que se dispõe em arranjo folicular, sólido ou trabecular. A maioria dos carcinomas foliculares é encapsulada e a presença de infiltração capsular e/ou invasão vascular distingue estes tumores dos adenomas foliculares. Um tumor com infiltração capsular e/ou invasão vascular limitada é classificado como carcinoma folicular minimamente invasivo; enquanto que o carcinoma folicular extensamente invasivo é aquele que apresenta, ao exame histológico, infiltração capsular e invasão vascular disseminada. A variante oncocítica do carcinoma folicular é constituída predominantemente por células oncocíticas (células de Hürthle). Os carcinomas foliculares ocorrem mais freqüentemente na quinta década de vida e são mais comuns em mulheres (DeLellis et al., 2004; Kondo et al., 2006).

Os adenomas e carcinomas foliculares da tireóide são freqüentemente aneuplóides e exibem uma alta prevalência de perda de heterozigose que envolve vários cromossomos. Por outro lado, a grande maioria dos carcinomas papilíferos da tireóide são diplóides ou quasi-diplóides e apresentam uma menor freqüência de perda de heterozigose. Portanto, as neoplasias foliculares (adenomas e carcinomas) se caracterizam por uma maior instabilidade cromossômica quando comparadas aos carcinomas papilíferos da tireóide (Sobrinho-Simões et al., 2005, Kondo et al., 2006). Em comparação aos carcinomas papilíferos, as mutações puntiformes dos proto-oncogenes *N-RAS* e *H-RAS* são mais freqüentes nos adenomas e carcinomas foliculares (até 50% dos casos) e possivelmente estão relacionadas com a maior instabilidade cromossômica destes tumores (Sobrinho-Simões, 2005).

A translocação t(2;3)(q13;p25) resulta na fusão dos genes *PAX8* e *PPARγ* e foi descrita em adenomas e carcinomas foliculares da tireóide (Marques et al., 2002; Lacroix et al., 2004). *PAX8* (*paired-box gene 8*) é um fator de transcrição envolvido na regulação da expressão de genes que são importantes para o desenvolvimento e função normal da glândula tireóide, tais como *TG* (*thyroglobulin*), *TPO* (*thyroid peroxidase*) e *NIS* (*Na/I symporter*). *PPARγ* (*peroxisome proliferator-activated receptor-γ*) é um membro da família de receptores nucleares hormonais esteróides que se encontra relacionado ao metabolismo da glicose, ao desenvolvimento do tecido adiposo e à inibição da proliferação celular (Fajas et al., 2001; Kondo et al., 2006). O rearranjo *PAX8-PPARγ* resulta numa oncoproteína que provavelmente promove a tumorigênese em tireóide ao inibir a atividade transcricional da forma selvagem do fator PPARγ (Kroll et al., 2000).

Os carcinomas pouco diferenciados da tireóide são tumores que se originam do epitélio folicular e exibem padrões de crescimento sólido, trabecular ou insular, sendo freqüente o encontro de figuras de mitose, necrose e invasão vascular. Tais tumores podem se originar de um carcinoma bem diferenciado da tireóide. Metástases linfonodais ou à distância são freqüentes em pacientes com carcinoma pouco diferenciado da tireóide. Já os carcinomas indiferenciados (ou anaplásicos) da tireóide são tumores extremamente raros e agressivos que geralmente acometem pacientes acima dos 60 anos de idade. Estes tumores exibem extensa invasão loco-regional e se caracterizam por células fusiformes, células "escamóides" ou células gigantes pleomórficas. Mitoses atípicas e necrose são freqüentes. Os carcinomas indiferenciados também podem estar associados com carcinomas bem diferenciados (carcinoma papilífero ou folicular) ou pouco diferenciados da tireóide (DeLellis et al., 2004; Kondo et al., 2006).

Nikiforova et al. (2003) observaram que os carcinomas papilíferos com mutações do gene *BRAF* encontravam-se em estadios mais avançados e apresentavam maior extensão tumoral extra-tireoideana se comparados aos tumores do mesmo tipo histológico desprovidos destas mutações. Mutações do gene *BRAF* também foram detectadas em carcinomas pouco diferenciados (13% dos casos) e indiferenciados (10% dos casos) da tireóide e, ao exame histológico, os tumores positivos para estas mutações apresentavam áreas de carcinoma papilífero, sugerindo uma progressão tumoral a partir de um tumor bem diferenciado para tumores mais agressivos (Nikiforova et al., 2003). Garcia-Rostan et al. (2003) demonstraram que mutações dos proto-oncogenes *RAS* são mais comuns nos carcinomas pouco

diferenciados da tireóide e, possivelmente, estão associadas à progressão tumoral em tireóide. O gene supressor tumoral *p53* codifica um fator de transcrição que atua na regulação do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose. Mutações deste gene induzem instabilidade genômica e estão envolvidas na tumorigênese e progressão tumoral da maioria dos tumores humanos (Hanahan, Weinberg, 2000). Em tireóide, mutações do gene *p53* são raras nos carcinomas bem diferenciados (0 a 9% dos casos) e freqüentes nos carcinomas pouco diferenciados (17 a 38% dos casos) e indiferenciados (67 a 88% dos casos). Além disso, mutações deste gene são restritas apenas às áreas indiferenciadas em tumores que também apresentam áreas histologicamente bem diferenciadas. Estes dados sugerem que a inativação de *p53* está envolvida com a progressão tumoral em tireóide (Nikiforov et al., 2004, Kondo et al., 2006).

1.2 Angiogênese

A formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma rede vascular pré-existente é denominada angiogênese. No início deste processo, ocorre a proteólise da matriz extracelular adjacente à rede vascular, acompanhada pela migração e proliferação de células endoteliais. Estas se agrupam e formam novos brotos vasculares a partir dos vasos originais. Numa etapa subseqüente, ocorre a remodelação e maturação dos novos vasos, no qual novos elementos são incorporados à parede vascular. A força exercida pelo fluxo sanguíneo sobre a parede vascular recém-formada induz alterações na interação entre as células endoteliais e entre estas e a matriz extracelular. Modificações da composição da membrana basal e da matriz extracelular, bem como a migração e diferenciação dos pericitos e das células musculares lisas, determinam a maturação e estabilidade dos novos vasos (Risau, 1997).

Em condições fisiológicas, a angiogênese é um processo transitório e finamente regulado. Diversos fatores pró e anti-angiogênicos regulam as atividades das células endoteliais durante as diferentes etapas da angiogênese. O aumento da demanda por oxigênio (O_2) é um estímulo para a formação de novos vasos nos tecidos em crescimento. Nos tecidos em que há uma diminuição da difusão de O_2, o principal mecanismo que controla a expansão do leito vascular consiste na ativação de determinados fatores de transcrição conhecidos como fatores induzidos por hipóxia ou HIFs (*hypoxia-inducible factors*). Estes fatores induzem a expressão de vários genes relacionados à angiogênese como, por exemplo, os genes da família dos

fatores de crescimento endotelial ou VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Carmeliet, 2003; Semenza, 2007).

A ação parácrina de VEGF sobre o leito vascular quiescente leva à ativação das células endoteliais, promovendo a sua migração e proliferação. A dissolução de moléculas relacionadas às junções celulares (caderina, ocludina), a expressão de novos tipos de integrinas e alterações da matriz extracelular, como uma matriz rica em fibronectina e fibrina, favorecem a migração das células endoteliais. Além disso, a secreção de enzimas (proteinases) que degradam a matriz extracelular (uroquinase, metaloproteinases, heparinases) facilita a invasão das células endoteliais e a formação de novos brotos vasculares (Carmeliet 2003; Hicklin, Ellis, 2005). Outros fatores angiogênicos promovem a maturação e estabilidade dos vasos recém-formados. Fatores como PDGF (*platelet-derived growth factor*) e TGF-β (*transforming growth factor-β*) promovem o recrutamento e diferenciação de células musculares lisas que se incorporam à parede vascular, enquanto que a angiopoietina-1 aumenta a adesão entre as células endoteliais ao atuar sobre as moléculas de junção celular (Risau, 1997; Carmeliet, 2003).

As proteinases também provocam a liberação de moléculas que se encontram ligadas à matriz extracelular, incluindo fatores pró (TGF-β e fator de crescimento de fibroblastos, FGF ou *fibroblast growth factor*) e anti-angiogênicos (trombospondina-1, endostatina, angiostatina). Ao promover a estabilidade dos novos vasos e inibir a proliferação vascular, os fatores anti-angiogênicos determinam a resolução do processo angiogênico. A ação coordenada de fatores pró e anti-angiogênicos revelam

que há uma regulação balanceada destes fatores durante a angiogênese. Em vasos imaturos, uma quantidade insuficiente de fatores pró-angiogênicos leva à ruptura e sangramento, com conseqüente redução do fluxo sanguíneo e regressão ou involução vascular (Carmeliet, 2003).

A angiogênese está presente em processos fisiológicos (como no ciclo ovariano normal), mas também em diversas situações patológicas tais como condições inflamatórias (artrite, úlceras gástricas e duodenais, psoríase), distúrbios vasculares (retinopatia diabética, alterações secundárias à aterosclerose), malformações vasculares (hemangiomas cavernosos) e câncer (Folkman, 1995).

Segundo Hanahan e Weinberg (2000), uma das alterações essenciais associadas ao câncer é a angiogênese. Em suas fases iniciais, a maioria dos tumores não possui a capacidade de promover angiogênese e, conseqüentemente, estes são pequenos e limitados como, por exemplo, os carcinomas *in situ*. Portanto, uma condição necessária para a expansão e crescimento tumoral é a formação de novos vasos a partir de uma rede vascular pré-existente. Desse modo, alguns tumores adquirem um "fenótipo angiogênico", promovendo a formação de novos vasos que suportem e possibilitem a viabilidade das células tumorais, bem como das células do estroma tumoral (Folkman, 1995; Hanahan, Folkman, 1996).

A aquisição do "fenótipo angiogênico" pela células tumorais ocorre predominantemente por alterações do balanço entre fatores pró e anti-angiogênicos (Hanahan, Folkman, 1996). Vários tumores humanos exibem um aumento da

expressão dos fatores VEGF e FGF em relação ao tecido normal correspondente. A trombospondina-1, um fator anti-angiogênico, é expressa de modo constitutivo em células normais e a sua expressão é controlada positivamente pelo gene *p53*. A expressão de trombospondina-1 encontra-se diminuída em vários tumorais, os quais também exibem perda de função do gene *p53* (Folkman, 1995; Hanahan, Folkman, 1996; Hanahan, Weiberg, 2000).

A vascularização da glândula tireóide encontra-se aumentada em diferentes condições patológicas tais como tireoidites (tireoidite de Hashimoto, tireoidite de De Quervain), doença de Graves e câncer tireoideano. Os membros da família do VEGF são os principais fatores associados à angiogênese em doenças da tireóide. O processo inflamatório observado nas tireoidites se acompanha de aumento da vascularização e da permeabilidade vascular e as citocinas liberadas neste processo modulam positivamente a expressão de VEGF. Os níveis séricos de VEGF são maiores em pacientes com carcinoma da tireóide em relação aos indivíduos com tireóide normal ou bócio e, geralmente, se associam a um pior prognóstico (Ramsden, 2000; Klein, Catargi, 2007).

1.3 Biomarcadores em tireóide

Há quase duas décadas, diversas proteínas e enzimas, bem como determinados genes, têm sido investigados como possíveis marcadores no diagnóstico das lesões tireoideanas (Soares, Sobrinho-Simões, 1995; Matsuo et al., 2004; Asa, 2005; Cerutti, 2007). Por meio de diferentes métodos de estudo (imunoistoquímica, métodos enzimáticos, reação de polimerase em cadeia (PCR, *polymerase chain reaction*), técnicas de hibridização *in situ*), alguns destes potenciais marcadores têm sido empregados não somente no diagnóstico histológico, mas também na avaliação pré-operatória dos nódulos tireoideanos em material obtido por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) (Segev, 2003).

Não o uso isolado de um ou outro marcador, mas o emprego de uma combinação de vários marcadores tem sido a proposta para uma melhor avaliação das lesões e neoplasias foliculares da tireóide (Asa, 2005; Nakamura et al., 2006; Liu et al., 2008). Cerutti et al. (2006) estudaram a expressão imunoistoquímica de quatro marcadores - DDIT3 (*DNA damage–inducible transcript 3*), ARG2 (*arginase II*), ITM1 (*integral membrane protein 1*), Clorf24 (*chromosome 1 open reading frame 24*) – em adenomas e carcinomas foliculares da tireóide. Os quatro marcadores estudados foram efetivos na distinção entre os dois tumores, com sensibilidade de até 100% para ITM1 e Clorf24. Neste estudo, os autores também investigaram a expressão dos mesmos marcadores em seis espécimes de PAAF de tireóide com diagnóstico citológico suspeito. Os marcadores foram positivos nos esfregaços citológicos de dois espécimes com diagnóstico histológico final de carcinoma

papilífero e variante folicular do carcinoma papilífero; e negativos em dois espécimes com diagnóstico final de bócio colóide e nódulo hiperplásico. Um caso cujo diagnóstico histológico foi carcinoma medular mostrou positividade para DDIT3 e ARG2 no espécime citológico correspondente. Em apenas um dos casos (com positividade para os quatro marcadores) não houve comprovação histológica, pois o paciente não foi submetido ao tratamento cirúrgico.

Vários estudos utilizaram a metodologia do *cDNA microarray* em tireóide e encontraram uma grande variedade de genes diferencialmente expressos entre tireóide normal, lesões não neoplásicas e neoplasias benignas e malignas da tireóide (Wasenius et al., 2003; Barden et al., 2003; Mazzanti et al., 2004; Finley et al., 2004; Aldred et al., 2004; Chevillard et al., 2004). Weber et al. (2005) detectaram 80 genes diferencialmente expressos entre adenomas e carcinomas foliculares da tireóide. Três genes – *CCND2* (*cyclin D2*), *PCSK2* (*protein convertase 2*), *PLAB* (*prostate differentiation factor*) - que apresentavam uma maior diferença de expressão gênica entre estes tumores foram selecionados e estudados pela técnica de *RT-PCR* (*real time-PCR*) quantitativa: nos carcinomas foliculares, a expressão dos genes *CCND2* e *PCSK2* encontrava-se diminuída, enquanto o gene *PLAB* encontrava-se superexpresso. Utilizando estes três genes em conjunto, os autores conseguiram diferenciar os carcinomas dos adenomas foliculares com uma acurácia diagnóstica de 96,7%.

Além dos *cDNA microarrays*, estudos que utilizaram a metodologia de *SAGE* (*serial analysis of gene expression*) também permitiram a análise da expressão de

milhares de genes em diferentes tipos de tecidos e tumores, incluindo a glândula tireóide normal e seus tumores (Paws et al., 2000; Cerutti et al., 2004). No entanto, tais estudos geram enormes listas de genes que necessitam de validação e seleção de potenciais marcadores biológicos. Neste sentido, a tecnologia dos *tissue microarrays* (TMAs) é promissora, pois permite a análise de alterações moleculares em centenas de espécimes teciduais, possibilitando a validação de potenciais marcadores diagnósticos, prognósticos e preditivos de resposta ao tratamento. Esta técnica permite, num único experimento, a análise de um grande número de espécimes teciduais que foram previamente fixados em formalina e incluídos em parafina (Kallioniemi et al., 2001). Cortes histológicos seqüenciais de um único bloco de TMA podem ser submetidos a diferentes tipos de estudo, como, por exemplo, a avaliação das características morfológicas das células e tecidos, a análise da expressão de proteínas através da técnica imunoistoquímica e a detecção de alterações cromossômicas através de técnicas de hibridização *in situ* (Kallioniemi et al., 2001).

Alguns estudos investigaram a expressão imunoistoquímica de determinados marcadores em lesões benignas e malignas da tireóide por meio da técnica dos TMAs (Hoos et al., 2002; Wasenius et al., 2003; Nakamura et al., 2006; Weinberger et al., 2007). Utilizando esta técnica, Liu et al. (2008) observaram um aumento da expressão citoplasmática de galectina-3, fibronectina-1, citoqueratina 19, HBME-1 (*Hector Battifora mesothelial-1*) e NIS em carcinomas papilíferos e foliculares da tireóide. Já a expressão de PAARγ e NIS (padrão de membrana) encontrava-se diminuída nos carcinomas em relação às lesões benignas da tireóide. Além disso, o

uso de um painel imunoistoquímico constituído por uma combinação de dois destes três marcadores - galectina-3, fibronectina-1, NIS - revelou uma acurácia diagnóstica de 98% na diferenciação entre o adenoma folicular e os carcinomas (folicular, papilífero clássico e variante folicular do papilífero) de tireóide.

Neste estudo, lesões benignas e malignas da tireóide foram investigadas quanto à expressão imunoistoquímica de proteínas que poderiam estar associadas à angiogênese, como NDRG1, osteonectina, fatores de família do VEGF e seus receptores (VEGF-A, VEGF-C e Flk-1/KDR), HIF-1α e galectina-3.

1.4 NDRG1

N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1) é um membro da família de genes NDRG que codifica uma proteína (NDRG1) de 43 kD, composta por 394 aminoácidos (Kokame et al., 1996). NDRG1 foi localizado no cromossomo humano 8q24 e reconhecido pela primeira vez como um gene cuja mutação estava associada a uma neuropatia desmielinizante denominada síndrome de Charcot-Marie-Tooth tipo 4D (CMT 4D) (Kalaydjieva et al., 1996).

A expressão de NDRG1 nos tecidos é ubíqua: RNA mensageiro de NDRG1 foi detectado numa variedade de tecidos incluindo tratos digestivo e respiratório, fígado, pâncreas, rins, órgãos reprodutores, placenta, músculo esquelético, coração e cérebro (Kokame et al., 1996; Lachat et al., 2002). Por método imunoistoquímico verificou-se que a proteína NDRG1 encontra-se predominantemente expressa em células epiteliais em diversos tecidos, enquanto que a sua expressão em células mesenquimais e endoteliais é negativa (Lachat et al., 2002). Os outros membros da família NDRG – NDRG2, NDRG3, NDRG4 – são homólogos ao gene NDRG1, porém, ao contrário deste, é provável que apresentem funções tecido-específicas, pois são expressos apenas em determinados tipos de tecido: NDRG2 é expresso no tecido muscular e cérebro de adultos; NDRG3 é expresso no cérebro e testículos; NDRG4 é expresso no coração e cérebro (Qu et al., 2002).

A expressão de NDRG1 está associada à parada do crescimento celular e diferenciação celular terminal como, por exemplo, em células epiteliais escamosas

das camadas mais superficiais da epiderme (Lachat et al., 2002). Durante a embriogênese, em fases de proliferação celular, a expressão de NDRG1 é reprimida por N-Myc e c-Myc (Shimono et al., 1999). Por outro lado, ligantes a fatores de transcrição envolvidos na diferenciação celular, tais como a vitamina D e o ácido retinóico, inibem o crescimento e induzem a diferenciação celular e a expressão de NDRG1 (Piquemal et al., 1999). Outros fatores tais como aumento da concentração intracelular de cálcio, diminuição da concentração de glicose, hipóxia, dano ao DNA e neoplasias também estão associados à expressão de NDRG1 (Ellen et al., 2008). Metais pesados (como o níquel, por exemplo) induzem hipóxia celular e a expressão de vários genes responsivos a hipóxia, incluindo NDRG1 (Salnikow et al., 1999; Cangul, 2004).

A indução de NDRG1 por HIF-1α sugere que esta proteína desempenha um papel importante na resposta à hipóxia em neoplasias, nas quais as células tumorais encontram-se, quase sempre, em condições de hipóxia (Ellen et al., 2008). Cangul (2004) observou um aumento da expressão imunoistoquímica da proteína NDRG1 numa variedade de tumores humanos (incluindo carcinomas da mama, rins, pulmões, próstata, bem como no melanoma e no glioblastoma multiforme) em comparação aos tecidos normais correspondentes. Os autores também constataram que a intensidade de expressão de NDRG1 era mais acentuada se comparada à da proteína HIF-1α nos mesmos tipos de tumores. Provavelmente, esta diferença de intensidade de expressão ocorreria pela maior estabilidade da proteína NDRG1 se comparada a HIF-1α (Cangul, 2004). Reis et al (2005) analisaram 213.636 transcritos de tecidos normais e tumorais da cavidade oral, laringe, faringe e tireóide detectados pela técnica de

ORESTES (*open reading frame expressed sequence tags*). De 250 potenciais marcadores selecionados neste estudo, três (ZRF1, RAP140, NDRG1) foram analisados através de RT-PCR quantitativa em amostras de cavidade oral e laringe: os autores detectaram aumento dos níveis de RNA mensageiro de NDRG1 em 50% dos tumores da cavidade oral.

NDRG1 também foi caracterizado como um mediador das funções anti-oncogênicas dependentes de p53. Stein et al. (2004) demonstraram que a expressão de NDRG1 induzida por p53 provocava uma diminuição da proliferação celular em células tumorais de câncer pulmonar metastático. No entanto, a participação de NDRG1 na progressão tumoral e formação de metástases é controversa (Ellen et al., 2008). Alguns estudos sugerem que a superexpressão de NDRG1 reduz o potencial metastático das células tumorais (Guan et al., 2000; Bandyopadhyay et al, 2003), enquanto outros associam o aumento da sua expressão com tumores menos diferenciados ou metastáticos, mais agressivos e de pior prognóstico (Chua et al., 2007; Nishio et al., 2008).

1.5 Osteonectina

O gene SPARC (*secreted protein, acidic, cysteine-rich*, também conhecido como osteonectina ou BM-40) pertence a uma família de genes que codificam proteínas não estruturais da matriz celular que regulam as interações célula-célula e célula-matriz e que se encontram expressas durante a diferenciação e morfogênese dos tecidos, bem como em processos de reparação e remodelação tecidual (Yan, Sage, 1999; Clark, Sage 2008).

Ao contrário de outras proteínas que contribuem para a estabilidade estrutural da matriz extracelular (colágeno, laminina, fibronectina), a osteonectina possui propriedades anti-adesivas determinando diminuição da adesão celular à matriz extracelular e alterações do formato celular (Bradshaw, Sage, 2001). A osteonectina é uma glicoproteína secretada por vários tipos de células e possui a capacidade de interagir com várias moléculas, incluindo fatores de crescimento como VEGF e TGF-β, fibras colágenas, hidroxiapatita e íons de cálcio, cobre e ferro (Yan, Sage, 1999)

A expressão imunoistoquímica de osteonectina encontra-se aumentada em fibroblastos envolvidos em processos de reparação tecidual ou em associação a neoplasias, em células de Sertoli e Leydig dos testículos e em diversas neoplasias malignas (Porter et al., 1995). Em tecidos que se encontram em reparação ou remodelação, a função da osteonectina parece estar relacionada com a regulação da síntese de matriz extracelular e, através de alterações do citoesqueleto e formato

celular, com a diminuição da adesividade celular à matriz, contribuindo com a proliferação e migração celular (Porter et al., 1995; Bradshaw, Sage, 2001). A expressão de osteonectina é dinâmica, ocorrendo, por exemplo, em tecidos que sofrem rápida diferenciação como o sistema hematopoiético ou em tecidos que são submetidos a tensão e remodelação contínuas como o tecido ósseo (Clark, Sage 2008).

Utilizando técnicas e modelos experimentais diferentes, vários estudos na literatura indicam um aumento dos níveis de osteonectina em diversos tipos de tumores humanos; alguns dos quais sugerem uma correlação entre os níveis de expressão de osteonectina e a evolução clínica dos pacientes (Clark, Sage 2008; Podhajcer et al., 2008). Porter et al. (1995) detectaram a expressão imunoistoquímica de osteonectina em várias neoplasias humanas mesenquimais e epiteliais. Em comparação com tecidos normais, o aumento da expressão de osteonectina em tumores malignos sugere que ela se encontra envolvida na transição do fenótipo benigno para o maligno. Robert et al. (2006) mostraram que a superexpressão de osteonectina em melanócitos promovia uma diminuição da expressão de E-caderina, um aumento da expressão de marcadores mesenquimais (vimentina e fibronectina) e a conversão destas células para um fenótipo mesenquimal, de aspecto similar a fibroblastos.

Em tumores, a expressão de osteonectina parece ocorrer particularmente na interface tumor-estroma. Xue et al. (2006) mostraram que a expressão imunoistoquímica de osteonectina em câncer de esôfago ocorria predominantemente

em fibroblastos do estroma peritumoral e somente nas células neoplásicas que se localizavam junto à interface tumor-estroma. Há estudos que observaram correlação entre a expressão imunoistoquímica de osteonectina em fibroblastos peri ou justa-tumorais com uma menor sobrevida (Koukourakis et al., 2003; Infante et al., 2007).

A osteonectina parece contribuir para a angiogênese e a invasão tecidual pelas células neoplásicas. Robert et al. (2006) mostraram que a superexpressão de osteonectina numa linhagem celular de melanoma promovia a expressão de metaloproteinase e aumento da capacidade de invasão "in vitro" pelas células neoplásicas. Koukourakis et al. (2003) observaram acentuada expressão imunoistoquímica de osteonectina em células endoteliais de pequenos vasos imaturos do estroma intratumoral de amostras teciduais de câncer pulmonar. Um estudo revelou que a clivagem da proteína osteonectina pela metaloproteinase 3 levava à formação de polipeptídios com capacidade de influenciar a formação de novas estruturas vasculares e a migração e proliferação de células endoteliais (Sage et al., 2003). No entanto, outro estudo mostrou que a osteonectina poderia inibir a proliferação de células endoteliais ao interagir com o fator de crescimento VEGF (Kuprion et al., 1998).

O microambiente tumoral é dinâmico e está sujeito a diversos tipos de estímulos. Desse modo, fenômenos persistentes de lesão e reparação podem resultar na expressão anormal de osteonectina pelas células tumorais ou por células do estroma. Neste contexto, a osteonectina desempenha um papel importante no processo de desmoplasia, influenciando a ativação e proliferação de células

endoteliais e estromais (fibroblastos, miofibroblastos), a remodelação da matriz extracelular e a infiltração tumoral por células inflamatórias. As células envolvidas no processo desmoplásico podem produzir fatores de crescimento e metaloproteinases e, em diferentes microambientes tumorais, este processo pode inibir ou pode facilitar a invasão e progressão tumoral (Clark, Sage, 2008).

1.6 Fatores da família do VEGF e seus receptores

Vascular endothelial growth factor (VEGF, fator de crescimento endotelial vascular) compreende uma família de genes que codificam proteínas que estimulam a proliferação e diferenciação de células endoteliais de vasos sanguíneos e linfáticos. Em mamíferos, esta família de genes inclui vários membros, como VEGF (ou VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF (*placental growth factor*), que se encontram localizados em diferentes cromossomos. *Splicing* alternativo do gene VEGF-A resulta em várias isoformas com 121, 145, 165, 183, 189 e 206 aminoácidos, sendo $VEGF_{165}$ a isoforma predominante. VEGF-A é um dos principais reguladores da angiogênese relacionada a processos fisiológicos como cicatrização, ovulação e menstruação. Também é um fator importante em condições patológicas associadas com aumento da angiogênese, como, por exemplo, na artrite reumatóide, na retinopatia diabética e em neoplasias. VEGF-B possui duas isoformas – $VEGF\text{-}B_{167}$ e $VEGF\text{-}B_{186}$ – porém sua função ainda é pouco conhecida. PlGF é um homólogo de VEGF-A que se encontra expresso na placenta, coração e pulmões. A perda de PlGF resulta em dificuldade de angiogênese em processos inflamatórios e em tumores. VEGF-C e VEGF-D apresentam um papel importante na linfangiogênese embrionária e do adulto (Ferrara, 2001; Hicklin, Ellis 2005; Kowanetz, Ferrara 2006).

A ação dos fatores de crescimento da família do VEGF é mediada por receptores tirosina-quinase localizados na membrana celular de células endoteliais, conhecidos como Flt-1 (*fms-like tyrosine kinase 1* ou VEGFR-1), Flk-1/KDR (*fetal liver kinase-*

1/kinase-insert domain-receptor ou VEGFR-2) e Flt-4 (*fms-like tyrosine kinase 4* ou VEGFR-3). Enquanto o receptor Flt-1 é expresso somente em leitos vasculares específicos, o receptor Flk-1/KDR encontra-se expresso em quase todas as células endoteliais e é o principal mediador da ação angiogênica do VEGF-A. Em adultos, a expressão do receptor Flt-4 é limitada às células endoteliais de vasos linfáticos e, em alguns tipos de tumores, a ativação do receptor Flt-4 e a superexpressão dos seus ligantes (VEGF-C e VEGF-D) está associada a metástases em linfonodos. Os fatores de crescimento da família do VEGF apresentam diferentes afinidades por um ou mais destes receptores: todas as isoformas de VEGF-A se ligam aos receptores Flt-1 e Flk-1/KDR; VEGF-B e PlGF ao receptor Flt-1; VEGF-C e VEGF-D aos receptores Flk-1/KDR e Flt-4 (Ferrara, 2001; Hicklin, Ellis 2005).

A ligação dos fatores de crescimento da família do VEGF aos seus receptores promove várias ações sobre as células endoteliais e aumento da permeabilidade vascular. VEGF é um importante mitógeno para as células endoteliais e sua ligação ao receptor Flk-1/KDR promove a proliferação celular através da ativação de proteínas da família das MAP quinases (MAPK) como Erk1/2 (*extracellular kinases 1/2*) e JNK/SAPK (*c-Jun kinase/stress-activated protein kinase*). VEGF também induz a expressão de proteínas e enzimas que degradam a matriz extracelular (metaloproteinases, por exemplo), promovendo, assim, a migração e invasão das células endoteliais (Ferrara, 2001; Hicklin, Ellis 2005; Kowanetz, Ferrara 2006).

Diferentes mecanismos regulam a expressão de VEGF e seus receptores, como hipóxia, vários fatores de crescimento e hormônios. Em vários tumores, receptores

de fatores de crescimento como os receptores de fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*, ErbB1 e ErbB2) e de fator de crescimento tipo-insulina (*insulin-like growth factor-I receptor*, IGF-IR) regulam a angiogênese e a expressão de VEGF. Há tumores que apresentam uma correlação entre a superexpressão de prostaglandinas como a ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e o aumento da expressão de VEGF. Vários hormônios como estrógenos, progesterona, gonadotrofinas, TSH (*thyroid stimulating hormone*) e angiotensina II podem regular a expressão de VEGF (Hicklin, Ellis, 2005).

Além das células endoteliais, os receptores Flt-1 e Flk-1/KDR também são expressos em outras células normais (monócitos, macrófagos, células do músculo liso vascular, células progenitoras do sistema hematopoiético) e em células neoplásicas de diversos tipos de tumores. Os dados da literatura são consistentes ao demonstrar que os vários ligantes da família do VEGF induzem a angiogênese tumoral ao se ligar aos seus receptores localizados nas células endoteliais do leito vascular tumoral. A expressão de um ou mais receptores de VEGF pelas células neoplásicas contribui para o crescimento tumoral por mecanismos autócrinos e/ou parácrinos, independentes da ativação endotelial e da angiogênese (Hicklin, Ellis, 2005; Kowanetz, Ferrara, 2006).

Fatores da família do VEGF e seus receptores encontram-se freqüentemente aumentados em vários tipos de tumores humanos e, geralmente, se associam a um comportamento tumoral mais agressivo (Cascinu et al., 2000; O-charoenrat et al., 2001; Nishida et al., 2004; Giatromanolaki et al., 2006; Kamat et al., 2007). Vários

estudos também sugerem que VEGF-C encontra-se envolvido com invasão linfática intra-tumoral e metástases em linfonodos (Yonemura et al., 1999; Akagi et al., 2000; Hashimoto et al., 2001; Nishida et al., 2004). Além de seu papel em doenças não neoplásicas da tireóide como bócio e tireoidite (Wang et al., 1998; Klein et al., 1999), a expressão de VEGF e de seus receptores encontra-se aumentada em neoplasias da tireóide (Soh et al., 1997; Klein et al., 1999; Vieira et al., 2005; de la Torre et al., 2006; Klein, Catargi, 2007). Bunone et al. (1999) também mostrou uma correlação entre o aumento da expressão de VEGF-A e VEGF-C e tumores tireoideanos mais avançados e com maior número de metástases em linfonodos.

1.7 HIF-1α

O fator induzido por hipóxia-1 (*hypoxia-inducible factor-1*, HIF-1) é um fator de transcrição que controla a expressão de um grande número de genes, alguns dos quais relacionados à angiogênese, ao metabolismo da glicose e à sobrevivência celular. HIF-1 é um heterodímero formado por duas subunidades, denominadas HIF-1α e HIF-1β (Semenza, 2003). Além de HIF-1α, existem dois outros fatores, HIF-2α e HIF-3α, que são codificados por genes diferentes. HIF-3α, também conhecido como IPAS (*inhibitory PAS domain protein*) atua como um inibidor da resposta celular a hipóxia. HIF-2α é semelhante ao HIF-1α quanto à sua estrutura, porém, enquanto a expressão de HIF-1α é ubíqua, a de HIF-2α ocorre nos rins, pulmões, coração, endotélio, epitélio gastrintestinal e sistema nervoso central (Hirota, Semenza, 2006; Gordan, Simon, 2007).

Ao contrário da subunidade HIF-1ß, a expressão de HIF-1α é mantida em baixos níveis em condições de normóxia. Nestas condições, ocorre a ativação de hidroxilases dependentes de oxigênio (*prolyl hydroxylase domain-containing proteins,* PHDs) que promovem a hidroxilação de resíduos específicos de prolina situados em HIF-1α. A proteína VHL (*Von Hippel-Lindau protein*) reconhece HIF-1α hidroxilado e recruta a proteína-ubiquitina E3 ligase que inicia, então, o processo de degradação proteassômica de HIF-1α. Por outro lado, a hidroxilação de um resíduo específico de asparagina pela enzima FIH-1 (*factor inhibiting HIF-1*) bloqueia a ligação dos coativadores p300 e CBP à subunidade HIF-1α (Semenza, 2003; Gordan, Simon, 2007).

Em condições de hipóxia, HIF-1α não interage com a proteína VHL e se liga aos coativadores p300 e CBP. HIF-1α é, então, translocado para o núcleo, onde forma um heterodímero com a subunidade HIF-1β e se liga a "elementos responsivos à hipóxia" nos genes alvos. Desse modo, HIF-1α induz a expressão de vários genes, entre os quais aqueles relacionados ao metabolismo da glicose (enzimas glicolíticas e moléculas transportadoras de glicose), à angiogênese e manutenção do tônus vascular (VEGF, endotelina-1), à sobrevivência celular (IGF2, *insulin growth factor-2* e TGF-α) e à motilidade e capacidade de invasão celular (*c-MET*, também conhecido como *hepatocyte growth factor receptor*) (Semenza, 2003; Hirota, Semenza, 2006).

Estudos mostraram que a expressão imunoistoquímica de HIF-1α encontra-se aumentada na maioria dos tumores humanos (Zhong et al., 1999; Talks et al., 2000; Mabjeesh, Amir, 2007). Esse aumento de expressão é o resultado tanto do microambiente tumoral hipóxico, quanto de alterações genéticas que estejam relacionadas com a síntese ou a degradação de HIF-1α. Desse modo, a diminuição da degradação proteassômica de HIF-1α pode ser o resultado de uma maior estabilidade deste fator em condições de hipóxia ou pode ocorrer pela perda, em alguns tumores, de genes supressores tumorais como *p53*. Zhong et al. (1999) observaram uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão imunoistoquímica da oncoproteína p53 e HIF-1α nos vários tipos de carcinomas analisados Em determinados tumores, a estabilidade de HIF-1α pode estar relacionada à perda de função da proteína PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) ou à ativação constitutiva das vias de sinalização mediadas por PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) e MAPK (Semenza, 2003; Mabjeesh, Amir, 2007).

A perda de *VHL* é uma forte evidência de associação entre HIF-1α e câncer. Pacientes com a doença de Von Hippel-Lindau - síndrome familiar na qual ocorre a perda hereditária do gene *VHL* – apresentam um risco muito aumentado para o desenvolvimento de carcinoma renal de células claras. Alem disso, cerca de 80% dos casos esporádicos, não familiares, deste tipo de tumor apresentam alterações genéticas que levam à inativação de *VHL*. Um grande aumento da expressão de HIF-1α é detectado nos carcinomas renais de células claras que apresentam inativação de *VHL* (Wiesener et al, 2001; Maxwell, 2005).

A ativação de HIF-1α secundária a alterações genéticas, independente da tensão de O_2, pode ser comprovada por método imunoistoquímico. Nestes tumores, a expressão imunoistoquímica de HIF-1α ocorre de forma homogênea em todas as células tumorais, mesmo aquelas situadas em áreas bem vascularizadas e que não se encontram em condições de hipóxia (Wiesener et al., 2001; Semenza, 2003; Maxwell, 2005). Nos tumores em que a ativação de HIF-1α é induzida por hipóxia, o padrão de expressão imunoistoquímica deste fator é heterogêneo e ocorre geralmente em células tumorais viáveis situadas em regiões próximas a áreas de necrose tumoral, com baixa tensão de O_2 (Zhong et al., 1999; Talks et al., 2000; Zagzag et al., 2000; Aebersold et al., 2001; Kuwai et al., 2003; Bos et al., 2003).

De um modo geral, a superexpressão de HIF-1α está relacionada a um comportamento clínico mais agressivo em diversos tipos de tumores. Estudos mostram que há uma correlação entre uma maior taxa de mortalidade, maior probabilidade de doença metastática e de falha ao tratamento em pacientes que

apresentam tumores com expressão aumentada de HIF-1α (Birner et al., 2000; Aebersold et al., 2001; Kuwai et al., 2003; Dales et al, 2005; Nakanishi et al., 2005). O aumento da angiogênese tumoral como conseqüência da ativação de HIF-1α poderia explicar o comportamento mais agressivo de certos tumores e alguns estudos observaram que o aumento da expressão de VEGF se correlaciona com a superexpressão de HIF-1α em diferentes tipos de tumores (Talks et al., 2000; Wiesener et al., 2001; Kuwai et al., 2003; Bos et al., 2003; Mabjeesh, Amir, 2007).

1.8 Galectina-3

Lectinas são proteínas que reconhecem vários tipos de carboidratos ligados a proteínas ou lipídios localizados na membrana celular ou na matriz extracelular. As galectinas compreendem uma família de lectinas caracterizadas por sua habilidade em se ligar a β-galactosídeos e pela presença de um domínio conservado de ligação a carboidratos (*CRD*, *carbohydrate-recognition-binding domain*) de cerca de 130 aminoácidos (Barondes et al., 1994). Em mamíferos, a família das galectinas contém 15 membros que são classificados de acordo com o número de domínios de ligação a carboidratos: as galectinas-1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15 contêm apenas um destes domínios; as galectinas-4, 6, 8, 9 e 12 contêm dois domínios. Já a galectina-3 é a única que contém uma seqüência de aminoácidos rica em prolina e glicina conectada ao domínio de ligação a carboidratos (Liu, Rabinovich, 2005; Dumic et al., 2006).

As galectinas são encontradas na membrana celular ou no citoplasma e núcleo das células. Algumas galectinas são secretadas pelas células e podem ser encontradas no espaço extracelular. A galectina-3 é uma proteína de 29 a 35 kD cuja distribuição é ubíqua. Ela é expressa numa grande variedade de células epiteliais em diversos órgãos, incluindo intestino delgado, cólon, mama, rins, próstata, pulmões e pâncreas. A galectina-3 também se encontra expressa em várias células envolvidas na resposta imune: monócitos e macrófagos; neutrófilos; eosinófilos; mastócitos e basófilos; células dendríticas e células de Langerhans (Perillo et al., 1998; Dumic et al., 2006).

De acordo com sua localização extra ou intracelular, a galectina-3 exerce diversas funções biológicas tais como adesão celular, regulação da proliferação celular, apoptose e resposta inflamatória (Perillo et al., 1998; Dumic et al., 2006). A galectina-3 promove a adesão das células a vários componentes glicoconjugados da matriz extracelular (laminina, fibronectina, elastina, colágeno tipo IV), bem como a interação célula-célula ao se ligar a determinados tipos de integrinas. A galectina-3 localizada no espaço extracelular também atua como um fator quimiotático ao promover a migração de monócitos e macrófagos (Dumic et al., 2006).

As galectinas estão envolvidas em vários mecanismos relacionados à proliferação celular e tumorigênese. Estudos mostraram que as galectinas-1 e 3 interagem com as oncoproteínas da família RAS, levando a ativação de vias de sinalização intracelular que resultam na expressão de genes que promovem a proliferação e transformação celular. A regulação da apoptose e da síntese de algumas proteínas regulatórias do ciclo celular ($p27^{KIP1}$, $p21^{WAF1/CIP1}$, ciclinas A, D e E) são outros mecanismos pelos quais as galectinas estão relacionadas à tumorigênese (Liu, Rabinovich, 2005). Quando localizada no núcleo celular, a galectina-3 interage com a proteína β-catenina induzindo a expressão de proteínas envolvidas na promoção da proliferação celular como c-Myc e ciclina D1 (Dumic et al., 2006; Nakahara, Raz, 2007). Estudos mostram que a sublocalização nuclear de galectina-3, demonstrada por imunoistoquímica, é variável de acordo com o tipo de tecido ou órgão. Nos carcinomas de próstata e de língua foram observados uma diminuição da expressão nuclear de galectina-3 (van den Brûle et al., 2000; Honjo et al., 2000); já no câncer pulmonar, a expressão nuclear de galectina-3 esteve associada com um

pior prognóstico (Mathieu et al., 2005); e, em neoplasias malignas da tireóide, a expressão imunoistoquímica de galectina-3 foi observada de modo equivalente tanto no citoplasma quanto no núcleo das células neoplásicas (Weinberger et al., 2007).

As galectinas podem desempenhar um papel importante na formação de metástases tumorais. A maior ou menor interação célula-célula e adesão das células neoplásicas à matriz extracelular é modulada pela associação dos diferentes membros da família das galectinas com determinados tipos de integrinas (galectina-1 e integrina α7β1, galectina-3 e integrina α1β1) e com outros tipos de glicoproteínas da superfície celular como, por exemplo, a mucina MUC2 do câncer de cólon e o antígeno carcinoembriônico (CEA, *carcinoembryonic antigen*). Galectinas secretadas pelo tumor também podem promover o destacamento das células neoplásicas da matriz extracelular, a agregação das células neoplásicas entre si e a adesão destes agregados às células endoteliais, facilitando a disseminação da neoplasia a sítios distantes do tumor primário (Liu, Rabinovich, 2005; Dumic et al., 2006). A galectina-3 também possui a capacidade de influenciar a motilidade das células neoplásicas e a promoção da angiogênese tumoral através da migração de células endoteliais (Liu, Rabinovich, 2005). No entanto, o significado clínico da expressão de galectina-3 na progressão tumoral e formação de metástases é contraditório. Há estudos que mostram que tumores mais avançados e de pior prognóstico estão associados com aumento da expressão de galectina-3 (Honjo et al., 2000; Mathieu et al., 2005; Endo et al., 2005), enquanto em outros estudos, é a perda de expressão desta proteína que se relaciona com tumores mais agressivos, metastáticos e de pior prognóstico (Shimamura et al., 2002; Piantelli et al., 2002; Okada et al., 2006).

Em tireóide, a galectina-3 tem sido investigada como um marcador biológico para a distinção de lesões benignas e malignas da tireóide, tanto em material citológico obtido por punção aspirativa por agulha fina, quanto em cortes histológicos de produtos de tireoidectomia. Nestes espécimes, a galectina-3 tem sido estudada principalmente pelo método imunoistoquímico, geralmente em associação a outros potenciais marcadores. Os estudos mostram que a expressão imunoistoquímica de galectina-3 costuma ser forte e difusa em neoplasias malignas da tireóide, sobretudo no carcinoma papilífero (Orlandi et al., 1998; Inohara et al., 1999; Kawachi et al., 2000; Bartolazzi et al., 2001). No entanto, a expressão imunoistoquímica de galectina-3 também tem sido observada em alguns casos de lesões benignas da tireóide, incluindo adenomas foliculares (Orlandi et al., 1998; Bartolazzi et al., 2001; Martins et al., 2002), hiperplasias (Martins et al., 2002) e alguns raros casos de tireoidite de Hashimoto (Bartolazzi et al., 2001). Após uma revisão sistemática de vários estudos sobre o uso de galectina-3 como um teste diagnóstico em nódulos da tireóide, Sanabria et al. (2007) concluíram que a galectina-3 não é um marcador absoluto para a identificação de malignidade em nódulos de tireóide com diagnóstico citológico indeterminado (diagnóstico de "padrão folicular"). Num estudo prospectivo e multicêntrico, Bartolazzi et al. (2008) avaliaram a detecção imunoistoquímica de galectina-3 em pacientes com nódulos de tireóide com diagnóstico citológico indeterminado (lesão folicular): dos 432 pacientes selecionados para tratamento cirúrgico (tireoidectomia), 88% foram corretamente classificados pelo uso pré-operatório da galectina-3. Neste estudo, o teste diagnóstico com galectina-3 revelou uma sensibilidade de 78% e uma especificidade de 93%, com valores preditivos positivo e negativo de 82% e 91%,

respectivamente. Os autores concluíram que a galectina-3 poderia ser empregada como um método diagnóstico complementar aos pacientes com nódulos de tireóide com diagnóstico citológico indeterminado.

2. OBJETIVOS

Estudar a expressão imunoistoquímica das proteínas NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α e galectina-3 em lesões benignas e malignas da tireóide, por *tissue microarray.*

Avaliar a eficácia diagnóstica destas proteínas como potenciais marcadores biológicos para o diagnóstico de lesões malignas da tireóide.

Analisar a associação da expressão destas proteínas nos carcinomas de tireóide (carcinoma papilífero clássico, carcinoma papilífero variante folicular e carcinoma folicular) com algumas variáveis demográficas e clínico-patológicas, como: idade; estadiamento TNM; índice prognóstico de *AMES*; multicentricidade tumoral; e extensão tumoral extra-tireoideana.

Analisar a sobrevida em 5 anos (60 meses) dos pacientes com carcinoma de tireóide (carcinoma papilífero clássico, carcinoma papilífero variante folicular e carcinoma folicular) segundo variáveis demográficas e clínico-patológicas (idade, tamanho do tumor, estadiamento TNM, índice prognóstico de *AMES*, multicentricidade e extensão tumoral extra-tireoideana) e variáveis biomoleculares (isto é, a expressão imunoistoquímica de NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α e galectina-3).

Analisar a associação hierárquica entre os diferentes grupos de variáveis (variáveis demográficas, variáveis anátomo-patológicas, variáveis relacionadas ao estadiamento clínico e variáveis biomoleculares) e o desfecho clínico (progressão, recorrência ou óbito) nos pacientes com carcinoma de tireóide (carcinoma papilífero clássico, carcinoma papilífero variante folicular e carcinoma folicular), segundo o modelo teórico hierarquizado.

3. MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram selecionados os blocos de parafina dos espécimes de tireóide que se encontravam arquivados na Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (no período de 2000 a 2006) e no Departamento de Patologia do Hospital A. C. Camargo (no período de 1984 a 2001). Após revisão dos laudos histopatológicos, foram selecionados apenas os casos com os seguintes diagnósticos: bócio adenomatoso (ou bócio colóide); adenoma folicular; carcinoma folicular; carcinoma papilífero (padrão clássico e variante folicular). Quando presentes, também foram selecionados os blocos de parafinas das metástases correspondentes a alguns dos casos de carcinoma papilífero ou folicular da tireóide. Casos com diagnóstico histológico de carcinoma medular, carcinoma pouco diferenciado e carcinoma indiferenciado (anaplásico) da tireóide não foram incluídos neste estudo. Do Departamento de Patologia do Hospital A. C. Camargo foram escolhidos apenas os casos com diagnóstico histopatológico de adenoma e carcinoma folicular da tireóide. Por fim, os blocos selecionados corresponderam a lesões benignas e malignas da tireóide de 225 pacientes, sendo 41 (18,2%) do sexo masculino e 184 (81,8%) do sexo feminino. A idade dos pacientes variou de 15 a 88 anos, com média etária de 48,4 anos. Os dados demográficos para cada tipo histológico encontram-se representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados demográficos dos 225 pacientes incluídos neste estudo

Diagnóstico histológico	N	%	F	%	M	%	Idade[1]
Bócio	62	27,6	54	87,1	8	12,9	50,3
Adenoma folicular	52	23,1	44	84,6	8	15,4	46,0
Carcinoma papilífero clássico	41	18,2	32	78,0	9	22,0	44,7
Carcinoma papilífero variante folicular	31	13,8	25	80,6	6	19,4	46,2
Carcinoma folicular	36	16,0	27	75,0	9	25,0	55,8
Metástases[2]	3	1,3	2	66,7	1	33,3	38,7
TOTAL	225	100,0	184	81,8	41	18,2	48,4

NOTA: F, sexo feminino; M, sexo masculino.

[1] Média etária em anos.

[2] Três casos de metástase de carcinoma papilífero clássico para os quais estavam disponíveis apenas os espécimes cirúrgicos de esvaziamento cervical.

Foi realizada a revisão dos prontuários médicos dos 225 pacientes deste estudo que se encontravam arquivados nos serviços de arquivos médicos do Hospital das Clínicas e do Hospital A. C. Camargo. Para os pacientes com carcinoma da tireóide (carcinomas papilífero clássico e variante folicular e carcinoma folicular) foram coletados os seguintes dados: data da cirurgia; data da última consulta; data do aparecimento da primeira recorrência tumoral (demonstrada por exames de imagem ou por técnicas de biópsia que resultaram em diagnóstico histológico ou citológico); e dados sobre o tipo de tratamento realizado.

O tempo médio de seguimento clínico e de recorrência tumoral para os pacientes com carcinoma da tireóide foi de 55,4 meses (variando de 1 a 175 meses) e 23,5 meses (variando de 2 a 48 meses), respectivamente. Não foi possível obter dados de seguimento clínico para 8 pacientes com carcinoma da tireóide (6 pacientes com

carcinoma folicular, um paciente com carcinoma papilífero clássico e um paciente com carcinoma papilífero variante folicular). O *status* clínico para os pacientes deste estudo encontra-se representado na Tabela 2.

Tabela 2 – Seguimento clínico (*status* clínico) dos pacientes com carcinoma de tireóide

Tipo histológico	VSD	VCD	OO	OD	TOTAL[1]
Carcinoma papilífero clássico	38 (95,0%)	2 (5,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	40 (100,0%)
Carcinoma papilífero variante folicular	30 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	30 (100,0%)
Carcinoma folicular	20 (66,7%)	2 (6,7%)	1 (3,3%)	7 (23,3%)	30 (100,0%)

NOTA: VSD, vivo sem doença; VCD, vivo com doença; OO, óbito por outra causa; OD, óbito pela doença.

[1] Os dados de seguimento clínico não estavam disponíveis para 8 pacientes.

A partir dos prontuários também foram obtidos dados quanto ao estadiamento TNM. Este se baseia no tamanho do tumor primário (T), presença ou ausência de metástases para linfonodos regionais (N) e presença ou ausência de metástases para linfonodos à distância (M). Baseado nestas 3 categorias, o tumor é classificado em estádios que variam de I a IV, sendo o estádio IV o mais avançado. Outros parâmetros também são importantes nesta classificação como o tipo histológico do tumor (carcinoma papilífero, carcinoma folicular, carcinoma medular e carcinoma indiferenciado) e a idade do paciente (maior ou igual a 45 anos de idade ou menor de 45 anos de idade) (Sobin, Wittekind, 2002). Neste estudo também foi utilizado o estadiamento baseado no índice prognóstico de *AMES* (***a****ge of the patient,* ***m****etastases*

of the tumor, ***e****xtent of primary tumor,* ***s****ize of the tumor*), que se aplica aos carcinomas papilífero e folicular da tireóide (tabela 5). Baseado em critérios como idade, presença de metástases, extensão e tamanho do tumor primário, os pacientes são classificados em baixo risco (com taxa de mortalidade estimada de 1,8%) e alto risco (com taxa de mortalidade estimada de 46%) (Cady, Rossi, 1988; Sanders, Cady, 1998).

Além dos 225 blocos de parafina previamente selecionados, foram separados mais 40 blocos adicionais: 9 casos de lesões benignas e 9 de lesões malignas da tireóide nos quais estavam representadas áreas de tecido tireoideano normal; blocos de lesões malignas da tireóide correspondentes a metástases em linfonodos (20 casos) e em tecido ósseo (1 caso); e ambos os blocos de parafina de um caso que apresentava duas lesões distintas (um carcinoma papilífero variante folicular e um adenoma folicular) (Tabela 3).

Tabela 3 – Relação dos blocos adicionais selecionados para este estudo

Blocos adicionais	Bócio	AF	CAP	CAP-VF	CAF	TOTAL
Tireóide normal	7	2	3	5	1	18
Metástases			14	5	2*	21
Adenoma folicular				1		1
Total	7	2	17	11	3	40

NOTA: AF, adenoma folicular; CAP, carcinoma papilífero clássico; CAP-VF, carcinoma papilífero variante folicular; CAF, carcinoma folicular. *Uma metástase de carcinoma folicular em linfonodo cervical e uma metástase de carcinoma folicular em tecido ósseo (coluna vertebral).

A partir dos blocos selecionados, foram preparadas lâminas coradas pela hematoxilina-eosina que foram examinadas por um microscópio óptico binocular (Nikon®, modelo Eclipse E100) para a seleção de áreas representativas da lesão. As áreas de interesse presentes nas lâminas foram marcadas com tinta nanquim e comparadas às áreas coincidentes presentes nos blocos de parafina correspondentes, que também foram marcados com tinta nanquim. Os blocos de parafina selecionados do Departamento de Patologia do Hospital A. C. Camargo já apresentavam a marcação correspondente às áreas de interesse. Desse modo, a partir dos blocos selecionados (blocos doadores) foi construído um bloco de parafina receptor pela técnica de *tissue microarray* (TMA) no Departamento de Patologia do Hospital A. C. Camargo.

3.2 *Tissue microarray*:

Utilizando o dispositivo técnico chamado "*tissue microarrayer*" (Beecher Instruments, Silver Springs, EUA), as áreas de interesse de cada um dos blocos doadores foram puncionadas com uma agulha de 1,0 mm de diâmetro e os fragmentos cilíndricos obtidos foram transferidos de forma ordenada para o bloco de parafina receptor. Um mapa para identificação detalhada de cada fragmento cilíndrico foi construído em planilha Excel®, permitindo a localização exata de cada caso. O bloco receptor foi construído com 265 casos de tireóide, isto é, 265 fragmentos teciduais representados por tireóide normal, bócio, adenoma folicular, carcinoma papilífero (padrão clássico e variante folicular), carcinoma folicular e metástases de carcinoma papilífero e folicular da tireóide (Tabela 4).

Tabela 4 – Diagnósticos histológicos dos fragmentos presentes no TMA de tireóide

Diagnóstico	N	%
Tireóide normal	18	6,8
Bócio	62	23,4
Adenoma folicular	53	20,0
Carcinoma papilífero clássico	41	15,5
Carcinoma papilífero variante folicular	31	11,7
Carcinoma folicular	36	13,6
Metástase de carcinoma de tireóide[1]	24	9,1
Total	265	100,0

[1] 22 metástases de carcinoma papilífero (17 do padrão clássico e 5 da variante folicular) e 2 metástases de carcinoma folicular.

O bloco receptor foi, então, submetido a cortes histológicos seqüenciais de 4 μm de espessura que foram depositados em lâminas de vidro. Todos os cortes foram

realizados em uma única sessão, obtendo-se 120 lâminas. Estas foram embebidas numa camada de parafina para evitar a oxidação e armazenadas num freezer a -20ºC. O controle do número de casos avaliáveis foi realizado pela coloração com hematoxilina-eosina de 4 lâminas não seqüenciais, em diferentes níveis (lâminas de número 3, 33, 63 e 93). Estas lâminas foram analisadas em microscópio óptico binocular (Nikon®, modelo Eclipse E100). O bloco receptor foi considerado esgotado quando mais de 25% das amostras não estavam presentes nos cortes.

3.3 Técnica imunoistoquímica:

Do total de 120 lâminas, foram selecionadas 28 em níveis diferentes, não seqüenciais, para cada um dos marcadores utilizados, ou seja, 4 lâminas para NDRG1, 4 lâminas para osteonectina, 4 lâminas para VEGF-A, 4 lâminas para VEGF-C, 4 lâminas para Flk-1/KDR, 4 lâminas para HIF-1α e 4 lâminas para galectina-3. Os cortes histológicos foram desparafinizados e submetidos a técnica de imunoistoquímica com anticorpos específicos para as proteínas NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α e galectina-3 (Tabela 5).

Tabela 5 - Lista de anticorpos utilizados

Anticorpo	Clone	Fonte	Título	Fabricante	Código
NDRG1 (N-19)	policlonal	bode	1:1000	Santa Cruz[1]	sc-19464
Osteonectina	policlonal	coelho	1:1000	Chemicon[2]	AB1858
VEGF (A-20)	policlonal	coelho	1:800	Santa Cruz	sc-152
VEGF-C (C-20)	policlonal	bode	1:100	Santa Cruz	sc-1881
Flk-1/KDR (A-3)	monoclonal	camundongo	1:1000	Santa Cruz	sc-6251
HIF-1α (H-206)[3]	policlonal	coelho	1:50	Santa Cruz	sc-10790
Galectina-3 (M3/38)[4]	monoclonal	rato	1:5	-	-

[1] Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, EUA).

[2] Chemicon International, Inc. (Temecula, CA, EUA).

[3] Anticorpo gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Roger Chammas.

[4] Anticorpo produzido e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Roger Chammas.

Conforme o protocolo descrito a seguir, as reações imunoistoquímicas foram realizadas utilizando-se diferentes métodos como estreptavidina-biotina (Hsu et al., 1981), polímero de duas etapas (Shi et al., 1999) e polímero de uma etapa (Petrosyan et al., 2002).

3.3.1 Desparafinização das lâminas

Antes do início das reações imunoistoquímicas, as lâminas foram deixadas por 24 horas em estufa a 60ºC e, a seguir, submetidas a desparafinização por meio de soluções de xilol e etanol:

1. Xilol a 60ºC por 20 minutos;
2. Xilol em temperatura ambiente por 20 minutos;
3. Etanol 100% por 30 segundos;
4. Etanol 95% por 30 segundos;
5. Etanol 70% por 30 segundos.

As lâminas foram, então, lavadas em água corrente e destilada e submetidas à recuperação antigênica em panela de pressão.

3.3.2 Recuperação antigênica

Foi preparada uma solução tampão citrato 10 mM pH 6,0 que foi fervida em panela de pressão destampada (marca Eterna®, Nigro). As lâminas foram mergulhadas nesta solução em ebulição e a panela de pressão foi lacrada, com a válvula de segurança aberta. Após a saída de vapor saturado, a válvula de segurança foi abaixada até que houvesse a pressurização total. Após 4 minutos, a panela fechada foi colocada sob água corrente até que ocorresse a despressurização total. A panela foi destampada e as lâminas retiradas e lavadas em água corrente e destilada.

3.3.3 Bloqueio da peroxidase endógena

Para o bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram banhadas com peróxido de hidrogênio a 3%, com 4 trocas de 5 minutos cada e, depois, lavadas em água corrente e destilada. A seguir, as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfatos (PBS, *phosphate buffered saline*) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos.

As lâminas foram, então, incubadas com o anticorpo primário diluído em título previamente estabelecido, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) a 1% (Sigma-Aldrich, A9647, EUA) e azida sódica 0,1%, por 18 horas a 4ºC em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram lavadas em solução tampão PBS por 3 vezes de 3 minutos cada.

Antes da incubação da lâminas com o anticorpo primário anti-VEGF-C foi realizado bloqueio da biotina endógena pelo kit *Biotin Blocking System* (DAKO, X0590, Carpinteria, CA, EUA), conforme protocolo sugerido pelo fabricante. As lâminas foram incubadas por 10 minutos com avidina e lavadas e incubadas por 10 minutas com biotina.

3.3.4 Sistemas de amplificação

Os sistemas de amplificação utilizados variaram de acordo com o anticorpo primário utilizado, conforme descrição a seguir:

3.3.4.1. NDRG1

As lâminas foram incubadas por 30 minutas a 37ºC com o anticorpo secundário biotinilado (*biotinylated link universal*) do kit LSAB+ System – HRP (DAKO, K0690, Carpinteria, CA, EUA). A seguir, as lâminas foram lavadas com a solução tampão PBS por 3 vezes de 3 minutos cada. As lâminas foram, então, incubadas com estreptavidina-biotina marcada com HRP (DAKO, K0492, Glostrup, Dinamarca) por 30 minutos a 37ºC e a seguir lavadas novamente com a solução tampão PBS por 3 vezes de 3 minutos cada.

3.3.4.2. VEGF-C

As lâminas foram incubadas por 30 minutas a 37ºC com o anticorpo secundário biotinilado, IgG de bode feito em coelho (Vector Laboratories, Inc., BA5000, Burlingame, CA, EUA), na diluição 1:500 em solução tampão PBS. A seguir, as lâminas foram lavadas com a solução tampão PBS por 3 vezes de 3 minutos cada. As lâminas foram, então, incubadas com estreptavidina-biotina marcada com HRP (DAKO, K0492, Glostrup, Dinamarca) por 30 minutos a 37ºC e a seguir lavadas novamente com a solução tampão PBS por 3 vezes de 3 minutos cada.

3.3.4.3 Osteonectina, VEGF, Flk-1 e HIF-1α

As lâminas foram incubadas por 30 minutos a 37ºC com *Post Primary Block* (*NovoLink Max Polymer*, RE7260-k, Reino Unido) e, em seguida, lavadas com a solução tampão PBS por 3 vezes de 3 minutos cada. Foram, então, incubadas com o *NovoLink Polymer* por 30 minutos a 37ºC e lavadas em tampão PBS por 3 vezes de 3 minutos cada.

3.3.4.4 Galectina-3

As lâminas foram incubadas por 30 minutos a 37ºC com *SuperPicture Poly HRP conjugate* (Zymed, 87-8963, Carlsbad, EUA) e, em seguida, lavadas com a solução tampão PBS por 3 vezes de 3 minutos cada.

3.3.5 Revelação com cromógeno e contracoloração

As lâminas foram incubadas em solução substrato cromogênico, contendo 60 mg de 3,3´ tetra-hidrocloreto de diaminobenzidina (DAB) (Sigma, D5637, EUA), 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 1 mL de peróxido de hidrogênio a 6% e 100 mL de solução tampão PBS, a 37ºC, por 5 minutos e ao abrigo da luz. Laminas controles foram observadas em microscópio óptico e o desenvolvimento de um precipitado castanho dourado nestas lâminas indicou o produto final da reação. A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por 3 minutos, contracoradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto e lavadas novamente em água corrente e destilada.

3.3.6. Desidratação e montagem das lâminas

As lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e em xilol:

1. Etanol 85% por 30 segundos;
2. Etanol 95% por 30 segundos;
3. Etanol 100%, 2 vezes, 30 segundos cada;
4. Xilol 4 vezes, 30 segundos cada.

Procedeu-se, então, a montagem das lâminas com Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha) e com lamínulas.

3.4 Avaliação imunoistoquímica:

Para cada uma das lâminas de cada marcador foi realizada uma avaliação semiquantitativa da expressão imunoistoquímica, analisando-se a intensidade de coloração e a porcentagem de células positivas. Essa avaliação foi feita em microscópio óptico binocular (marca Nikon®, modelo Eclipse E100,) sendo considerados apenas os casos em que mais de 50% do tecido original permaneceu preservado nas lâminas após as reações imunoistoquímicas. A semiquantificação para cada um dos marcadores foi realizada apenas nas células epiteliais (células foliculares) das diversas lesões de tireóide.

Foram utilizados controles negativos e positivos em todas as reações. Os tecidos utilizados como controles positivos para cada um dos marcadores foram: para NDRG1, uma amostra de carcinoma folicular de tireóide; para osteonectina, uma amostra de osteossarcoma; para VEGF-A e VEGF-C, uma amostra de carcinoma papilífero da tireóide; para Flk-1/KDR, uma amostra de tecido colônico; para HIF-1α, uma amostra de músculo cardíaco; para galectina-3, uma amostra de carcinoma papilífero de tireóide. Os controles negativos foram realizados pela omissão dos anticorpos primários.

Para a avaliação semiquantitativa da expressão imunoistoquímica de NDRG1 foram utilizados os critérios adotados por Wang et al. (2004), conforme descrição a seguir. A intensidade de coloração foi classificada como: 0 (ausência de coloração); 1 (coloração leve: coloração citoplasmática amarelo-claro); 2 (coloração moderada:

coloração citoplasmática amarela); 3 (coloração intensa: coloração citoplasmática castanha). O número de células positivas foi classificado como: 0 (menor ou igual a 5%); 1 (de 6 a 25%); 2 (de 26 a 50%); 3 (de 51 a 75%); 4 (maior do que 75%). Para cada caso foi obtido um score multiplicando-se o número de células positivas pela intensidade de coloração: negativo (0); positivo (+) (1, 2, 3 ou 4) positivo (++) (6 ou 8); positivo (+++) (9 ou 12). O score final foi a média de cada caso nas 4 lâminas analisadas e classificado da seguinte forma: negativo (score médio ≤ 4) e positivo (score médio > 4).

De forma similar a NDRG1, foram utilizados os critérios descritos por Yiu et al. (2001) para a avaliação semiquantitativa da expressão imunoistoquímica de osteonectina, conforme descrição a seguir. A intensidade de coloração foi classificada como: 0 (ausência de coloração); 1 (coloração citoplasmática leve); 2 (coloração citoplasmática moderada); 3 (coloração citoplasmática intensa). O número de células positivas foi classificado como: 0 (ausência de células positivas); 1 (de 1 a 25%); 2 (de 26 a 50%); 3 (de 51 a 75%); 4 (maior do que 75%). Para cada caso foi obtido um score multiplicando-se o número de células positivas pela intensidade de coloração: negativo (0); positivo (+) (1, 2, 3 ou 4); positivo (++) (6 ou 8); positivo (+++) (9 ou 12). O score final foi a média de cada caso nas 4 lâminas e classificado da seguinte forma: negativo (score médio ≤ 4) e positivo (score médio > 4).

Para a avaliação semiquantitativa da expressão imunoistoquímica de VEGF-A e VEGF-C foram utilizados os critérios descritos por Cascinu et al. (2000) e Zlobec et

al. (2006), conforme descrição a seguir. A intensidade de coloração foi classificada como: 0 (ausência de coloração); 1 (coloração citoplasmática e/ou de membrana leve: coloração amarela); 2 (coloração citoplasmática e/ou de membrana moderada: coloração castanho-claro); 3 (coloração citoplasmática e/ou de membrana intensa: coloração castanha). O número de células positivas foi classificado como: 0 (ausência de células positivas); 1 (menor ou igual a 10%); 2 (maior do que 10%). Para cada caso foi obtido um score multiplicando-se o número de células positivas pela intensidade de coloração e o caso foi classificado como negativo (score de 0 a 3) ou positivo (score 4 ou 6). O score final foi a média de cada caso nas 4 lâminas utilizadas e classificado da seguinte forma: negativo (score médio < 4); positivo (score médio ≥ 4).

Para a avaliação semiquantitativa de Flk-1/KDR foram utilizados os critérios estabelecidos por Straume e Akslen (2001), conforme descrição a seguir. A intensidade de coloração foi classificada como: 0 (ausência de coloração); 1 (coloração citoplasmática leve: coloração amarela); 2 (coloração citoplasmática moderada: coloração castanho-claro); 3 (coloração citoplasmática intensa: coloração castanha). O número de células positivas foi classificado como: 0 (ausência de células positivas); 1 (menor ou igual a 10%); 2 (maior do que 10% a 50%); 3 (maior do que 50%). Para cada caso foi obtido um score multiplicando-se o número de células positivas pela intensidade de coloração e o caso foi classificado como negativo (score de 0 a 4) ou positivo (score 6 ou 9). O score final foi a média de cada caso nas 4 lâminas utilizadas e classificado da seguinte forma: negativo (score médio ≤ 4); positivo (score médio > 4).

Para a avaliação semiquantitativa de HIF-1α foram utilizados os critérios estabelecidos por Zhong et al. (1999), conforme descrição a seguir. O número de células positivas, isto é, com coloração nuclear e/ou citoplasmática para HIF-1α, foi classificado como: 0 (ausência de coloração nuclear e/ou citoplasmática); 1 (coloração nuclear menor do que 1% e/ou ausência de coloração citoplasmática); 2 (coloração nuclear de 1 a 10% e/ou coloração citoplasmática leve); 3 (coloração nuclear de 10 a 50% e/ou coloração citoplasmática moderada); 4 (coloração nuclear maior ou igual a 50% e/ou coloração citoplasmática forte). Casos com score 0, 1 ou 2 foram considerados negativos e casos com score 3 ou 4 foram considerados positivos. Neste estudo, o score final foi a média de cada caso nas 4 lâminas utilizadas e classificado da seguinte forma: negativo (score médio < 3); positivo (score médio ≥ 3).

Para a avaliação semiquantitativa da expressão imunoistoquímica de galectina-3 foram utilizados os critérios de Nakamura et al. (2006), conforme descrição a seguir. Avaliou-se o número de células com expressão citoplasmática de galectina-3. A intensidade de coloração foi classificada como: 0 (ausência de coloração); 1 (coloração citoplasmática leve: coloração castanho-claro); 2 (coloração citoplasmática moderada: coloração castanho); 3 (coloração citoplasmática forte: coloração castanho-escuro). O número de células positivas foi classificado como: 0 (menos de 10% de células positivas); 1 (10% ou mais de células positivas). Para cada caso foi obtido um score multiplicando-se a intensidade de coloração citoplasmática pelo número de células positivas:

negativo (0); positivo (1, 2 ou 3). Neste estudo, o score final foi a média de cada caso nas 4 lâminas utilizadas e classificado da seguinte forma: negativo (score médio < 1); positivo (score médio ≥ 1).

3.5 Análise estatística:

Os cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia foram realizados com a finalidade de se avaliar a acuidade dos marcadores biomoleculares no diagnóstico diferencial entre lesões tireoideanas benignas (bócio e adenoma folicular) e malignas (carcinoma papilífero clássico, carcinoma papilífero variante folicular, carcinoma folicular e metástases de carcinoma da tireóide).

As associações entre a expressão dos marcadores biomoleculares estudados e as variáveis demográficas e clínico-patológicas foram calculadas pelo teste do Qui-quadrado ou pelo teste exato de Fischer (1922), dependendo dos valores esperados nas tabelas de contingência.

As probabilidades de sobrevida livre de evento (óbito, recorrência ou progressão da doença) em 5 anos (60 meses) foram estimadas pelo método de Kaplan e Meier (1958) e a comparação entre as curvas foi realizada pelo teste de log rank.

Para a análise multivariada dos fatores prognósticos utilizou-se o modelo de riscos proporcionais de Cox (1972). O modelo multivariado foi construído hierarquicamente baseando-se nos conceitos propostos por Victora et al. (1997). Em um modelo hierarquizado, as variáveis não são introduzidas seqüencialmente pelo valor do nível descritivo obtido na análise univariada, mas sim a partir de blocos (ou níveis) hierarquicamente relacionados. O modelo teórico proposto neste trabalho está

representado no Gráfico 1. Para explicar os desfechos (óbito, recorrência e progressão de doença) as variáveis foram divididas em quatro blocos, a saber: variáveis sociodemográficas (bloco 1), variáveis biomoleculares (bloco 2), variáveis anatomo-patológicas micro e macroscópicas (bloco 3) e variáveis relacionadas ao estadiamento e aos efeitos clínicos (bloco 4). O marco teórico pressupôs que as variáveis sociodemográficas (como a idade e gênero) poderiam ser responsáveis por diferenças nas expressões biomoleculares dos tumores (variáveis biomoleculares) e por diferentes formas de tratamento, já que pacientes mais idosos costumam ser tratados de forma mais conservadora e menos radical do ponto de vista oncológico. O perfil biomolecular da neoplasia seria traduzido pelas variáveis anatomo-patológicas micro e macroscópicas. O comportamento biomolecular e anatomo-patológico do tumor seria resumido pelas informações contidas no estadiamento (TNM) e determinaria o *performance status* dos pacientes (efeito clínico da doença). O tratamento dependeria não só do estadiamento, mas também das condições clínicas do doente. O desfecho (recorrência, óbito ou progressão) estaria diretamente relacionado com o tratamento oferecido. Por fim, o óbito dependeria não só da recorrência ou progressão da doença, mas também de complicações inerentes ao tratamento, do *performance status* e de fatores sociodemográficos.

Em cada bloco realizou-se análise multivariada para a determinação dos fatores prognósticos mais expressivos. As variáveis com nível descritivo de até 0,10 foram consideradas como possíveis fatores explicativos. Para a análise multivariada dentro de cada bloco empregou-se a técnica de modelagem do tipo *stepwise forward selection*. Cada bloco subseqüente foi obrigatoriamente ajustado pelas variáveis dos

blocos antecessores. Estimou-se o risco para o evento através do *hazard ratio function* (HR) obtido do modelo de riscos proporcionais de Cox (1972). Para o modelo multivariado final, o nível de significância considerado foi de 5%.

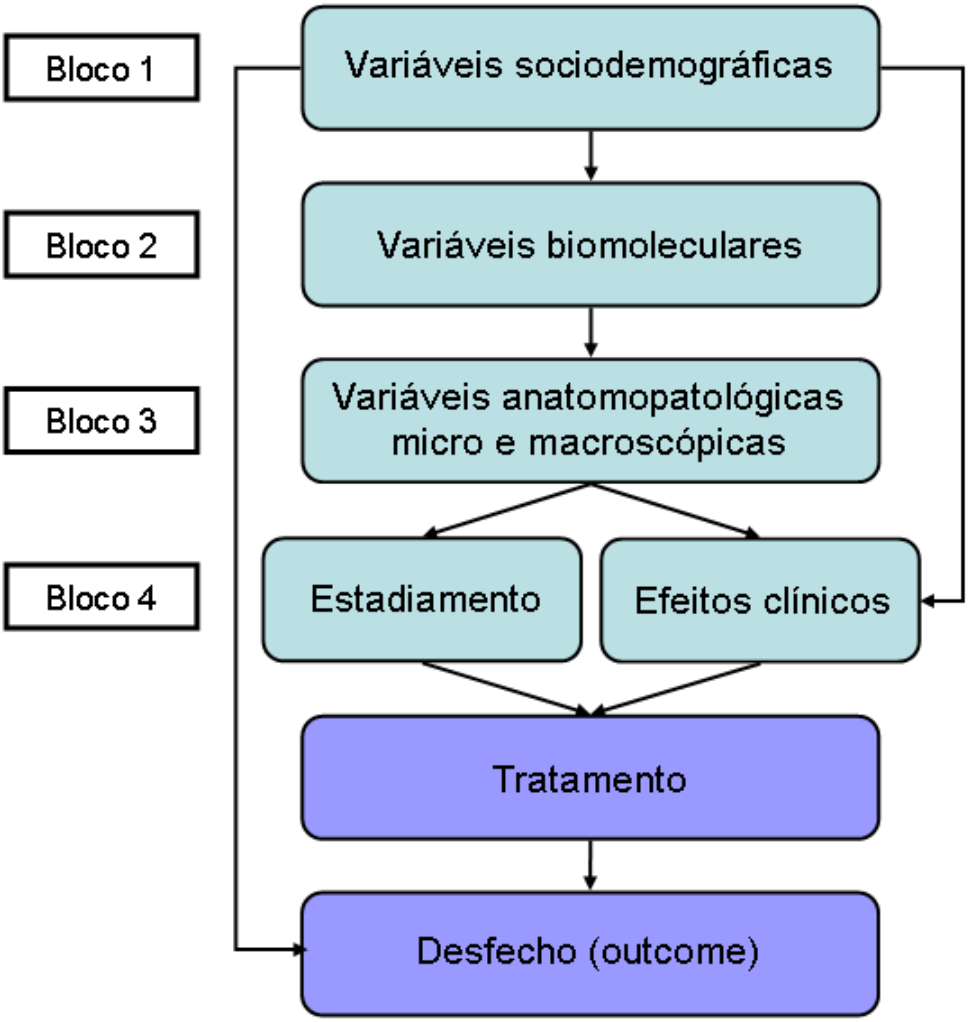


Gráfico 1. Modelo teórico hierarquizado para explicar os desfechos relacionados ao câncer.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Statistical *Package for Social Science (SPSS) for Windows*, versão 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

4. RESULTADOS

Neste estudo, com o objetivo de avaliar a expressão de proteínas que poderiam estar associadas à angiogênese em lesões da tireóide, foi analisada a expressão protéica de NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α e galectina-3 pela técnica imunoistoquímica num TMA constituído por tecido tireoideano normal (18 casos), bócio (62 casos), adenoma folicular (53 casos), carcinoma papilífero clássico (41 casos), carcinoma papilífero variante folicular (31 casos), carcinoma folicular (36 casos) e metástases de carcinoma papilífero (22 casos) e folicular (2 casos) da tireóide.

A expressão imunoistoquímica de NDRG1 foi considerada positiva nas lesões de tireóide que apresentaram coloração citoplasmática moderada para este marcador em mais de 50% das células epiteliais ou coloração citoplasmática intensa em mais de 25% das células epiteliais (Figura 1). A expressão de NDRG1 foi maior nos carcinomas de tireóide em relação ao bócio (13,6%) e adenoma folicular (22,6%). Em tireóide normal, a expressão de NDRG1 foi fraca ou ausente. O carcinoma papilífero clássico foi aquele que apresentou maior expressão de NDRG1 (56,4%), quando comparado ao carcinoma folicular (25,0%) e à variante folicular do carcinoma papilífero (23,3%). Observou-se que 33,3% das metástases de carcinoma da tireóide apresentaram expressão forte a moderada para NDRG1, porém as duas únicas metástases de carcinoma folicular não apresentaram expressão deste marcador (Tabela 6).

A avaliação semiquantitativa da expressão imunoistoquímica de osteonectina nas lesões de tireóide foi semelhante àquela utilizada para o marcador NDRG1: foram considerados positivos os casos com expressão citoplasmática moderada para osteonectina em mais de 50% das células epiteliais ou expressão intensa para o mesmo marcador em mais de 25% das células epiteliais (Figura 2). A expressão de osteonectina foi maior nos carcinomas de tireóide em relação ao bócio (17,2%) e adenoma folicular (19,2%). Em tireóide normal, a expressão citoplasmática de osteonectina foi muito tênue ou ausente. O carcinoma papilífero clássico foi aquele que apresentou maior expressão de osteonectina (41,0%), seguido do carcinoma folicular (38,9%) e da variante folicular do carcinoma papilífero (25,8%). De modo similar a NDRG1, observou-se que 33,3% das metástases de carcinoma de tireóide apresentam positividade para osteonectina, incluindo uma das metástases de carcinoma folicular da tireóide (Tabela 6).

A expressão imunoistoquímica de VEGF-A foi considerada positiva somente nos casos que apresentaram mais de 10% de células epiteliais com coloração citoplasmática moderada a forte para este marcador (Figura 3). Baseado nestes critérios, a expressão imunoistoquímica de VEGF-A foi predominantemente negativa nas diversas lesões da tireóide, com exceção do carcinoma papilífero clássico que apresentou 55,0% de casos positivos. A expressão imunoistoquímica de VEGF-A foi menor no bócio (18,3%) e na tireóide normal (apenas um caso, ou 5,9%) se comparado às neoplasias. Nestas, a expressão imunoistoquímica foi semelhante (com exceção do carcinoma papilífero clássico): adenoma folicular (26,4%); carcinoma papilífero variante folicular (22,6%); carcinoma folicular (25,0%); metástases de

carcinoma de tireóide (29,2%, sendo que as duas únicas metástases de carcinoma folicular foram negativas) (Tabela 6).

Os critérios utilizados para se avaliar a expressão semiquantitativa de VEGF-C foram os mesmos daqueles aplicados ao VEGF-A (Figura 4). Baseado nestes critérios, a expressão imunoistoquímica de VEGF-C foi predominantemente negativa nas diversas lesões de tireóide. Não se observou expressão de VEGF-C em tireóide normal e a expressão deste marcador foi maior nos carcinomas se comparado ao bócio (3,9%) e ao adenoma folicular (7,8%). O carcinoma papilífero clássico foi aquele que apresentou maior expressão imunoistoquímica de VEGF-C (48,7%), seguido do carcinoma folicular (22,9%), das metástases de carcinoma da tireóide (21,7%) e do carcinoma papilífero variante folicular (12,9%). Dentre as metástases, não houve expressão imunoistoquímica de VEGF-C nos dois casos de metástase de carcinoma folicular (Tabela 6).

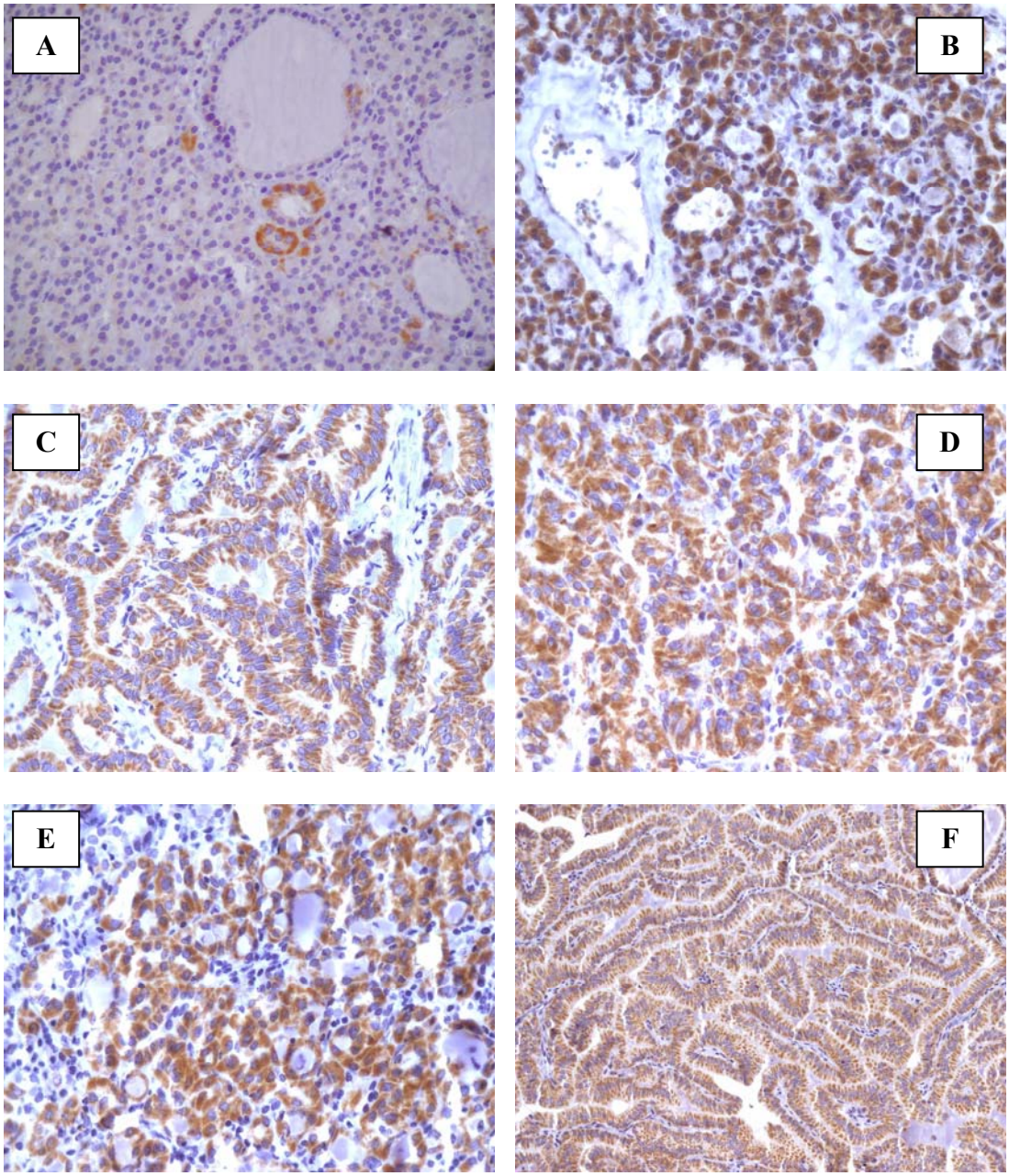


Figura 1. Expressão imunoistoquímica de NDRG1 em lesões da tireóide: (A) bócio; (B) adenoma folicular; (C) carcinoma papilífero clássico; (D) carcinoma papilífero variante folicular; (E) carcinoma folicular; (F) metástase de carcinoma papilífero da tireóide.

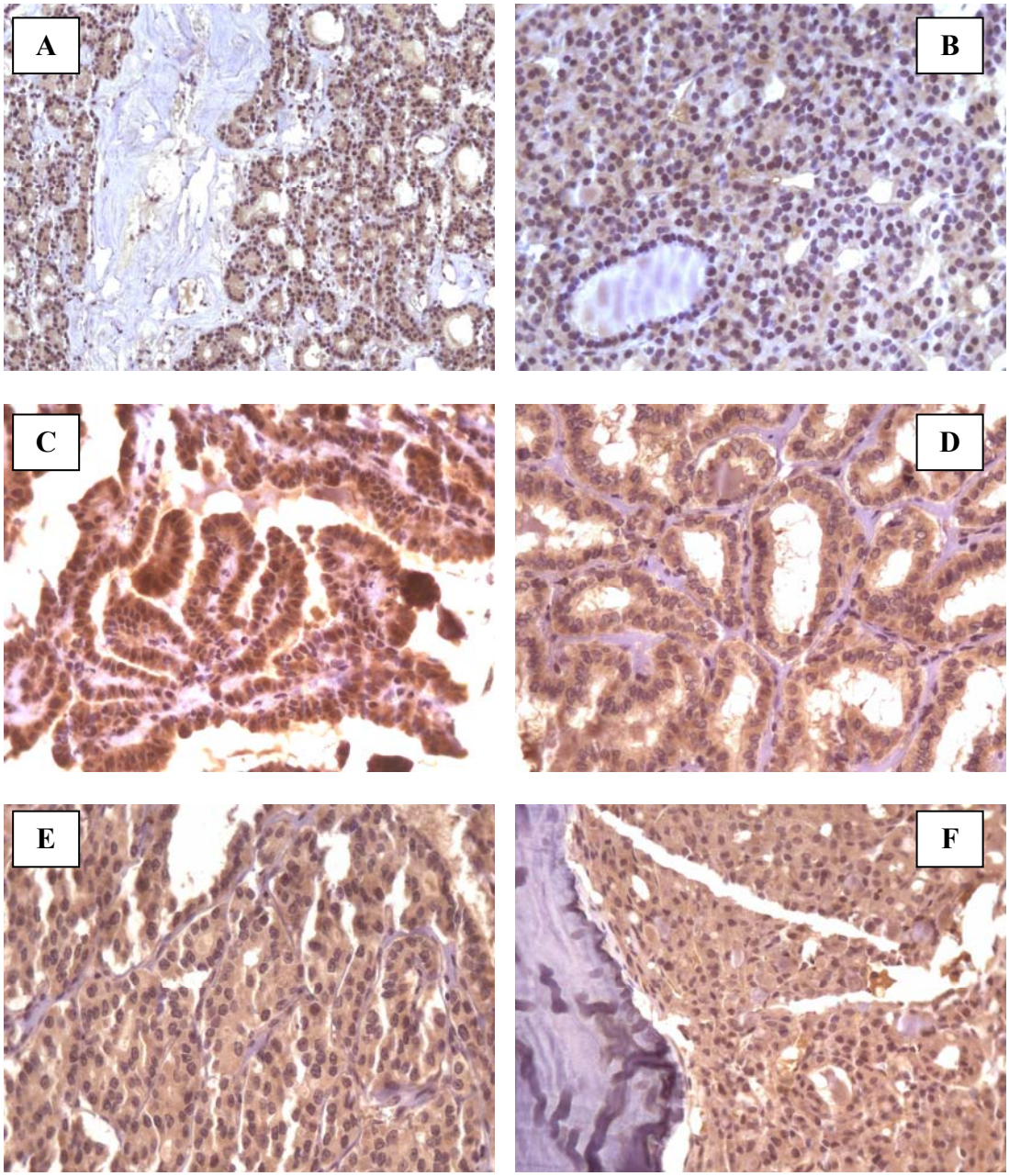


Figura 2. Expressão imunoistoquímica de osteonectina em lesões da tireóide: (A) bócio; (B) adenoma folicular; (C) carcinoma papilífero clássico; (D) carcinoma papilífero variante folicular; (E) carcinoma folicular; (F) metástase óssea de carcinoma folicular da tireóide.

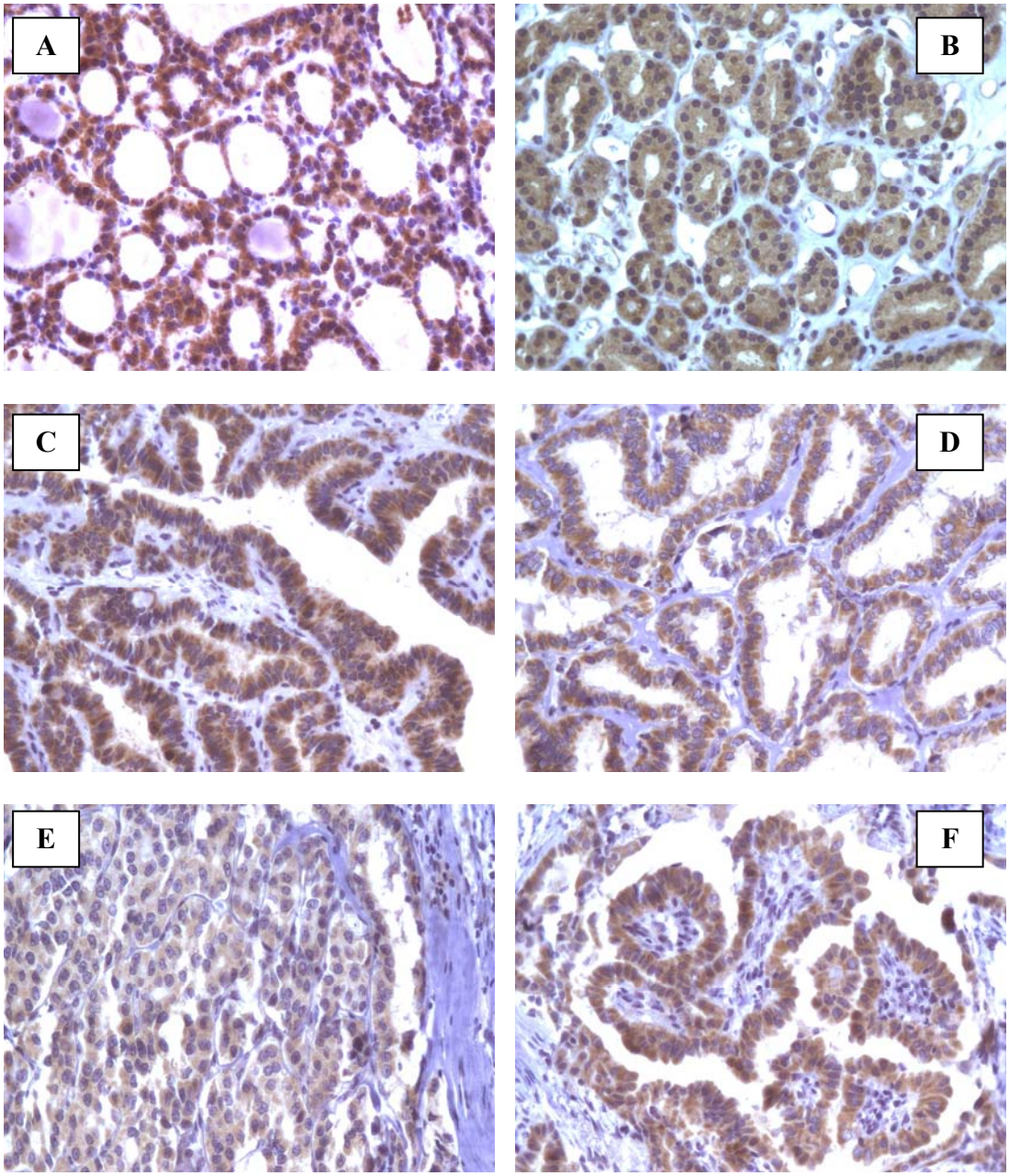


Figura 3. Expressão imunoistoquímica de VEGF-A em lesões da tireóide: (A) bócio; (B) adenoma folicular; (C) carcinoma papilífero clássico; (D) carcinoma papilífero variante folicular; (E) carcinoma folicular; (F) metástase de carcinoma papilífero da tireóide.

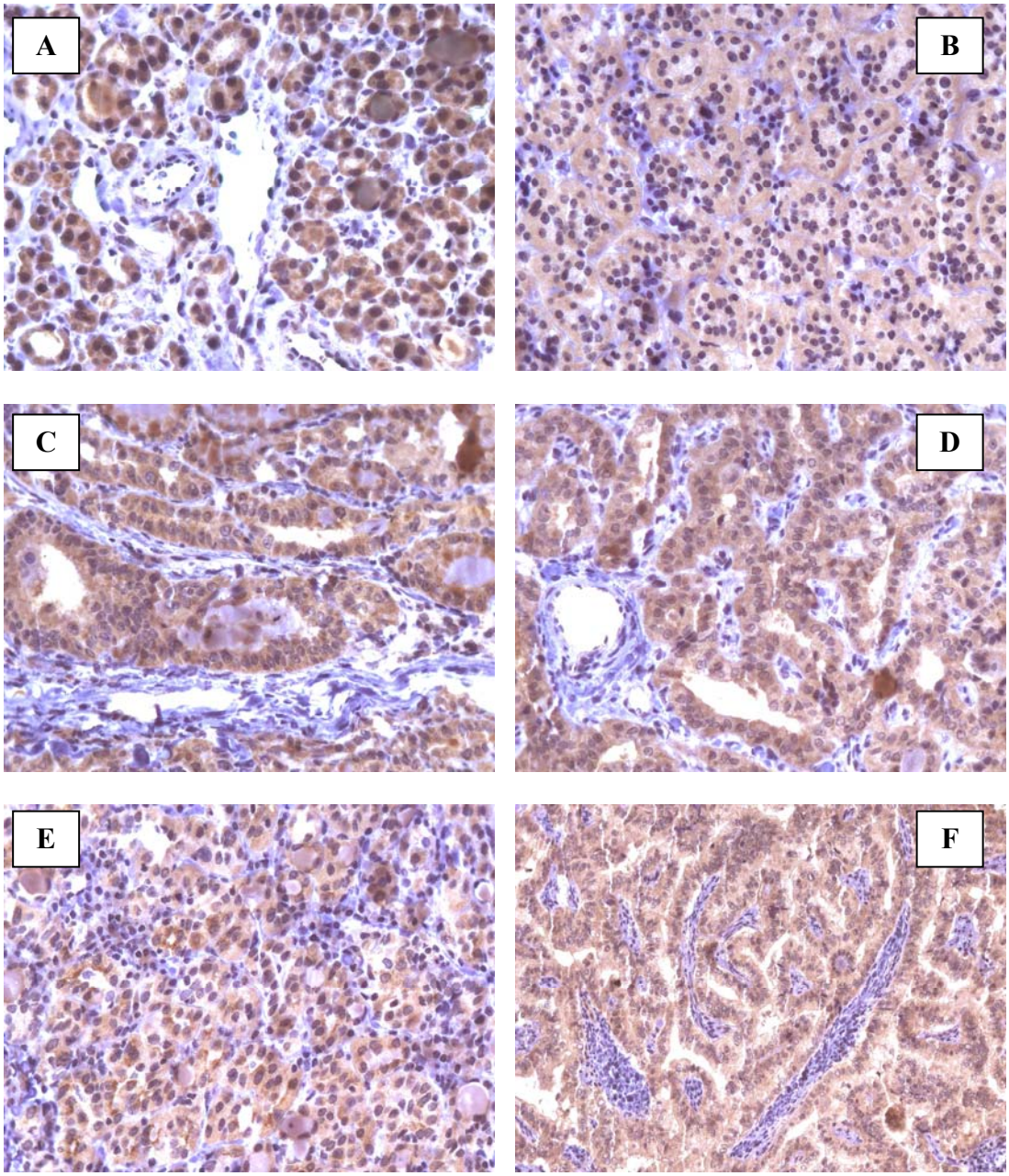


Figura 4. Expressão imunoistoquímica de VEGF-C em lesões da tireóide: (A) bócio; (B) adenoma folicular; (C) carcinoma papilífero clássico; (D) carcinoma papilífero variante folicular; (E) carcinoma folicular; (F) metástase de carcinoma papilífero da tireóide.

Na avaliação da expressão imunoistoquímica de Flk-1/KDR foram considerados positivos os casos que apresentaram mais de 10% de células epiteliais com expressão citoplasmática forte a moderada para Flk-1/KDR (Figura 5). Ao contrário dos demais marcadores, a expressão imunoistoquímica de Flk-1/KDR foi predominantemente positiva, com exceção da tireóide normal que apresentou 29,4% de casos positivos. A expressão deste marcador foi maior nos carcinomas em relação ao bócio (61,4%) e ao adenoma folicular (69,2%). O carcinoma papilífero clássico foi aquele que apresentou maior número de casos com positividade para Flk-1/KDR (97,4%). O carcinoma papilífero variante folicular e carcinoma folicular apresentaram resultados semelhantes, com 80,0% e 82,9% de casos positivos, respectivamente. A expressão de Flk-1/KDR ocorreu em 91,3% dos casos de carcinoma da tireóide, incluindo os dois casos de metástase de carcinoma folicular (Tabela 6).

Em relação à expressão imunoistoquímica de HIF-1α nas diferentes lesões de tireóide, foram considerados positivos somente os casos que apresentaram coloração citoplasmática forte a moderada para este marcador (Figura 6). A imunocoloração nuclear para HIF-1α foi extremamente discreta ou ausente, não sendo analisada neste estudo. A expressão deste marcador nas neoplasias da tireóide foi maior em relação à tireóide normal (5,6%) e ao bócio (6,8%), sendo similar no adenoma folicular (11,8%) e no carcinoma papilífero variante folicular (12,9%). A expressão imunoistoquímica de HIF-1α foi maior nas metástases de carcinoma da tireóide (26,1%), porém as duas únicas metástases de carcinoma folicular não expressaram este marcador. O carcinoma papilífero clássico e o carcinoma folicular apresentaram 25,6% e 19,4% de casos positivos, respectivamente (Tabela 6).

A expressão imunoistoquímica de galectina-3 foi considerada positiva nas lesões de tireóide que apresentaram 10% ou mais de células epiteliais com expressão citoplasmática leve a intensa para este marcador (Figura 7). Não se observou, neste estudo, expressão de galectina-3 em tireóide normal. A expressão deste marcador foi maior nos carcinomas de tireóide se comparado ao bócio (3,6%) e adenoma folicular (7,8%). Em raros casos de carcinoma papilífero clássico, carcinoma folicular e metástases de carcinoma papilífero da tireóide também se observou a expressão imunoistoquímica de galectina-3 no núcleo de algumas células neoplásicas. Dentre os carcinomas primários da tireóide, o carcinoma papilífero clássico foi aquele que apresentou maior número de casos positivos (97,4%), seguido do carcinoma papilífero variante folicular (54,8%) e do carcinoma folicular (22,9%). A expressão imunoistoquímica de galectina-3 ocorreu em 82,6% das metástases de carcinoma da tireóide, porém as duas únicas metástases de carcinoma folicular foram negativas para este marcador (Tabela 6).

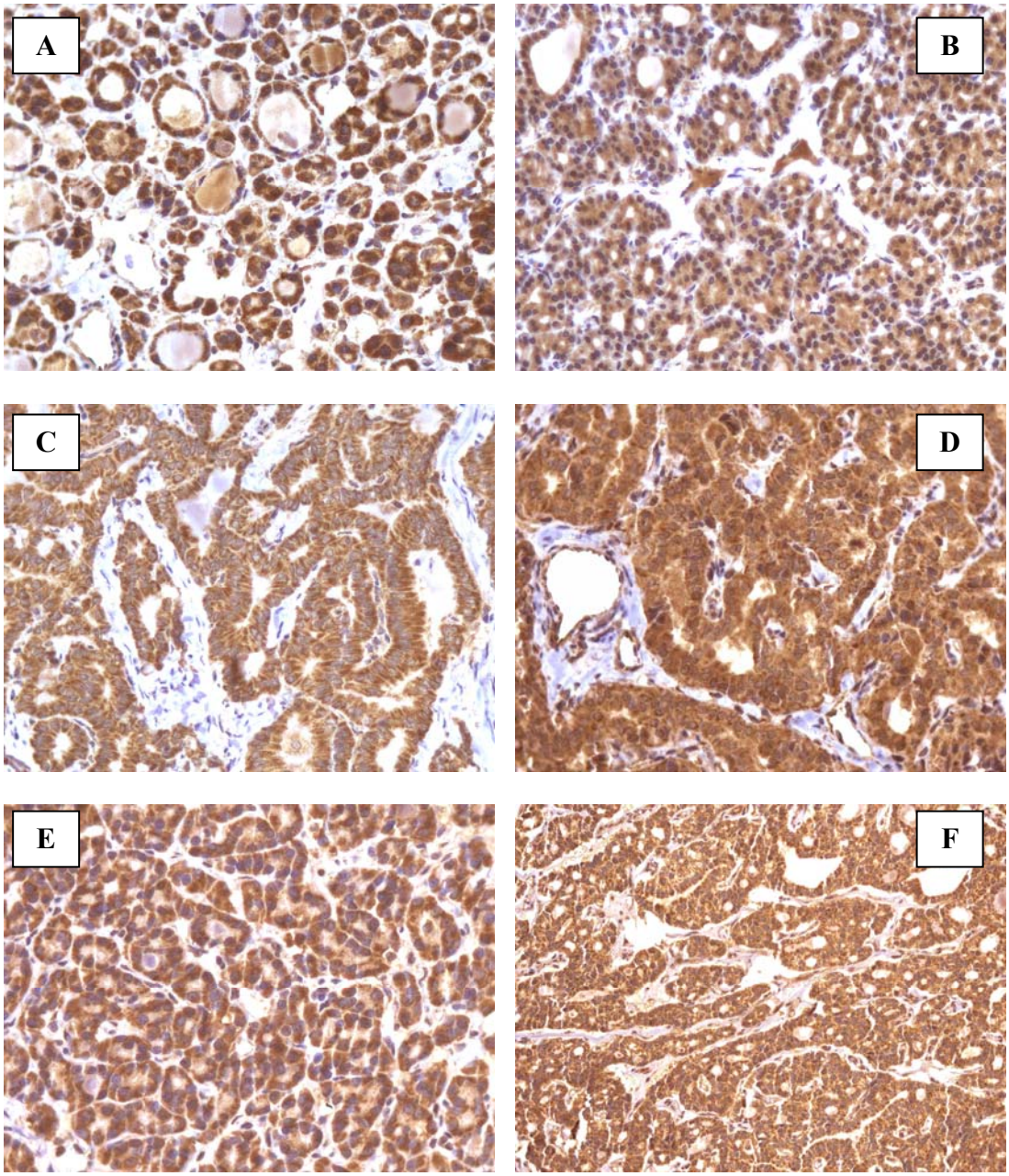


Figura 5. Expressão imunoistoquímica de Flk-1/KDR em lesões da tireóide: (A) bócio; (B) adenoma folicular; (C) carcinoma papilífero clássico; (D) carcinoma papilífero variante folicular; (E) carcinoma folicular; (F) metástase de carcinoma folicular da tireóide.

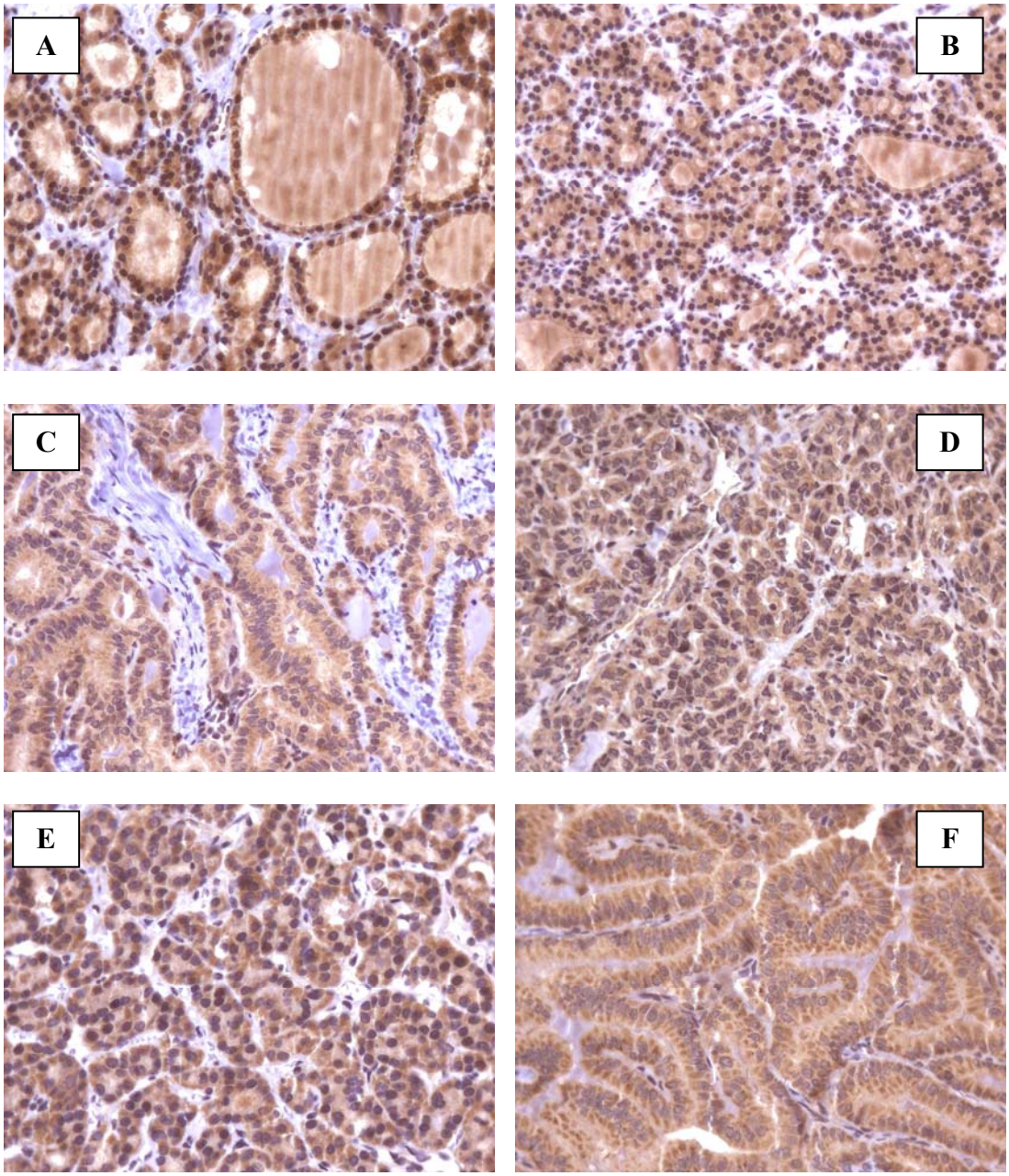


Figura 6. Expressão imunoistoquímica de HIF-1α em lesões da tireóide: (A) bócio; (B) adenoma folicular; (C) carcinoma papilífero clássico; (D) carcinoma papilífero variante folicular; (E) carcinoma folicular; (F) metástase de carcinoma papilífero da tireóide.

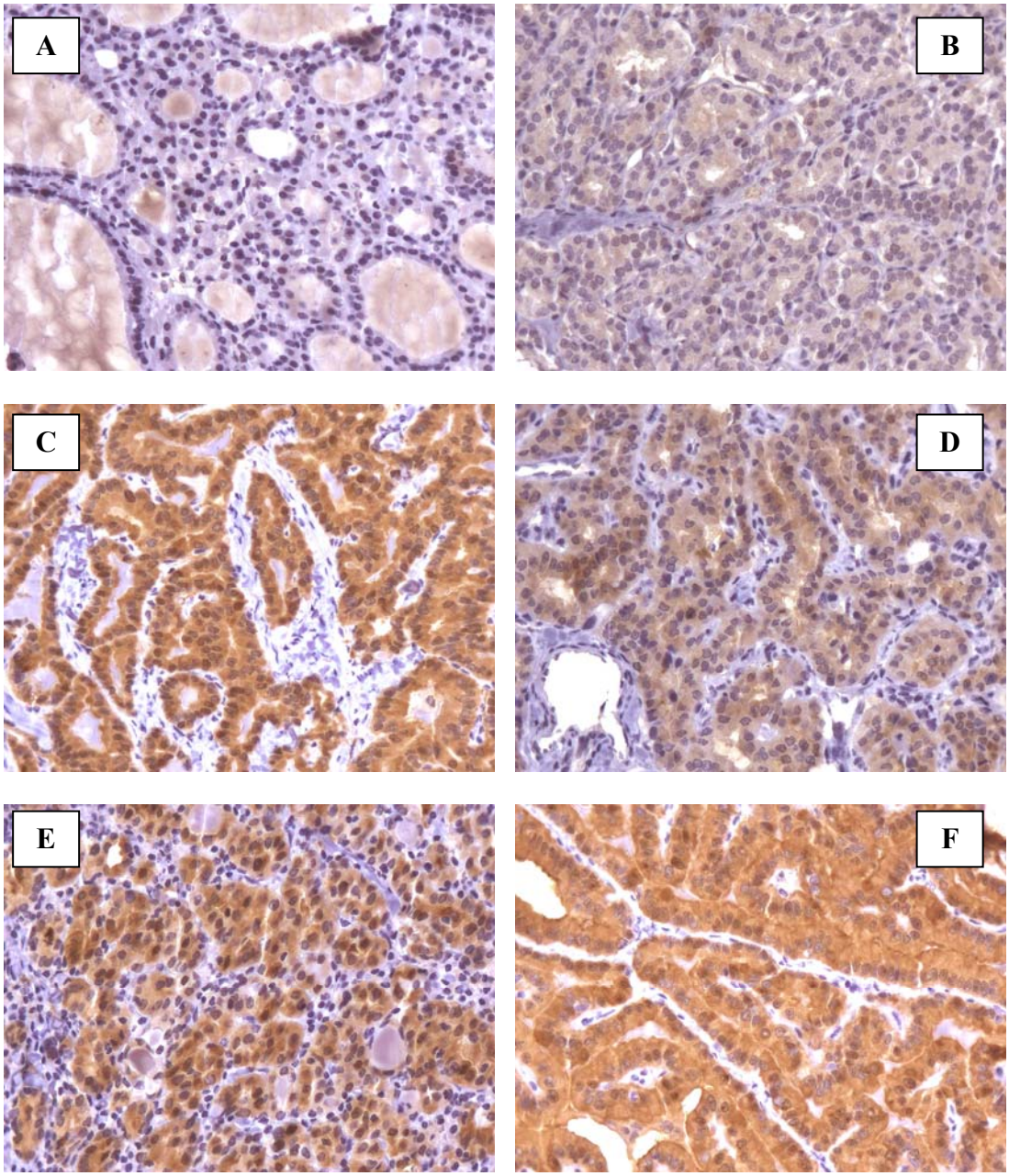


Figura 7. Expressão imunoistoquímica de Galectina-3 em lesões da tireóide: (A) bócio; (B) adenoma folicular; (C) carcinoma papilífero clássico; (D) carcinoma papilífero variante folicular; (E) carcinoma folicular; (F) metástase de carcinoma papilífero da tireóide.

Tabela 6 – Resultados da expressão imunoistoquímica[1]

Diagnóstico	NDRG1	Osteonectin a	VEGF-A	VEGF-C	Flk-1/KDR	HIF-1α	Galectina-3
Tireóide normal	0/18 (0,0)	0/15 (0,0)	1/17 (5,9)	0/17 (0,0)	5/17 (29,4)	1/18 (5,6)	0/16 (0,0)
Bócio	8/59 (13,6)	10/58 (17,2)	11/60 (18,3)	2/51 (3,9)	35/57 (61,4)	4/59 (6,8)	2/56 (3,6)
Adenoma folicular	12/53 (22,6)	10/52 (19,2)	14/53 (26,4)	4/51 (7,8)	36/52 (69,2)	6/56 (11,8)	4/52 (7,7)
Carcinoma papilífero clássico	22/39 (56,4)	16/39 (41,0)	22/40 (55,0)	19/39 (48,7)	38/39 (97,4)	10/39 (25,6)	38/39 (97,4)
Carcinoma papilífero variante folicular	7/30 (23,3)	8/31 (25,8)	7/31 (22,6)	4/31 (12,9)	24/30 (80,0)	4/31 (12,9)	17/31 (54,8)
Carcinoma folicular	9/36 (25,0)	14/36 (38,9)	9/36 (25,0)	8/35 (22,9)	29/35 (82,9)	7/36 (19,4)	8/35 (22,9)
Metástase de carcinoma da tireóide[2]	8/24 (33,3)	8/24 (33,3)	7/24 (29,2)	5/23 (21,7)	21/23 (91,3)	6/23 (26,1)	19/23 (82,6)

[1] Os números em parênteses representam as percentagens de casos positivos.

[2] Compreende 22 metástases de carcinoma papilífero e 2 de carcinoma folicular da tireóide.

Foi analisada a associação entre a expressão imunoistoquímica de Flk-1/KDR e os seus dois ligantes, VEGF-A e VEGF-C nas diferentes lesões benignas e malignas de tireóide. Os dados da tabela 7 mostram que a maioria dos casos que foram positivos para VEGF-A ou VEGF-C também apresentaram imunocoloração positiva para Flk-1/KDR (ambas com $P < 0,001$).

Tabela 7 – Associação entre a expressão imunoistoquímica de Flk-1/KDR com VEGF-A e VEGF-C nas lesões benignas e malignas da tireóide

Características	Categoria	N	Flk-1/KDR		
			Negativo (%)	Positivo (%)	P^*
VEGF-A	Negativo	184	62 (33,7)	122 (66,3)	< 0,001
	Positivo	69	3 (4,3)	66 (95,7)	
VEGF-C	Negativo	202	57 (28,2)	145 (71,8)	< 0,001
	Positivo	42	1 (2,4)	41 (97,6)	

*Teste exato de Fischer; N, número de casos analisados.

Também foi analisada a associação entre a expressão imunoistoquímica de HIF-1α e duas proteínas que podem ser moduladas por este fator, isto é, NDRG1 e VEGF-A, nas diferentes lesões benignas e malignas de tireóide. Os dados da tabela 8 mostram que a maioria dos casos que foram positivos para HIF-1α também o foram para as proteínas NDRG1 e VEGF-A (ambas com $P < 0,001$).

Tabela 8 – Associação entre a expressão imunoistoquímica de HIF-1α com NDRG1 e VEGF-A nas lesões benignas e malignas da tireóide

Características	Categoria	N	HIF-1α		
			Negativo (%)	Positivo (%)	P^*
NDRG1	Negativo	188	186 (98,9)	2 (1,1)	< 0,001
	Positivo	66	30 (45,5)	36 (54,5)	
VEGF-A	Negativo	184	180 (97,8)	4 (2,2)	< 0,001
	Positivo	71	38 (53,5)	33 (46,5)	

*Teste exato de Fischer; N, número de casos analisados.

Nos casos de carcinoma papilífero de tireóide (clássico e variante folicular), a expressão imunoistoquímica de VEGF-A e VEGF-C nos tumores primários foi comparada com a expressão destas proteínas nas metástases correspondentes. Os dados da tabela 9 mostram que a maioria dos tumores primários positivos para VEGF-A também apresentou metástases positivas para esta proteína (P = 0,035). Já os dados da tabela 10 mostram que não houve uma associação consistente da os tumores primários e as suas respectivas metástases em relação à expressão imunoistoquímica de VEGF-C (P = 0,569).

Tabela 9 – Associação entre a expressão imunoistoquímica de VEGF-A em carcinomas papilíferos da tireóide (tumores primários) e suas respectivas metástases

Características	Categoria	N	VEGF-A		
			Negativo (%)	Positivo (%)	P^*
VEGF-A (linfonodos)	Negativo	11	7 (63,6)	4 (36,4)	0,035
	Positivo	6	0 (40,0)	6 (100,0)	

*Teste exato de Fischer; N, número de casos analisados.

Tabela 10 –Associação entre a expressão imunoistoquímica de VEGF-C em carcinomas papilíferos da tireóide (tumores primários) e suas respectivas metástases

Características	Categoria	N	VEGF-C		
			Negativo (%)	Positivo (%)	P^*
VEGF-C (linfonodos)	Negativo	12	7 (54,3)	5 (41,7)	0,569
	Positivo	4	1 (25,0)	3 (75,0)	

*Teste exato de Fischer; N, número de casos analisados.

O valor diagnóstico de cada uma das proteínas estudadas (NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α, galectina-3) foi analisado comparando-se os subgrupos histológicos de lesões tireoideanas benignas (bócio e adenoma folicular) e malignas (carcinoma papilífero clássico, carcinoma papilífero variante folicular, carcinoma folicular e metástases de carcinoma da tireóide) quanto à sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia.

De um modo geral a sensibilidade e a acurácia de cada uma das proteínas foi baixa para a distinção entre lesões benignas e malignas da tireóide, com exceção das proteínas Flk-1/KDR e galectina-3. A sensibilidade de Flk-1/KDR para o diagnóstico de malignidade foi de 88,2%, porém a especificidade foi baixa (34,9%) e a acurácia razoável (63,6%). A proteína galectina-3 apresentou uma sensibilidade razoável para o diagnóstico de malignidade, com uma especificidade de 94,4% e a melhor acurácia em relação aos demais marcadores (78,0%) (Tabela 11).

Tabela 11 - Valor diagnóstico das proteínas diferencialmente expressas nas lesões de tireóide

Anticorpo	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Acurácia
NDRG1	35,7%	82,1%	69,7%	52,6%	57,3%
Osteonectina	35,4%	81,8%	69,7%	51,7%	56,7%
VEGF-A	34,4%	77,9%	64,3%	50,6%	54,5%
VEGF-C	28,1%	94,1%	85,7%	51,1%	57,4%
Flk-1/KDR	88,2%	34,9%	61,2%	71,7%	63,6%
HIF-1α	20,9%	90,9%	73,0%	49,5%	53,1%
Galectina-3	64,1%	94,4%	93,2%	68,9%	78,0%

NOTA: VVP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo.

Também foi analisado o valor diagnóstico da associação de cada uma das proteínas (NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR e HIF-1α) com a galectina-3 para a distinção de lesões benignas e malignas da tireóide. Nesta análise, os casos foram considerados positivos quando houve co-expressão de ambas as proteínas associadas e negativos quando houve expressão de apenas uma das proteínas ou nenhuma delas (Tabela 12).

Tabela 12 - Valor diagnóstico da co-expressão de galectina-3 com as demais proteínas (NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR e HIF-1α) nas lesões de tireóide

Anticorpos	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Acurácia
NDRG1+galectina-3	28,7%	99,1%	97,4%	54,7%	61,4%
Osteonectina+galectina-3	24,0%	99,1%	96,9%	53,1%	58,9%
VEGF-A+galectina-3	26,9%	99,1%	97,2%	54,1%	60,5%
VEGF-C+galectina-3	23,4%	98,2%	93,8%	52,7%	58,2%
Flk-1/KDR+galectina-3	61,7%	94,5%	92,9%	68,0%	76,9%
HIF-1α+galectina-3	17,2%	99,1%	95,7%	51,2%	55,4%

VVP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo.

A associação de cada uma das proteínas com a galectina-3 revelou um aumento das taxas de especificidade e VPP quando comparadas com as mesmas taxas (especificidade e VPP) para as proteínas isoladamente. Estes dados refletem uma diminuição do número de casos falso-positivos, isto é, lesões benignas – bócio ou adenoma folicular – que co-expressaram galectina-3 e qualquer um dos outros marcadores. Houve apenas um caso de adenoma folicular que co-expressou NDRG1 + galectina-3, osteonectina + galectina-3, VEGF-A + galectina-3 e HIF-1α + galectina-3. Dois casos de lesões benignas (um bócio e um adenoma folicular) co-expressaram VEGF-C + galectina-3 e seis casos de lesões benignas (2 casos de bócio e 4 casos de adenoma folicular) co-expressaram Flk-1/KDR + galectina-3. Por outro lado, a mesma associação não mostra uma alteração expressiva das taxas de sensibilidade, VPN e acurácia quando comparadas com as mesmas taxas (sensibilidade, VPN e acurácia) para as proteínas isoladamente (Tabela 12).

Com a finalidade de se avaliar a contribuição da expressão protéica de NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α e galectina-3 nos carcinomas de tireóide (carcinoma papilífero clássico, carcinoma papilífero variante folicular e carcinoma folicular), as características demográficas e clínico-patológicas dos casos que não expressaram estes marcadores foram comparadas com aquelas dos casos que expressaram os mesmos marcadores.

As características demográficas e clínico-patológicas analisadas foram: idade (maior ou igual a 45 anos ou menor de 45 anos); estadiamento TNM; e índice prognóstico de *AMES* (baixo e alto risco). Nesta análise, o estadiamento TNM foi

agrupado em duas categorias: estádios I+II e estádios III+IV. Variáveis como a presença ou ausência de tumor multicêntrico e extensão tumoral extra-tireoideana foram analisadas somente para os casos com diagnóstico de carcinoma papilífero clássico e variante folicular. A distribuição dos pacientes com carcinoma de tireóide de acordo com o estadiamento TNM e a estimativa de risco pelo índice prognóstico de AMES encontra-se representada nas Tabelas 13 e 14, respectivamente.

Tabela 13 – Distribuição dos pacientes com carcinoma de tireóide segundo o estadiamento TNM

Tipo histológico	I[1] (%)	II (%)	III (%)	IV (%)	Total (%)
Carcinoma papilífero clássico	19 (46,3)	1 (2,4)	11 (26,8)	10 (24,4)	41 (100,0)
Carcinoma papilífero variante folicular	21 (67,7)	2 (6,5)	5 (16,1)	3 (9,7)	31 (100,0)
Carcinoma folicular[2]	7 (38,9)	3 (16,7)	0 (0,0)	8 (44,4)	18 (100,0)

[1] Estádios do TNM, de I a IV.
[2] Os dados sobre o estadiamento TNM encontravam-se disponíveis somente para 18 dos 36 pacientes com carcinoma folicular da tireóide.

Tabela 14 – Distribuição dos pacientes com carcinoma de tireóide segundo a estimativa de risco pelo índice prognóstico de *AMES*[1]

Tipo histológico	Baixo risco (%)	Alto risco (%)	Total (%)
Carcinoma papilífero clássico	25 (62,5)	15 (37,5)	40 (100,0)
Carcinoma papilífero variante folicular	24 (80,0)	6 (20,0)	30 (100,0)
Carcinoma folicular[2]	8 (38,1)	13 (61,9)	21 (100,0)

[1] *AMES, **a**ge of the patient, **m**etastases of the tumor, **e**xtent of primary tumor, **s**ize of the tumor*.
[2] Não foi possível avaliar o risco pelo método AMES para 15 dos 36 pacientes com carcinoma folicular da tireóide.

Nos carcinomas de tireóide, a expressão protéica de NDRG1 apresentou correlação estatisticamente significativa com idade maior ou igual a 45 anos (P = 0,015), estádio TNM mais avançado (P = 0,004), alto risco pelo índice prognóstico de *AMES* (P = 0,005) e, para os carcinomas papilíferos (clássico e variante folicular), presença de extensão tumoral extra-tireoideana (P < 0,001) (Tabela 15).

Tabela 15 – Associação entre a expressão imunoistoquímica de NDRG1 e as variáveis demográficas e clínico-patológicas em pacientes com carcinoma de tireóide

Características	Categoria	N	NDRG1		
			Negativo (%)	Positivo (%)	P^{**}
Idade	< 45 anos	38	30 (78,9)	8 (21,1)	0,015
	≥ 45 anos	67	37 (55,2)	30 (44,8)	
Multicentricidade[1]	Não	25	16 (64,0)	9 (36,0)	0,444
	Sim	44	24 (54,5)	20 (45,5)	
Extensão extra tireoideana[1]	Não	36	28 (77,8)	8 (22,2)	< 0,001
	Sim	33	12 (36,4)	21 (63,6)	
TNM	Estádios I+II	51	37 (72,5)	14 (27,5)	0,004
	Estádios III+IV	36	15 (41,7)	21 (58,3)	
AMES	Baixo risco	56	40 (71,4)	16 (28,6)	0,005
	Alto risco	34	14 (41,2)	20 (58,8)	

[1] Somente para os carcinomas papilífero clássico e variante folicular.
[**]Teste do qui-quadrado; N, número de casos analisados.

De modo similar a NDRG1, a expressão imunoistoquímica de VEGF-A nos carcinomas de tireóide apresentou correlação estatisticamente significativa com idade maior ou igual a 45 anos (P = 0,010), estádio TNM mais avançado (P = 0,001)

e alto risco pelo índice prognóstico de *AMES* (P = 0,001). Para os carcinomas papilíferos clássico e variante folicular, a expressão de VEGF-A se correlacionou com a presença de extensão tumoral extra-tireoideana (P < 0,001) (Tabela 16). Nos carcinomas de tireóide, a expressão imunoistoquímica de VEGF-C apresentou correlação estatisticamente significativa com estádio TNM mais avançado (P = 0,031), alto risco pelo índice prognóstico de *AMES* (P = 0,005) e, para os carcinomas papilíferos clássico e variante folicular, presença de extensão extra-tireoideana (P < 0,001) (Tabela 17). Por outro lado, a expressão imunoistoquímica de Flk-1/KDR nos carcinomas de tireóide não apresentou correlação estatisticamente significativa com nenhuma das características clínico-patológicas analisadas (Tabela 18).

Tabela 16 – Associação entre a expressão imunoistoquímica de VEGF-A e as variáveis demográficas e clínico-patológicas em pacientes com carcinoma de tireóide

Características	Categoria	N	VEGF-A		
			Negativo (%)	Positivo (%)	P^{**}
Idade	< 45 anos	40	32 (80,0)	8 (20,0)	0,010
	≥ 45 anos	67	37 (55,2)	30 (44,8)	
Multicentricidade[1]	Não	27	18 (66,7)	9 (33,3)	0,313
	Sim	44	24 (54,5)	20 (45,5)	
Extensão extra tireoideana[1]	Não	38	30 (78,9)	8 (21,1)	< 0,001
	Sim	33	12 (36,4)	21 (63,6)	
TNM	Estádios I+II	53	40 (75,5)	13 (24,5)	0,001
	Estádios III+IV	36	14 (38,9)	22 (61,1)	
AMES	Baixo risco	58	43 (74,1)	15 (25,9)	0,001
	Alto risco	34	13 (38,2)	21 (61,8)	

[1] Somente para os carcinomas papilífero clássico e variante folicular.

[**]Teste do qui-quadrado; N, número de casos analisados.

Tabela 17 – Associação entre a expressão imunoistoquímica de VEGF-C e as variáveis demográficas e clínico-patológicas em pacientes com carcinoma de tireóide

Características	Categoria	N	VEGF-C		
			Negativo (%)	Positivo (%)	P^{**}
Idade	< 45 anos	39	29 (74,4)	10 (25,6)	0,503
	≥ 45 anos	66	45 (68,2)	21 (31,8)	
Multicentricidade[1]	Não	26	18 (69,2)	8 (30,8)	0,775
	Sim	44	29 (65,9)	15 (34,1)	
Extensão extra tireoideana[1]	Não	37	34 (91,9)	3 (8,1)	< 0,001
	Sim	33	13 (39,4)	20 (60,6)	
TNM	Estádios I+II	52	39 (75,0)	13 (25,0)	0,031
	Estádios III+IV	36	19 (52,8)	17 (47,2)	
AMES	Baixo risco	57	44 (77,2)	13 (22,8)	0,005
	Alto risco	33	16 (48,5)	17 (51,5)	

[1] Somente para os carcinomas papilífero clássico e variante folicular.
[**]Teste do qui-quadrado; N, número de casos analisados.

Tabela 18 – Associação entre a expressão imunoistoquímica de Flk-1/KDR e as variáveis demográficas e clínico-patológicas em pacientes com carcinoma de tireóide

Características	Categoria	N	Flk-1/KDR		
			Negativo (%)	Positivo (%)	P^{**}
Idade	< 45 anos	39	2 (5,1)	37 (94,9)	0,202
	≥ 45 anos	65	9 (13,8)	56 (86,2)	
Multicentricidade[1]	Não	25	2 (8,0)	23 (92,0)	0,999
	Sim	44	3 (6,8)	41 (93,2)	
Extensão extra tireoideana[1]	Não	36	4 (11,1)	32 (88,9)	0,359
	Sim	33	1 (3,0)	32 (97,0)	
TNM	Estádios I+II	51	5 (9,8)	46 (90,2)	0,999
	Estádios III+IV	36	3 (8,3)	33 (91,7)	
AMES	Baixo risco	56	6 (10,7)	50 (89,3)	0,999
	Alto risco	33	4 (12,1)	29 (87,9)	

[*1] Somente para os carcinomas papilífero clássico e variante folicular; [**]Teste exato de Fischer; N, número de casos analisados.

A expressão imunoistoquímica de osteonectina nos carcinomas de tireóide apresentou correlação estatisticamente significativa apenas com alto risco pelo índice prognóstico de *AMES* (P = 0,002). As demais características clínico-patológicas – idade, estadiamento TNM, multicentricidade e extensão tumoral extra-tireoideana - não exibiram correlação significativa para este marcador (tabela 19).

Tabela 19 – Associação entre a expressão imunoistoquímica de osteonectina e as variáveis demográficas e clínico-patológicas em pacientes com carcinoma de tireóide

Características	Categoria	N	Osteonectina		
			Negativo (%)	Positivo (%)	P^{**}
Idade	< 45 anos	39	26 (66,7)	13 (33,3)	0,680
	≥ 45 anos	67	42 (62,7)	25 (37,3)	
Multicentricidade[1]	Não	26	19 (73,1)	7 (26,9)	0,318
	Sim	44	27 (61,4)	17 (38,6)	
Extensão extra tireoideana[1]	Não	37	27 (73,0)	10 (27,0)	0,175
	Sim	33	19 (57,6)	14 (42,4)	
TNM	Estádios I+II	52	36 (69,2)	16 (30,8)	0,069
	Estádios III+IV	36	18 (50,0)	18 (50,0)	
AMES	Baixo risco	57	42 (73,7)	15 (26,3)	0,002
	Alto risco	34	14 (41,2)	20 (58,8)	

[1] Somente para os carcinomas papilífero clássico e variante folicular.

[**]Teste do qui-quadrado; N, número de casos analisados.

A expressão imunoistoquímica de HIF-1α nos carcinomas da tireóide apresentou correlação estatisticamente significativa com alto risco pelo índice prognóstico de AMES (P = 0,038) e correlação marginal com estádio TNM mais avançado (P = 0,051). Para os carcinomas papilífero clássico e variante folicular houve correlação estatística significativa com a presença de extensão tumoral extra-tireoideana (P = 0,008) (tabela 20). A expressão imunoistoquímica de galectina-3

exibiu correlação estatisticamente significativa com presença de multicentricidade (P = 0,039) e extensão tumoral extra-tireoideana (P < 0,001) para os carcinomas papilífero clássico e variante folicular (tabela 21).

Tabela 20 – Associação entre a expressão imunoistoquímica de HIF-1α e as variáveis demográficas e clínico-patológicas em pacientes com carcinoma de tireóide

Características	Categoria	N	HIF-1α		
			Negativo (%)	Positivo (%)	P^{**}
Idade	< 45 anos	39	35 (89,7)	4 (10,3)	0,060
	≥ 45 anos	67	50 (74,6)	17 (25,4)	
Multicentricidade[1]	Não	26	22 (84,6)	4 (15,4)	0,458
	Sim	44	34 (77,3)	10 (22,7)	
Extensão extra tireoideana[1]	Não	37	34 (91,9)	3 (8,1)	0,008
	Sim	33	22 (66,7)	11 (33,3)	
TNM	Estádios I+II	52	45 (86,5)	7 (13,5)	0,051
	Estádios III+IV	36	25 (69,4)	11 (30,6)	
AMES	Baixo risco	57	49 (86,0)	8 (14,0)	0,038
	Alto risco	34	23 (67,6)	11 (32,4)	

[1] Somente para os carcinomas papilífero clássico e variante folicular;

[**]Teste do qui-quadrado; N, número de casos analisados.

Tabela 21 – Associação entre a expressão imunoistoquímica de galectina-3 e as variáveis demográficas e clínico-patológicas em pacientes com carcinoma de tireóide

Características	Categoria	N	Galectina-3		
			Negativo (%)	Positivo (%)	P^{**}
Idade	< 45 anos	39	15 (38,5)	24 (61,5)	0,805
	≥ 45 anos	66	27 (40,9)	39 (59,1)	
Multicentricidade[1]	Não	26	9 (34,6)	17 (65,4)	0,039
	Sim	44	6 (13,6)	38 (86,4)	
Extensão extra tireoideana[1]	Não	37	14 (37,8)	23 (62,2)	< 0,001
	Sim	33	1 (3,0)	32 (97,0)	
TNM	Estádios I+II	52	16 (30,8)	36 (69,2)	0,983
	Estádios III+IV	36	11 (30,6)	25 (69,4)	
AMES	Baixo risco	57	18 (31,6)	39 (68,4)	0,643
	Alto risco	33	12 (36,4)	21 (63,6)	

[1] Somente para os carcinomas papilífero clássico e variante folicular;

[**]Teste do qui-quadrado; N, número de casos analisados.

Os pacientes com carcinoma da tireóide (carcinoma papilífero clássico, carcinoma papilífero variante folicular e carcinoma folicular) foram analisados quanto à sobrevida em 5 anos (60 meses) segundo variáveis demográficas, clínico-patológicas e biomoleculares (isto é, a expressão imunoistoquímica de NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α e galectina-3). Neste estudo, não foi realizada a análise de sobrevida global, pois havia apenas 4 óbitos no período estudado de até 60 meses. Optou-se, então, pela sobrevida livre de evento: nesta análise, o evento é definido como qualquer uma das opções que ocorrer primeiro – recorrência, progressão ou óbito. O presente estudo revelou 19 eventos (recorrência, progressão ou óbito por carcinoma de tireóide) no período de até 5 anos (60 meses).

As características demográficas e clínico-patológicas analisadas foram: idade (maior ou igual a 45 anos ou menor de 45 anos); tipo histológico (carcinoma papilífero clássico, carcinoma papilífero variante folicular e carcinoma folicular); tamanho do tumor (tumor até 4,0 cm; tumor maior do que 4,0 cm); estadiamento TNM (estádios I, II e III versus estádio IV); índice prognóstico de *AMES* (baixo e alto risco); e, somente para os carcinomas papilífero clássico e variante folicular, presença ou ausência de tumor multicêntrico e extensão tumoral extra-tireoideana.

A análise univariada pelo método de Kaplan-Meier revelou diferença estatisticamente significativa nas curvas de sobrevida livre de evento entre os pacientes com carcinoma papilífero (clássico e variante folicular) e aqueles com carcinoma folicular da tireóide ($P = 0,003$) (Tabela 22; Anexo, Gráfico 1). As curvas de sobrevida livre de evento também revelaram que os pacientes com carcinoma de tireóide em estádio mais avançado (estádio IV), com alto risco pelo índice prognóstico de *AMES* e com tumores maiores do que 4,0 cm apresentaram um pior prognóstico em relação aqueles em estádios mais precoces (I, II e III, $P < 0,001$) (Tabela 22; Anexo, Gráfico 2), baixo risco pelo índice prognóstico de *AMES* ($P < 0,001$) (Tabela 22; Anexo, Gráfico 3) e tumores medindo até 4,0 cm ($P = 0,010$) (Tabela 22; Anexo, Gráfico 4). As curvas de sobrevida livre de evento também mostraram que os pacientes com idade maior ou igual a 45 anos apresentaram um pior prognóstico em relação a pacientes mais novos (Tabela 22; $P = 0,003$; Anexo, Gráfico 5).

Para os carcinomas papilíferos clássico e variante folicular, houve diferença estatisticamente significativa nas curvas de sobrevida livre de evento entre os pacientes com tumor multicêntrico em relação aqueles com um único foco tumoral (Tabela 22; *P* = 0,039; Anexo, Gráfico 6). As curvas de sobrevida livre de evento revelaram uma diferença estatística marginal entre os pacientes com extensão tumoral extra-tireoideana em relação aqueles com tumor confinado à glândula tireóide (Tabela 22; *P* = 0,056; Anexo, Gráfico 7).

Não houve diferenças estatisticamente significativas nas curvas de sobrevida entre os pacientes com carcinoma de tireóide (papilífero clássico, papilífero variante folicular e carcinoma folicular) que apresentaram expressão imunoistoquímica dos diversos marcadores biomoleculares estudados e em relação àqueles que não apresentaram a expressão dos mesmos marcadores em seus tumores (Tabela 23). A única exceção foi em relação aos pacientes com carcinoma de tireóide cujos tumores expressaram galectina-3: a curva de sobrevida livre de evento revelou que estes pacientes apresentaram um melhor prognóstico em relação àqueles que não expressaram galectina-3 (Tabela 23; *P* = 0,027; Anexo, Gráfico 8).

Em relação à co-expressão de galectina-3 com os demais marcadores, não houve qualquer correlação estatisticamente significativa entre a co-expressão desta proteína com NDRG1, osteonectina, VEGF-A, HIF-1α e a sobrevida livre de evento em 5 anos (60 meses) (Tabelas 24). A duas únicas exceções foram em relação aos pacientes com carcinoma de tireóide cujos tumores co-expressaram VEGF-C e galectina-3 e Flk-1/KDR e galectina-3: as curvas de sobrevida livre de

evento revelaram que estes pacientes apresentaram um melhor prognóstico em relação àqueles que não co-expressaram VEGF-C e galectina-3 (Tabela 24; *P* = 0,035; Anexo, Gráfico 9) e Flk-1/KDR e galectina-3 (Tabela 24; *P* = 0,046; Anexo, Gráfico 10).

Considerando o modelo teórico hierarquizado, os fatores independentes relacionados com o evento (recorrência, óbito) foram: idade maior do que 45 anos (HR = 11,1; *P* = 0,019), expressão imunoistoquímica negativa de galectina-3 (HR = 3,0; *P* = 0,023), tamanho do tumor maior do que 4,0 cm (HR = 5,3; *P* = 0,004) e estádio IV do TNM (HR = 16,9; *P* = 0,009) (Tabela 25). Baseado neste modelo, propusemos um esquema dos fatores de risco relacionados aos possíveis eventos (recorrência, óbito) em pacientes com carcinoma de tireóide, segundo o Gráfico 2.

Tabela 22 – Análise univariada da sobrevida livre de evento para alguns parâmetros individuais em pacientes com carcinoma da tireóide

Variável	Categoria	N	Eventos	Sobrevida livre de evento em 5 anos (%)	*P*
Tipo histológico	Carcinoma papilífero clássico	40	5	85,3	0,003
	Carcinoma papilífero variante folicular	30	2	91,8	
	Carcinoma folicular	30	11	60,0	
Idade	< 45 anos	37	1	97,1	0,003
	≥ 45 anos	63	17	69,6	
Tamanho do tumor	Até 4,0 cm	65	6	88,7	0,010
	> 4,0 cm	31	8	72,4	
TNM	Estádios I, II, III	67	2	96,1	< 0,001
	Estádio IV	21	11	40,5	
AMES	Baixo risco	57	2	95,7	< 0,001
	Alto risco	34	11	65,4	
Multicentricidade	Não	26	0	100,0	0,039
	Sim	44	7	81,3	
Extensão extra-tireoideana	Não	37	1	97,2	0,056
	Sim	33	6	79,9	

Tabela 23 – Análise univariada da sobrevida livre de evento para a expressão imunoistoquímica dos marcadores moleculares (NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α e galectina-3) nos pacientes com carcinoma da tireóide

Marcador	Expressão imunoistoquímica	N	Eventos	Sobrevida livre de evento em 5 anos (%)	*P*
NDRG1	Ausente	62	12	77,3	0,754
	Presente	35	6	81,6	
Osteonectina	Ausente	64	11	80,2	0,577
	Presente	34	7	77,4	
VEGF-A	Ausente	65	12	78,4	0,861
	Presente	34	6	81,6	
VEGF-C	Ausente	67	13	77,2	0,732
	Presente	30	5	82,0	
Flk-1/KDR	Ausente	13	4	67,3	0,178
	Presente	83	14	80,5	
HIF-1α	Ausente	78	16	76,4	0,253
	Presente	20	2	88,7	
Galectina-3	Ausente	35	10	69,7	0,027
	Presente	62	8	84,4	

Tabela 24 – Análise univariada da sobrevida livre de evento para a co-expressão de galectina-3 com as demais proteínas (NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR e HIF-1α) nos pacientes com carcinoma da tireóide

Marcador	Expressão imunoistoquímica	N	Eventos	Sobrevida livre de evento em 5 anos (%)	*P*
NDRG1+galectina-3	Ausente	69	15	75,0	0,177
	Presente	28	3	88,1	
Osteonectina+galectina-3	Ausente	73	15	76,9	0,402
	Presente	24	3	85,6	
VEGF-A+galectina-3	Ausente	74	15	76,9	0,333
	Presente	24	3	86,7	
VEGF-C+galectina-3	Ausente	73	17	73,2	0,035
	Presente	24	1	95,2	
Flk-1/KDR+galectina-3	Ausente	37	10	71,2	0,046
	Presente	60	8	84,0	
HIF-1α+galectina-3	Ausente	81	17	75,9	0,149
	Presente	16	1	92,3	

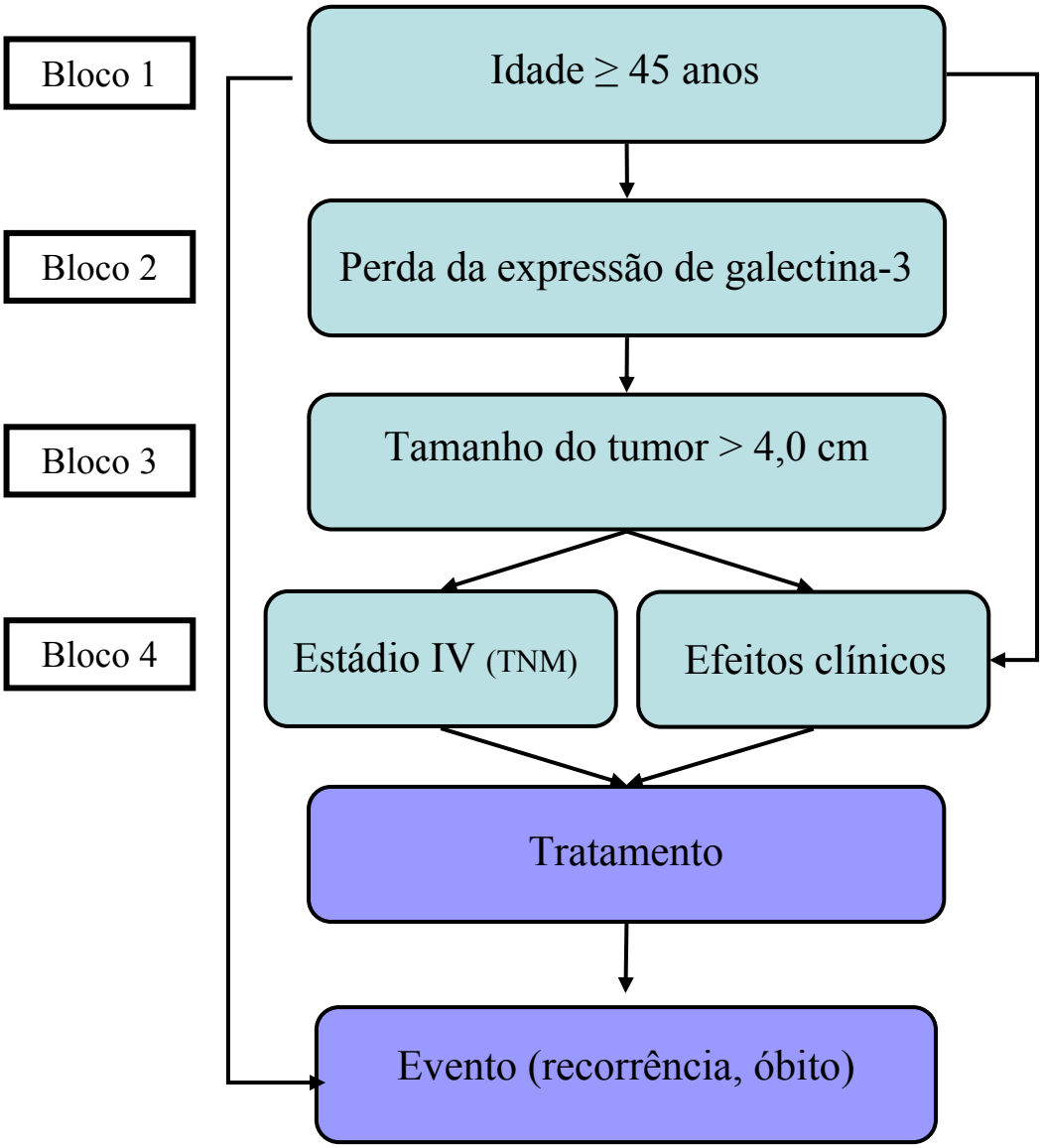


Gráfico 2 - Modelo hierarquizado teórico dos fatores de risco relacionados aos possíveis eventos (recorrência, óbito) em pacientes com carcinoma de tireóide.

Tabela 25 – Fatores de risco independentes relacionados ao evento (recorrência, óbito) em pacientes com carcinoma de tireóide

Bloco de análise	Variável	Categorias	HR[1]	IC 95%[2]	*P*
Bloco 1: Variáveis sociodemográficas	Idade	Até 45 anos	1,0	Referência	0,019
		≥ 45 anos	11,1	1,5 – 83,3	
Bloco 2[3]: Variáveis biomoleculares	Galectina-3	Presente	1,0	Referência	0,023
		Ausente	3,0	1,2 – 7,6	
Bloco 3[4]: Variáveis anátomo-patológicas	Tamanho do tumor	Até 4,0 cm	1,0	Referência	0,004
		> 4,0 cm	5,3	1,7 – 16,3	
Bloco 4[5]: Variáveis de estadiamento e efeitos clínicos	Estadiamento	Estádios I, II e III	1,0	Referência	0,009
		Estádio IV	16,9	2,0 – 142,4	

[1] HR: *Hazard ratio function*.
[2] IC 95%: intervalo de confiança de 95%.
[3] Bloco 2: Ajustado por idade.
[4] Bloco 3: Ajustado por idade e expressão de galectina-3.
[5] Bloco 4: Ajustado por idade, expressão de galectina-3 e tamanho do tumor.

5. DISCUSSÃO

Com a finalidade de estudar a expressão de proteínas que poderiam estar associadas à angiogênese em lesões da tireóide, analisamos a expressão imunoistoquímica de NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α e galectina-3 num TMA constituído por tireóide normal, bócio, adenoma folicular, carcinoma papilífero (clássico e variante folicular), carcinoma folicular e metástases de carcinoma papilífero e folicular da tireóide.

NDRG1 é uma proteína de distribuição ubíqua cuja expressão é induzida por uma variedade de estímulos fisiológicos e patológicos, incluindo fatores que induzem diferenciação celular, exposição a metais pesados, hipóxia, dano ao DNA e vários tipos de tumores (Cangul, 2004; Ellen et al., 2008).

Neste estudo, a expressão imunoistoquímica de NDRG1 foi observada predominantemente no citoplasma das células epiteliais (foliculares) e, de um modo geral, observamos um aumento da expressão desta proteína nas neoplasias da tireóide quanto comparada ao bócio. Em tireóide normal, a expressão imunoistoquímica de NDRG1 foi fraca ou ausente. Lachat et al. (2002) estudaram a expressão de NDRG1 numa grande variedade de tecidos humanos e, na glândula tireóide normal, as células foliculares apresentaram expressão focal e granular para esta proteína. Cangul (2004) observou um aumento da expressão imunoistoquímica de NDRG1 em vários tipos de carcinoma (mama, rins, pulmões, próstata), no melanoma e no glioblastoma

multiforme em comparação aos tecidos normais correspondentes. No cólon, Wang et al. (2004) observaram um aumento da expressão de NDRG1 em carcinomas quando comparado aos adenomas e à mucosa colônica normal. Reis et al. (2005) detectaram um aumento de NDRG1 em 50% dos tumores da cavidade oral quando comparado ao tecido normal. Em contraste, Bandyopadhyay et al. (2004) observaram uma redução da expressão imunoistoquímica de NDRG1 no carcinoma mamário, mas uma forte expressão nos lóbulos mamários normais.

O papel da proteína NDRG1 na progressão tumoral e formação de metástases ainda é controverso. Vários estudos mostram que a diminuição da expressão de NDRG1 está associada a um estadiamento tumoral mais avançado e a uma menor sobrevida. A diminuição da expressão imunoistoquímica de NDRG1 no carcinoma de próstata associou-se ao grau de Gleason > 7 e a tumores pouco diferenciados. Segundo os autores, 70% dos tumores prostáticos localizados expressavam NDRG1, enquanto que apenas 25% dos tumores metastáticos foram positivos para NDRG1 (Bandyopadhyay et al., 2003). Observou-se no câncer de mama que 60% das pacientes com metástases ósseas apresentavam uma diminuição da expressão imunoistoquímica de NDRG1 e aquelas pacientes cujos tumores não expressavam esta proteína apresentaram uma menor sobrevida (Bandyopadhyay et al., 2004). No carcinoma de células escamosas do esôfago, a diminuição de NDRG1 se associou a tumores mais invasivos e a um estadiamento TNM mais avançado. Além disso, a taxa de sobrevida para os pacientes que apresentavam tumores com baixa expressão de NDRG1 foi menor em relação aqueles com alta expressão desta proteína (Ando et al., 2006). Grau histológico menos diferenciado, estadiamento patológico mais

avançado e menor sobrevida global se correlacionaram com a diminuição da expressão imunoistoquímica de NDRG1 no adenocarcinoma ductal do pâncreas (Maruyama et al., 2006).

Ao contrário destes estudos, nós observamos que o aumento da expressão imunoistoquímica de NDRG1 em pacientes com carcinoma de tireóide (carcinoma papilífero clássico, carcinoma papilífero variante folicular e carcinoma folicular) se correlacionou com estadiamento TNM mais avançado (estadios III e IV) e alto risco pelo índice prognóstico de *AMES*. Para os carcinomas papilíferos clássico e variante folicular também houve uma associação entre a expressão de NDRG1 e a presença de extensão tumoral extra-tireoideana. Estes achados sugerem um papel para NDRG1 na progressão tumoral em tireóide. No entanto, não se observou qualquer diferença de sobrevida entre os pacientes com tumores que expressavam NDRG1 daqueles que eram negativos para esta proteína. Neste sentido, estudos mais detalhados são necessários para se delinear melhor o papel de NDRG1 na tumorigênese e progressão tumoral das neoplasias da tireóide, incluindo a investigação desta proteína em carcinomas pouco diferenciados ou anaplásicos da tireóide.

Outros estudos também mostraram que o aumento da expressão de NDRG1 está associado com tumores mais agressivos e de pior prognóstico. Chua et al. (2007) observaram que o aumento da expressão de NDRG1 no carcinoma hepatocelular encontrava-se associado ao estadiamento tumoral mais avançado (estadios III e IV), tumores maiores e tumores pouco diferenciados segundo o grau histológico de

Edmondson-Steiner. Neste estudo, os pacientes com tumores que apresentavam aumento de NDRG1 exibiram uma menor taxa de sobrevida global em relação aqueles com baixo nível de NDRG1. No adenocarcinoma de colo uterino, o aumento da expressão imunoistoquímica de NDRG1 exibiu correlação com maior diâmetro tumoral, maior profundidade de invasão estromal, presença de invasão angiolinfática, maior número de metástases em linfonodos, tumores pouco ou moderadamente diferenciados e pior prognóstico, como demonstrado pela menor taxa de sobrevida livre de progressão de doença e de sobrevida global (Nishio et al., 2008).

Alguns estudos demonstraram que NDRG1 seria um gene "supressor de metástases". Guan et al. (2000) observaram uma menor expressão de NDRG1 em linhagens celulares derivadas de metástases de câncer de colón em comparação a linhagens derivadas de câncer colônico primário. Ao induzir a expressão de NDRG1 nas linhagens celulares metastáticas, os autores observaram que as células neoplásicas expressaram marcadores relacionados à diferenciação celular do epitélio colônico, tais como CEA e E-caderina. Estudos "in vivo" mostraram que linhagens celulares de câncer colônico e de câncer de próstata transfectadas com NDRG1 e injetadas em camundongos produziram um menor número de metástases hepáticas e pulmonares, respectivamente, quando comparadas às linhagens controles (Guan et al., 2000; Bandyopadhyay et al., 2003). Entretanto, em amostras de carcinoma colorretal humano, Wang et al. (2004) demonstraram que havia um aumento da expressão protéica de NDRG1 no tumor primário que apresentava metástases em linfonodos em relação aquele que não apresentava tais metástases (carcinomas não metastáticos) e, portanto, quanto maior a expressão de NDRG1, maior seria a

probabilidade de metástases linfonodais. Neste contexto, segundo os autores, NDRG1 seria um gene envolvido na progressão tumoral e na promoção de metástases do carcinoma colorretal. Em nosso estudo, 41,7% das metástases de carcinoma da tireóide apresentaram expressão imunoistoquímica de NDRG1, sendo que as duas únicas metástases de carcinoma folicular não expressaram esta proteína.

Piquemal et al. (1999) demonstraram que linhagens celulares (linhagem celular mielomonocítica humana e linhagem celular miogênica de camundongo) tratadas com ácido retinóico e/ou vitamina D exibiram uma inibição da proliferação celular e um aumento da expressão de NDRG1. Guan et al. (2000) observaram que linhagens de câncer de cólon tratadas com agonistas do fator PPARγ (*peroxisome proliferator-activated receptor-γ*) apresentaram um aumento da expressão de NDRG1. PPARγ é um membro da família de receptores hormonais nucleares que atua como um fator de transcrição envolvido com o metabolismo da glicose, o desenvolvimento do tecido adiposo e a inibição da proliferação celular em diferentes linhagens de tumores, incluindo vários tipos de carcinomas (Fajas et al., 2001). Guan et al. (2000) sugeriram, então, que NDRG1 seria um alvo da via de diferenciação celular induzida pelo fator PPARγ.

Em carcinomas foliculares da tireóide, Kroll et al. (2000) detectaram a ocorrência da translocação t(2;3)(q13;p25) que resultava na fusão dos genes PAX8 (*paired-box gene 8*) e PPARγ. Segundo os autores, o rearranjo PAX8-PPARγ levaria à formação de uma oncoproteína que possivelmente promoveria a tumorigênese em tireóide ao inibir a atividade transcricional da forma selvagem do fator PPARγ.

Estudos posteriores também revelaram a presença do rearranjo em adenomas foliculares da tireóide (Marques et al., 2002; Lacroix et al., 2004). Embora não tenha sido objeto de nosso estudo, é provável que parte dos adenomas e carcinomas foliculares da tireóide que não expressaram NDRG1 apresentem rearranjo PAX8-PPARγ. É tentador especular se tal rearranjo poderia levar à perda da expressão de NDRG1 nestes tumores. Além disso, à semelhança do estudo de Guan et al. (2000), seria interessante observar se linhagens celulares de tumores pouco diferenciados da tireóide poderiam expressar NDRG1 e sofrer diferenciação uma vez que fossem tratadas com agonistas do fator PPARγ.

A osteonectina é uma proteína não estrutural da matriz extracelular com propriedades anti-adesivas que facilitam a migração e proliferação celular (Bradshaw, Sage, 2001). Fibroblastos envolvidos em processos de reparação e remodelação tecidual exibem aumento da expressão de osteonectina e níveis aumentados desta proteína têm sido detectados em células neoplásicas e estromais de vários tipos de tumores humanos (Clark, Sage 2008; Podhajcer et al., 2008).

A expressão imunoistoquímica de osteonectina foi maior nos carcinomas de tireóide em relação aos casos de adenoma folicular e bócio, sendo negativa em todos os fragmentos de tireóide normal. Encontramos apenas um estudo na literatura a respeito da expressão de osteonectina em tumores da tireóide: Takano et al. (2002) detectaram um aumento dos níveis de RNA mensageiro de osteonectina em amostras teciduais de neoplasias da tireóide (adenoma folicular, carcinoma folicular,

carcinoma papilífero e carcinoma anaplásico ou indiferenciado da tireóide) quando comparadas com amostras de tecido tireoideano normal.

Em nosso estudo, o padrão de expressão imunoistoquímica da osteonectina foi citoplasmático e observado apenas nas células epiteliais (foliculares) das diferentes lesões de tireóide. Não observamos expressão desta proteína em células endoteliais ou fibroblastos do estroma adjacente às células epiteliais. Estudos mostram que a origem celular da osteonectina é variável nos diferentes tipos de tumores humanos. A expressão imunoistoquímica de osteonectina em fibroblastos do estroma tumoral foi observada por Porter et al. (1995) em várias neoplasias epiteliais, incluindo aquelas em que as células neoplásicas eram negativas para esta proteína. Segundo os autores, é provável que a secreção de osteonectina por fibroblastos do estroma tumoral exerça uma regulação parácrina sobre as células neoplásicas, alterando seu comportamento e promovendo a progressão tumoral (Porter et al., 1995). No carcinoma gástrico, Wang et al. (2004) observaram um aumento da expressão imunoistoquímica de osteonectina em relação à mucosa normal, sendo que a imunocoloração para esta proteína ocorreu predominantemente nas células neoplásicas e menos intensamente nos fibroblastos do estroma peritumoral. Por outro lado, no câncer de esôfago, Xue et al. (2006) verificaram que a expressão imunoistoquímica de osteonectina ocorria predominantemente nos fibroblastos do estroma peritumoral e, quando presentes nas células epiteliais neoplásicas, somente naquelas situadas junto à interface tumor-estroma. Predomínio da expressão de osteonectina em fibroblastos do estroma tumoral em relação às células neoplásicas também foi observado em tumores de ovário (Yiu et al., 2001), no câncer pulmonar

de não-pequenas células (Koukourakis et al., 2003) e no adenocarcinoma ductal do pâncreas (Infante et al., 2007).

A ausência de expressão imunoistoquímica de osteonectina em fibroblastos em nossas amostras de tireóide poderia ser explicada por dois fatores. Em primeiro lugar, o estroma tumoral foi pouco representado nestas amostras, pois, durante a construção do TMA, foram selecionadas áreas que representassem o máximo possível o componente epitelial normal, hiperplásico ou neoplásico de acordo com o tipo de lesão a ser estudada. Desse modo, deixamos de representar tanto a cápsula fibrosa dos adenomas e carcinomas foliculares quanto o estroma desmoplásico que, muitas vezes, se encontra associado ao carcinoma papilífero da tireóide. Um segundo fator pode ter sido a escolha do anticorpo anti-osteonectina. Yiu et al. (2001) mostraram que o uso de um anticorpo monoclonal anti-osteonectina (AON-5031 na concentração de 1 μg/mL) revelou uma maior intensidade de imunocoloração em fibroblastos situados abaixo do epitélio superficial do ovário normal e em fibroblastos de amostras teciduais de câncer de ovário em relação à imunocoloração com o uso de um anticorpo policlonal (LF-54 na diluição de 1:200). Nós utilizamos um anticorpo policlonal, AB1858, na diluição 1:1000, o que poderia, portanto, explicar a ausência de imunocoloração em fibroblastos.

Vários estudos mostram que há um aumento de osteonectina em tumores malignos quando comparado ao tecido normal correspondente e que os níveis desta proteína se correlacionam com um pior prognóstico (Clark, Sage 2008; Podhajcer et al., 2008). No carcinoma gástrico, Wang et al. (2004) observaram que altos níveis de

osteonectina detectados por RT-PCR estavam associados a tumores mais avançados quanto ao grau de invasão da parede gástrica e quanto à presença de invasão linfática e perineural, bem como associados a tumores com metástases em linfonodos e estadios patológicos mais avançados. Menor sobrevida também foi observada em pacientes cujos tumores apresentavam altos níveis de osteonectina (Wang et al., 2004). Estudos que utilizaram a técnica imunoistoquímica mostraram que a expressão de osteonectina em fibroblastos do estroma tumoral conferia uma menor sobrevida em pacientes com câncer pulmonar de não pequenas células (Koukourakis et al., 2003), câncer de esôfago (Xue et al., 2006) e adenocarcinoma ductal do pâncreas (Infante et al., 2007). Já no ovário, Yiu et al. (2001) observaram uma diminuição da expressão imunoistoquímica de osteonectina em carcinomas ovarianos em relação a neoplasias epiteliais ovarianas benignas e ao tecido ovariano normal.

No presente estudo, a expressão imunoistoquímica de osteonectina nos carcinomas de tireóide (carcinoma papilífero clássico, carcinoma papilífero variante folicular e carcinoma folicular) apresentou associação estatisticamente significativa com alto risco pelo índice prognóstico de *AMES*. As demais características clínico-patológicas analisadas (idade, estadiamento TNM, multicentricidade e extensão tumoral extra-tireoideana), bem como a análise da sobrevida livre de evento, não apresentaram qualquer correlação com a expressão de osteonectina nos pacientes com carcinoma de tireóide. Takano et al. (2002) observaram um aumento dos níveis de RNA mensageiro numa amostra tecidual de carcinoma anaplásico (indiferenciado) em relação a amostras de adenoma folicular e carcinomas bem diferenciados (papilífero e folicular) da tireóide; o que poderia sugerir que a osteonectina estaria

relacionada com a progressão tumoral em neoplasias da tireóide. No entanto, os resultados deste estudo não foram conclusivos neste sentido, pois, ao analisar uma linhagem celular de carcinoma anaplásico da tireóide, os autores detectaram níveis de osteonectina similares aqueles das amostras teciduais de adenoma folicular e carcinomas bem diferenciados (papilífero e folicular) da tireóide. Os autores sugeriram, então, que o aumento observado na amostra tecidual de carcinoma anaplásico resultaria da superexpressão de osteonectina não das células neoplásicas (epiteliais), mas dos fibroblastos e células endoteliais do estroma tumoral (Takano et al., 2002).

Os fatores da família do VEGF compreendem várias proteínas que estimulam a proliferação e diferenciação de células endoteliais de vasos sanguíneos e linfáticos. VEGF-A é um dos principais fatores envolvidos na angiogênese relacionada a processos fisiológicos e patológicos; enquanto que VEGF-C desempenha um importante papel na linfangiogênese. Níveis elevados de ambos os fatores têm sido observados em vários tumores humanos (Hicklin, Ellis, 2005; Kowanetz, Ferrara, 2006).

Tanto a expressão imunoistoquímica de VEGF-A, quanto a de VEGF-C, foram mais freqüentes nas neoplasias de tireóide em relação ao bócio e tireóide normal. Nossos dados se assemelham aos observados em estudos que analisaram a expressão de VEGF-A e/ou VEGF-C em linhagens celulares e amostras teciduais de lesões benignas e malignas da tireóide. Níveis elevados de RNA mensageiro de VEGF-A foram detectados em linhagens celulares de diferentes tipos de câncer de

tireóide em relação ao tecido tireoideano normal (Soh et al., 1997). Klein et al. (1999) observaram imunocoloração moderada para VEGF-A na tireóide normal, porém esta foi significativamente menor quando comparada a casos de tireoidite e carcinomas papilíferos e foliculares da tireóide. Bunone et al. (1999) e de la Torre et al. (2006) mostraram um aumento dos níveis de RNA mensageiro e da expressão protéica de VEGF-A e VEGF-C em carcinomas da tireóide quando comparados à tireóide normal e lesões tireoideanas benignas (hiperplasias e adenoma folicular). Níveis elevados de VEGF-C foram detectados por RT-PCR e *Western blot* em amostras teciduais de carcinoma papilífero da tireóide em comparação ao tecido tireoideano normal (Hung et al., 2003; Yu et al., 2005).

Além dos tumores da tireóide, várias outras neoplasias humanas exibem um aumento de expressão dos fatores da família do VEGF, os quais freqüentemente se associam a um comportamento tumoral mais agressivo. Cascinu et al. (2000) mostraram que a imunocoloração positiva para VEGF-A foi um fator preditivo de recorrência tumoral em pacientes com câncer de cólon em estádio II ($pT_3N_0M_0$). No câncer de endométrio, a alta expressão imunoistoquímica de VEGF-A se associou significativamente com estadiamento tumoral mais avançado e uma menor sobrevida (Kamat et al., 2007). O-charoenrat et al. (2001) detectaram um aumento dos níveis de RNA mensageiro e da expressão protéica de VEGF-A (isoformas 121, 165, 189 e 206) e de VEGF-C em linhagens celulares e amostras teciduais de carcinomas epidermóides da região da cabeça e pescoço. Os autores também notaram que havia uma correlação estatisticamente significativa entre a presença de metástases em linfonodos cervicais e a expressão aumentada de VEGF-C e das isoformas de VEGF-

A (O-charoenrat et al., 2001). Existe uma forte associação entre a expressão de VEGF-C e invasão linfática e/ou presença de metástases em linfonodos em diferentes tipos de câncer humano, incluindo tumores do estômago (Yonemura et al., 1999), cólon (Akagi et al., 2000), colo uterino (Hashimoto et al., 2001) e ovário (Nishida et al., 2004).

Num estudo de revisão sobre o papel dos fatores da família do VEGF em processos fisiológicos e patológicos da tireóide, Klein et al. (2007) concluíram que altos níveis de VEGF em carcinomas tireoideanos sugerem uma maior agressividade tumoral e a pesquisa deste fator poderia ser utilizada como um marcador prognóstico nestes tumores. Nós mostramos, neste estudo, que tanto a expressão imunoistoquímica de VEGF-A, quanto a de VEGF-C, se correlacionaram significativamente com estadiamento TNM mais avançado (estadios III e IV) e alto risco pelo índice prognóstico de *AMES* nos carcinomas de tireóide. A expressão de ambas as proteínas também apresentou uma associação estatisticamente significativa com extensão tumoral extra-tireoideana nos carcinomas papilíferos (clássico e variante folicular) da tireóide. Bunone et al. (1999) observaram uma forte associação entre os carcinomas da tireóide com altos níveis de VEGF-A e maior tamanho tumoral (T4), porém Klein et al. (2001) não constataram uma correlação entre a imunocoloração para VEGF-A e o tamanho do tumor em carcinomas papilíferos de tireóide. Em outro estudo, a expressão imunoistoquímica de VEGF-A e VEGF-C não se associou à presença de doença multifocal, maior tamanho tumoral e metástases para linfonodos em casos de carcinoma papilífero e folicular da tireóide (de la Torre et al., 2006).

Observamos, ainda, uma associação estatisticamente significativa da expressão imunoistoquímica de VEGF-A entre tumores primários (carcinomas papilíferos clássico e variante folicular) e suas respectivas metástases em linfonodos. Segundo Klein et al. (2001), em carcinomas papilíferos de tireóide, a positividade imunoistoquímica para VEGF-A foi um fator de risco independente para doença metastática em linfonodos. Por outro lado, Soh et al. (1997) não detectaram diferença dos níveis de RNA mensageiro de VEGF-A entre linhagens celulares de carcinomas primários da tireóide e linhagens derivadas de metástases linfonodais e pulmonares de carcinomas tireoideanos. Em relação ao fator VEGF-C, nossa análise não revelou uma associação desta proteína entre carcinomas primários da tireóide e suas metástases linfonodais correspondentes. Hung et al. (2003) detectaram níveis semelhantes de RNA mensageiro de VEGF-C em carcinomas papilíferos com e sem metástases para linfonodos e, além disso, a expressão deste fator nas metástases foi significativamente menor em relação aos tumores primários. Em contraste, Bunone et al. (1999) observaram uma superexpressão de VEGF-C em carcinomas tireoideanos que apresentavam metástases em linfonodos quando comparados aos tumores não metastáticos. Já Yu et al. (2005) demonstraram uma associação significativa entre a expressão elevada de VEGF-C em carcinomas papilíferos da tireóide e a ocorrência de invasão angiolinfática intra-tumoral e metástases em linfonodos.

A proteína Flk-1/KDR (ou VEGFR-2) é um receptor tirosina-quinase que se encontra expresso na maioria das células endoteliais, sendo o principal mediador da

ação angiogênica de VEGF-A (Ferrara, 2001; Hicklin, Ellis 2005). Assim como seus ligantes (VEGF-A e VEGF-C), um aumento da expressão de Flk-1/KDR também tem sido observado em determinados tipos de tumores humanos (Nishida et al., 2004; Giatromanolaki et al., 2006).

Em oposição aos demais marcadores utilizados neste estudo, a imunocoloração para Flk-1/KDR foi predominantemente positiva nas várias lesões benignas e malignas da tireóide, embora mais frequente nos carcinomas em relação à tireóide normal, bócio e adenoma folicular. Níveis elevados de RNA mensageiro de Flk-1/KDR foram detectados em tumores da tireóide em relação ao tecido tireoideano normal, incluindo 50% dos casos de carcinoma folicular, 76% dos casos de carcinoma papilífero e 92% das metástases de carcinoma papilífero (Bunone et al., 1999). Segundo Vieira et al. (2005), a expressão imunoistoquímica do receptor Flk-1/KDR foi observada em 68% e 56% dos casos de carcinoma papilífero e carcinoma folicular da tireóide, respectivamente. Os autores também descreveram que, nos casos positivos, a imunocoloração foi difusa, ocorrendo no citoplasma e na membrana das células neoplásicas (Vieira et al., 2005). Em contraste, Kung et al. (2006) observaram imunocoloração positiva para Flk-1/KDR em até 25% das células neoplásicas somente em 5 de 12 casos de carcinoma papilífero, porém em nenhum caso de bócio, adenoma e carcinoma folicular da tireóide.

A capacidade das células neoplásicas de secretar os vários membros da família do VEGF e de expressar seus respectivos receptores contribui para o crescimento tumoral por mecanismos autócrinos e parácrinos. Vários estudos

detectaram expressão concomitante de VEGF-A e um ou mais de seus receptores (Flt-1, Flk-1/KDR) em diferentes tumores humanos, incluindo câncer de mama (Kranz et al., 1999), melanoma (Straume, Akslen, 2001), carcinoma do ovário (Nishida et al., 2004), adenocarcinoma de próstata (Pallares et al., 2006) e câncer do endométrio (Giatromanolaki et al., 2006). Neste estudo, observamos uma associação estatisticamente significativa entre a expressão imunoistoquímica de Flk-1/KDR e dois de seus ligantes, VEGF-A e VEGF-C. Nossos dados são corroborados por Bunone et al. (1999) que detectaram a presença de VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, Flt-4 em vários tipos de tumor da tireóide e por Vieira et al. (2005) que mostraram co-expressão imunoistoquímica de VEGF-A e seus receptores (Flt-1 e Flk-1/KDR) em 50% dos carcinomas papilíferos e 39% dos carcinomas foliculares da tireóide. A presença de regulação autócrina por VEGF-A foi demonstrada numa linhagem celular derivada de um carcinoma papilífero de tireóide, cujas células expressavam VEGF-A e seus receptores. Ao serem estimuladas com VEGF-A, as células apresentaram um aumento da fosforilação de Flk-1/KDR e, ao realizar o bloqueio de VEGF-A ou de seus receptores, ocorreu uma diminuição da viabilidade celular e um aumento da população de células em apoptose, sugerindo que a interação autócrina entre VEGF-A e seus receptores seria um importante mecanismo associado à sobrevivência celular desta linhagem tumoral (Vieira et al., 2005).

Em comparação aos demais marcadores investigados, a proteína Flk-1/KDR foi aquela que apresentou maior sensibilidade para o diagnóstico de malignidade, com uma taxa de 88,2%, porém com uma menor especificidade (34,9%). De fato, a expressão de Flk-1/KDR foi positiva na maioria dos casos de bócio e adenoma

folicular, além de ser detectada em quase um terço dos fragmentos de tireóide normal analisados. A positividade imunoistoquímica da proteína Flk-1/KDR nas várias lesões benignas e malignas da tireóide indica uma expressão constitutiva desta proteína, que, no entanto, não reflete a sua atividade funcional. Em amostras teciduais de câncer de mama, Kranz et al. (1999) utilizaram anticorpos monoclonais direcionados contra resíduos específicos de fosfotirosina da proteína Flk-1/KDR, detectando, deste modo, a expressão desta proteína na sua forma ativa, fosforilada. Stewart et al. (2003) observaram a expressão imunoistoquímica de Flk-1/KDR na sua forma ativa (fosforilada) em vários tipos celulares (células epiteliais, endoteliais, macrófagos e fibroblastos) de diferentes tipos de tumores, incluindo melanoma, linfomas e carcinomas do cólon, mama e pulmão. A proteína fosforilada apresentava uma distribuição heterogênea e, ao contrário da sua forma não fosforilada, ela foi detectada tanto no citoplasma, quanto no núcleo das células imunocoradas (Stewart et al., 2003). Mais recentemente, a expressão imunoistoquímica do receptor Flk-1/KDR ativado também foi demonstrada no núcleo e citoplasmas das células epiteliais e endoteliais do endométrio normal e em células neoplásicas e vasos peritumorais do carcinoma endometrial (Giatromanolaki et al., 2006).

Alguns estudos mostraram que os tumores humanos que exibiam aumento da expressão de Flk-1/KDR, isoladamente ou em associação a um de seus ligantes, se associavam a um comportamento clínico mais agressivo. Os pacientes com leucemia linfocítica crônica que apresentaram altos níveis da proteína Flk-1/KDR (detectados por *Western blot* em células linfóides do sangue periférico) exibiram uma menor sobrevida em relação aos pacientes com baixos níveis desta proteína (Ferrajoli et al.,

2001). O aumento da expressão imunoistoquímica de Flk-1/KDR (e VEGF-C) em pacientes com carcinoma de ovário foi um fator de risco independente associado à disseminação metastática para linfonodos e cavidade peritoneal e se correlacionou com uma menor sobrevida em 5 anos (Nishida et al., 2004). A partir do tecido prostático normal, Pallares et al. (2006) observaram um aumento progressivo da imunocoloração para VEGF-A e Flk-1/KDR em lesões pré-neoplásicas (neoplasia intra-epitelial prostática de alto grau) e no adenocarcinoma de próstata, sugerindo que tais fatores estariam relacionados à progressão tumoral no câncer de próstata. Giatromanolaki et al. (2006) detectaram uma menor sobrevida global em pacientes com câncer de endométrio cujos tumores exibiam alta expressão imunoistoquímica da proteína Flk-1/KDR fosforilada quando comparados aqueles com baixa expressão desta proteína.

Straume e Akslen (2001) não observaram uma correlação entre a sobrevida e a imunocoloração para VEGF-A e Flk-1/KDR em pacientes com melanoma em fase de crescimento vertical. Em nosso estudo, também não observamos uma correlação entre a expressão imunoistoquímica de Flk-1/KDR com sobrevida livre de evento nos pacientes com carcinoma de tireóide. Além disso, não houve nenhuma associação estatisticamente significativa entre a expressão desta proteína e as características clínico-patológicas analisadas neste grupo de pacientes. No entanto, outros estudos que analisaram o receptor Flk-1/KDR em tireóide mostraram uma associação entre a expressão desta proteína com tumores mais avançados e metastáticos. Assim, Bunone et al. (1999) observaram uma tendência entre altos níveis de Flk-1/KDR e tumores tireoideanos maiores (T4), enquanto que Vieira et al. (2005)

mostraram que a co-expressão de VEGF-A e seus receptores (Flt-1 e Flk-1/KDR) em carcinomas papilíferos se associou à presença de metástases linfonodais.

HIF-1α é um fator de transcrição que, em condições de hipóxia, é translocado para o núcleo onde forma um heterodímero com a subunidade HIF-1β e induz a expressão de vários genes, dentre os quais aqueles relacionadas à angiogênese e sobrevivência celular (Semenza, 2003; Hirota, Semenza, 2006). HIF-1α tem um papel central na regulação da expansão do leito vascular em tecidos nos quais há uma maior demanda por O_2, promovendo a expressão de VEGF, um dos principais mediadores da angiogênese (Carmeliet, 2003; Semenza, 2007). A expressão de HIF-1α encontra-se aumentada em vários tumores humanos e, por vezes, se correlaciona com um aumento da expressão de VEGF e da angiogênese tumoral (Zhong et al., 1999; Talks et al., 2000; Mabjeesh, Amir, 2007).

A expressão imunoistoquímica de HIF-1α foi maior nas neoplasias tireoideanas em relação ao bócio e tireóide normal. Zhong et al. (1999) observaram que a expressão imunoistoquímica de HIF-1α em vários tecidos humanos normais foi predominantemente negativa, incluindo 10 casos de tecido tireoideano normal. Por outro lado, superexpressão de HIF-1α foi observada em 53% dos tumores malignos primários, incluindo vários tipos de carcinomas, além de tumores cerebrais e casos de mesotelioma e melanoma. Os dois casos de carcinoma da tireóide analisados foram negativos quanto à expressão de HIF-1α (Zhong et al., 1999). Em outro estudo, a expressão imunoistoquímica de HIF-1α (e HIF-2α) foi desprezível na grande maioria dos tecidos humanos não patológicos, incluindo a

glândula tireóide normal (Talks et al., 2000). Utilizando a metodologia de *cDNA microarray*, Wasenius et al. (2003) detectaram uma superexpressão do gene *HIF-1* em 72% dos casos de carcinoma papilífero de tireóide em comparação ao tecido tireoideano normal.

Vários estudos mostraram que o padrão de imunocoloração de HIF-1 observado em tumores é predominantemente nuclear (Zhong et al., 1999; Talks et al., 2000; Birner et al., 2000; Aebersold et al., 2001; Bos et al., 2003). Coloração citoplasmática leve a moderada também tem sido detectada em carcinomas do cólon, mama, pâncreas, próstata, fígado, rim e epitélio transicional do trato urinário superior (Zhong et al., 1999; Talks et al., 2000; Nakanishi et al., 2005). No câncer de cólon, Kuwai et al. (2003) consideraram positivos somente os casos que apresentaram expressão nuclear (9,6% dos casos) ou forte expressão citoplasmática (51,2% dos casos) para HIF-1α. Em nosso estudo, a imunocoloração revelou a presença da proteína HIF-1α no citoplasma das células foliculares nas diferentes lesões tireoideanas analisadas, sendo a expressão nuclear extremamente discreta ou ausente. Dales et al. (2005) detectaram a expressão imunoistoquímica de HIF-1α no citoplasma e no núcleo das células neoplásicas em amostras teciduais congeladas de câncer de mama. As diferenças de padrão de imunocoloração da proteína HIF-1α poderiam ser explicadas, pelo menos em parte, pelo uso de diferentes anticorpos anti-HIF-1α: assim como Dales et al. (2005), utilizamos um anticorpo policlonal, enquanto que a maioria dos estudos que detectaram um predomínio da expressão nuclear de HIF-1α utilizaram anticorpos monoclonais (Zhong et al., 1999; Talks et al., 2000; Birner et al., 2000; Aebersold et al., 2001; Bos et al., 2003).

Geralmente, a distribuição imunoistoquímica de HIF-1 em tumores é heterogênea. Nota-se um maior número de células neoplásicas positivas para HIF-1α no fronte de invasão tumoral e em células viáveis situadas na periferia de áreas necróticas (Zhong et al., 1999; Talks et al., 2000; Aebersold et al., 2001; Kuwai et al., 2003; Bos et al., 2003). Não observamos, neste estudo, um padrão de distribuição específico quanto à expressão intra-tumoral de HIF-1α nas neoplasias de tireóide, pois os fragmentos teciduais contidos no TMA de tireóide correspondiam a áreas tumorais viáveis, não necróticas e não relacionadas com a transição tumor-estroma. Scarpino et al. (2004) descreveram alterações histológicas sugestivas de hipóxia em casos de carcinoma papilífero de tireóide, incluindo áreas de necrose coagulativa, presença de corpos psammomatosos, fibrose proeminente, alterações císticas e hemorragia intra-tumoral. Em nosso estudo, tais achados histológicos não foram observados nos fragmentos teciduais dos carcinomas de tireóide. Os carcinomas pouco diferenciados ou anaplásicos (indiferenciados) da tireóide freqüentemente exibem áreas de necrose tumoral e, embora não tenham sido objeto deste estudo, é provável que tais tumores apresentem níveis elevados de HIF-1α nas células neoplásicas adjacentes a áreas de necrose.

Por outro lado, a distribuição intra-tumoral de HIF-1α costuma ser homogênea ou difusa naquelas neoplasias em que alterações genéticas como a perda de genes supressores tumorais (tais como *p53* ou *VHL*) resultam numa menor degradação proteassômica e maior estabilidade desta proteína (Semenza, 2003). Wiesener et al. (2001) detectaram mutações somáticas do gene *VHL* em 44% dos carcinomas renais de células claras. Tais mutações foram encontradas apenas nos

carcinomas que apresentavam aumento dos níveis da proteína HIF-1α detectados pela técnica de *imunoblotting* e, em fragmentos teciduais destes tumores, a expressão imunoistoquímica de HIF-1α foi difusa, ocorrendo tanto em células neoplásicas adjacentes a áreas de necrose, quanto em regiões bem vascularizadas do tumor. Zagzag et al. (2000) estudaram a expressão imunoistoquímica de HIF-1α em tumores cerebrais e detectaram, no glioblastoma multiforme, uma forte expressão desta proteína em células neoplásicas situadas ao redor de áreas necróticas ("células em paliçada"). Já no hemangioblastoma, um tumor cerebral ricamente vascularizado (alguns dos quais com mutações do gene *VHL*), os autores observaram expressão intra-tumoral difusa de HIF-1α; sugerindo que diferentes mecanismos estariam envolvidos com a ativação de HIF-1α nestes tumores.

A associação entre a expressão imunoistoquímica de HIF-1α e a presença de VEGF em tumores foi comprovada em diferentes estudos. Por hibridização *in situ*, Talks et al. (2000) detectaram, em carcinomas mamários, a presença de RNA mensageiro de VEGF em células neoplásicas próximas a áreas de necrose ou situadas nas margens tumorais, as quais coincidiram exatamente com as áreas tumorais que apresentaram expressão imunoistoquímica de HIF-1α. Wiesener et al. (2001) detectaram altos níveis do RNA mensageiro de VEGF em 88% dos carcinomas renais de células claras que apresentavam superexpressão da proteína HIF-1 α, contra 38% dos carcinomas do mesmo tipo histológico que eram negativos para HIF-1α. Kuwai et al. (2003) observaram que no carcinoma colorretal a positividade imunoistoquímica para VEGF foi significativamente maior nos casos com alta expressão de HIF-1α. De modo similar, no câncer de mama, altos níveis da proteína

HIF-1α apresentaram associação estatisticamente significativa com forte imunocoloração para VEGF (Bos et al., 2003). Neste estudo, também demonstramos uma associação estatisticamente significativa entre a expressão de HIF-1α e a imunocoloração positiva para VEGF-A e VEGF-C nas lesões benignas e malignas da tireóide.

Na maioria dos tumores humanos há uma associação entre a superexpressão de HIF-1α e um comportamento clínico mais agressivo. Birner et al. (2000) observaram menor sobrevida global e menor sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de colo uterino que apresentavam forte expressão imunoistoquímica de HIF-1α. Em pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe tratados com radioterapia a expressão imunoistoquímica de HIF-1α se associou com menor sobrevida livre de recidiva local (progressão tumoral e recorrência local após tratamento radioterápico), livre de doença (recidiva local e metástases) e sobrevida global. Neste estudo, HIF-1α foi considerado tanto um fator prognóstico, quanto preditivo de resposta ao tratamento tumoral loco-regional pela radioterapia, independente de outros variáveis como o estadiamento T (tamanho tumoral) e a densidade microvascular intra-tumoral (Aebersold et al., 2001). No carcinoma colorretal, a alta expressão imunoistoquímica de HIF-1α se correlacionou significativamente com maior invasão tumoral (estadio Dukes D), maior invasão de vasos linfáticos e venosos, presença de metástases em linfonodos e uma tendência a menor sobrevida (Kuwai et al., 2003). Dales et al. (2005) estudaram 745 pacientes com câncer de mama e observaram uma menor sobrevida global e um maior risco de metástases ou recorrência tumoral em pacientes cujos tumores apresentavam

superexpressão imunoistoquímica de HIF-1α. A alta expressão de HIF-1α também foi considerada um fator de pior prognóstico, independente do estadiamento tumoral, em pacientes com carcinoma de células transicionais do trato urinário superior (Nakanishi et al., 2005).

Observamos nos carcinomas de tireóide uma associação estatisticamente significativa entre a expressão imunoistoquímica de HIF-1α e alto risco pelo índice prognóstico de *AMES* e uma correlação marginal com estadio TNM mais avançado (estadios III e IV). Além disso, a presença de extensão tumoral extra-tireoideana nos casos de carcinoma papilífero (clássico e variante folicular) também se associou significativamente com positividade imunoistoquímica para HIF-1α. Em carcinomas papilíferos da tireóide, Scarpino et al. (2004) observaram intensa expressão imunoistoquímica da proteína MET (*hepatocyte growth factor receptor*) nas células neoplásicas situadas nas margens de invasão tumoral. Ao utilizar a técnica de microdissecção a laser, os autores detectaram um aumento dos níveis de RNA de HIF-1α e MET nas células neoplásicas extraídas da periferia tumoral em relação àquelas situadas no centro do tumor. Baseado nestes achados, os autores sugeriram que, provavelmente, HIF-1α estaria associado à ativação do gene *MET* no carcinoma papilífero de tireóide. Portanto, é possível que HIF-1α esteja envolvido com a capacidade de invasão tumoral no carcinoma papilífero de tireóide.

A galectina-3 é uma glicoproteína que apresenta capacidade de se ligar a carboidratos situados na membrana celular ou na matriz extracelular. Sua distribuição é ubíqua e, de acordo com sua localização extra ou intracelular

(citoplasma ou núcleo), a galectina-3 encontra-se envolvida em diferentes processos biológicos tais como adesão celular, resposta inflamatória, apoptose, proliferação celular e transformação neoplásica. Embora a galectina-3 esteja implicada na formação de metástases, seu papel na progressão tumoral é controverso e, provavelmente, tecido-específico (Liu, Rabinovich, 2005; Dumic et al., 2006).

A expressão imunoistoquímica de galectina-3 foi observada predominantemente nos carcinomas de tireóide quando comparada aos casos de bócio e adenoma folicular. Não se observou expressão de galectina-3 em tireóide normal. Dentre os carcinomas, a expressão imunoistoquímica de galectina-3 ocorreu principalmente no carcinoma papilífero clássico e nas metástases de carcinoma de tireóide. A expressão desta proteína foi menor na variante folicular do carcinoma papilífero e no carcinoma folicular. Estes dados são comparáveis aos observados em outras séries. Kawachi et al. (2000), por exemplo, mostraram que a expressão imunoistoquímica de galectina-3 foi significativamente maior no carcinoma papilífero em relação ao carcinoma folicular e adenoma folicular da tireóide. Em diferentes estudos, a expressão imunoistoquímica de galectina-3 no carcinoma folicular variou desde 33% (Weinberger et al., 2007; Liu et al., 2008) a 55,6% dos casos (Savin et al., 2008). As taxas de expressão desta proteína na variante folicular do carcinoma papilífero também são variáveis: Nakamura et al. (2006) observaram que 98% dos casos desta variante foram positivos para galectina-3; em contraste, Liu et al. (2008) observaram uma taxa de 33% de positividade.

Vários estudos têm demonstrado que a galectina-3 pode ser utilizada como um marcador biológico complementar ao diagnóstico citológico e/ou histológico das lesões de tireóide (Orlandi et al., 1998; Inohara et al., 1999; Bartolazzi et al., 2001). A pesquisa imunoistoquímica de galectina-3 em tireóide pode ser particularmente útil nos casos de punção aspirativa por agulha fina com diagnóstico citológico indeterminado (lesão folicular). Bartolazzi et al. (2008), por exemplo, demonstraram que 88% dos casos com diagnóstico de lesão folicular foram corretamente classificados pelo uso pré-operatório de galectina-3. Em nosso estudo, observamos que a proteína galectina-3 apresentou uma sensibilidade de 64,1%, uma especificidade de 94,4% e uma acurácia de 78,0% para o diagnóstico de malignidade em tireóide. Observamos também a expressão imunoistoquímica de galectina-3 em seis lesões tireoideanas benignas (resultados falso-positivos), compreendendo dois casos de bócio e quatro de adenoma folicular. Estes resultados são semelhantes aos de Weinberger et al. (2007) que obtiveram uma sensibilidade de 56% e 42% para a expressão citoplasmática e nuclear de galectina-3, respectivamente. Os autores também observaram que a especificidade para este marcador foi igual a 100%, pois nenhuma das lesões benignas apresentou positividade (citoplasmática ou nuclear) para galectina-3. Já Martins et al. (2002) observaram que 14 dos 31 casos de adenoma folicular analisados foram positivos quanto à expressão imunoistoquímica de galectina-3. Além disso, 4 casos de bócio multinodular (num total de 24 casos) apresentaram expressão citoplasmática de galectina-3 de intensidade leve a moderada. Os autores observaram ainda que 100% das amostras de carcinoma papilífero e carcinoma folicular expressaram RNA mensageiro de galectina-3 por RT-PCR, mas também foi possível a detecção

de RNA mensageiro de galectina-3 em 60% e 80% das amostras de adenoma folicular e bócio multinodular, respectivamente.

Desse modo, com a finalidade de reduzir a possibilidade de resultados errôneos (falso-negativos e falso-positivos), vários autores sugerem o uso combinado de galectina-3 com um ou mais marcadores num painel imunoistoquímico. Usando dois marcadores – TPO e galectina-3 – Savin et al. (2008) observaram um acurácia diagnóstica de 88,6% na discriminação entre lesões benignas e malignas da tireóide. Considerando o diagnóstico diferencial entre o adenoma folicular e a variante folicular do carcinoma papilífero da tireóide, Nakamura et al. (2006) mostraram uma sensibilidade de 87% para o diagnóstico de malignidade (isto é, da variante folicular do carcinoma papilífero) quando utilizaram um painel imunoistoquímico formado por HMBE-1, citoqueratina 19 e galectina-3. Liu et al. (2008) demonstraram que a combinação de galectina-3, fibronectina-1 e NIS revelou uma acurácia diagnóstica de 98% na distinção entre adenomas e carcinomas da tireóide. Em nosso estudo, a acurácia diagnóstica da galectina-3 associada às outras proteínas (NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1α) não foi superior àquela observada para a galectina-3 isoladamente.

Observamos que alguns casos de carcinoma papilífero clássico, carcinoma folicular e metástases de carcinoma papilífero da tireóide apresentaram expressão imunoistoquímica de galectina-3 no núcleo de algumas poucas células neoplásicas. Em nosso material, os casos positivos apresentaram expressão citoplasmática moderada a intensa na maioria das células foliculares; enquanto que a positividade

nuclear, quando presente, foi focal. Portanto, neste estudo, analisamos e quantificamos apenas a expressão citoplasmática de galectina-3. Weinberger et al. (2007) observaram que a positividade imunoistoquímica para galectina-3, tanto citoplasmática quanto nuclear, foi sempre maior nos carcinomas em relação ao tecido tireoideano normal e lesões benignas da tireóide. Além disso, não houve diferença significativa entre a expressão citoplasmática ou nuclear nos casos positivos para galectina-3. Liu et al. (2008) detectaram um aumento da expressão imunoistoquímica de galectina-3 no carcinoma papilífero da tireóide no citoplasma e no núcleo das células neoplásicas em 92% e 80% dos casos, respectivamente. As taxas de expressão citoplasmática e nuclear de galectina-3 também foram semelhantes para o carcinoma folicular (33% e 29% dos casos, respectivamente) e a variante folicular do carcinoma papilífero da tireóide (ambas com 33% de casos positivos) (Liu et al., 2008).

De fato, a expressão imunoistoquímica de galectina-3 nuclear é variável de acordo com o tipo de tecido ou órgão estudado. Ao analisar a expressão de galectina-3 na próstata, van den Brûle et al. (2000) observaram que esta proteína estava pressente tanto no núcleo, quanto no citoplasma das glândulas prostáticas normais, porém nas lesões pré-neoplásicas e nos carcinomas de próstata ocorreu uma diminuição da expressão nuclear acompanhado de um aumento citoplasmático de galectina-3. Honjo et al. (2000) detectaram um aumento da expressão citoplasmática de galectina-3 em carcinomas epidermóides da língua em comparação à mucosa normal. Já a expressão nuclear de galectina-3 foi menor nestes tumores em relação à mucosa normal. Galectina-3 foi observada predominantemente no núcleo do epitélio

gástrico normal, enquanto que no tecido tumoral, ela foi encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma das células neoplásicas (Okada et al., 2006). No câncer pulmonar, Mathieu et al. (2005) mostraram que a expressão nuclear de galectina-3 foi significativamente maior nos adenocarcinomas em relação aos carcinomas epidermóides.

De acordo com diferentes estudos, o papel da expressão imunoistoquímica de galectina-3 na progressão tumoral é contraditório. A expressão citoplasmática de galectina-3 no carcinoma de próstata foi um indicador de risco para a progressão "bioquímica" (caracterizado pelo aumento dos níveis séricos de antígeno prostático-específico, *PSA*) durante o seguimento clínico de pacientes submetidos à prostatectomia radical (van den Brûle et al., 2000). No carcinoma de língua, o aumento da expressão citoplasmática de galectina-3 se correlacionou com uma menor sobrevida livre de doença e foi o principal fator de risco para recidiva tumoral quando comparado com diversas variáveis clínico-patológicas (Honjo et al., 2000). Mathieu et al. (2005) demonstraram que a expressão nuclear de galectina-3 se associou com menor sobrevida e se caracterizou como um fator de risco independente para recorrência tumoral nos pacientes com câncer de pulmão. No carcinoma colorretal, a positividade citoplasmática para galectina-3 esteve relacionada a tumores maiores e pouco diferenciados, com maior invasão da parede colônica, maior disseminação metastática e menor sobrevida (Endo et al., 2005).

Por outro lado, outros estudos mostram que a perda da expressão de galectina-3 está associada com tumores mais agressivos e com um desfecho

desfavorável. Assim, no adenocarcinoma ductal de pâncreas, a menor expressão de galectina-3 se correlacionou com tumores menos diferenciados, estadiamento TNM mais avançado (maior tamanho tumoral, maior número de metástases para linfonodos e para sítios distantes) e menor sobrevida global (Shimamura et al., 2002). Risco aumentado para recorrência e óbito foi observado em pacientes com carcinoma epidermóide de laringe cujos tumores eram pouco diferenciados, não queratinizados e negativos para galectina-3 (Piantelli et al., 2002). No câncer gástrico, a baixa expressão imunoistoquímica de galectina-3 esteve associada com várias características clínico-patológicas (tumores pouco diferenciados, invasão linfática, presença de metástases linfonodais, estadiamento patológico mais avançado), menor taxa de sobrevida (Okada et al., 2006). Nos três estudos descritos acima, a análise multivariada mostrou que a menor expressão de galectina-3 foi um fator de risco independente para uma menor sobrevida (Shimamura et al., 2002; Piantelli et al., 2002; Okada et al., 2006).

Em nosso estudo, não observamos correlação entre a expressão imunoistoquímica de galectina-3 e variáveis clínico-patológicas como a idade, o estadiamento TNM e o índice prognóstico de *AMES* no grupo de pacientes com carcinoma de tireóide (carcinoma folicular e carcinomas papilíferos clássico e variante folicular). Weinberger et al. (2007) observaram que os pacientes com carcinoma de tireóide (carcinomas papilífero, folicular, medular e anaplásico ou indiferenciado) em estadios I e II do TNM apresentaram aumento da expressão de galectina-3 em relação aos pacientes com tumores em estadios mais avançados (estadios III e IV). Esta diferença foi estatisticamente significativa somente para a

expressão citoplasmática de galectina-3. Os autores deste estudo sugeriram que a perda de expressão de galectina-3 em tumores mais avançados poderia ser explicada, em parte, pela inclusão de pacientes com carcinomas anaplásicos da tireóide; uma vez que estes tumores encontravam-se no estadio IV e não expressavam galectina-3. Estes achados contrastam com os aqueles observados por Savin et al. (2008), nos quais os pacientes com carcinomas foliculares extensamente invasivos (e, portanto, mais agressivos) apresentaram correlação estatisticamente significativa com alta expressão imunoistoquímica de galectina-3.

Quando analisamos apenas os casos de carcinoma papilífero clássico e variante folicular, observamos que houve correlação entre a expressão imunoistoquímica de galectina-3 e características patológicas tais como extensão tumoral extra-tireoideana e multicentricidade. Savin et al. (2008) observaram correlação entre a alta expressão de galectina-3 e presença de extensão tumoral extra-tireoideana, tumores maiores, maior número de metástases linfonodais e estadiamento TNM mais avançado em pacientes com carcinoma papilífero de tireóide, incluindo o padrão clássico e a variante folicular. No entanto, Kawachi et al. (2000) não detectaram qualquer associação estatisticamente significativa entre a expressão imunoistoquímica de galectina-3 em carcinomas papilíferos e variáveis clínico-patológicas como extensão tumoral extra-tireoideana, tamanho tumoral e estadiamento TNM.

De um modo geral, nossos resultados sobre a expressão de galectina-3 em tireóide se assemelham aos estudos que mostraram que a perda da expressão de

galectina-3 esteve associada com uma menor sobrevida em pacientes com câncer de pâncreas (Shimamura et al., 2002), laringe (Piantelli et al., 2002) e estômago (Okada et al., 2006). A galectina-3 é capaz de promover a interação célula-célula e a adesão celular a componentes da matriz extracelular (Dumic et al., 2006). Já a perda de galectina-3 em determinados tumores resultaria numa menor adesão e maior disseminação das células neoplásicas. Shimamura et al. (2002), por exemplo, sugeriram que, no câncer de pâncreas, a perda de galectina-3 poderia explicar a menor adesividade das células neoplásicas à matriz extracelular, maior capacidade de invasão e, conseqüentemente, tumores mais agressivos e de pior prognóstico. No carcinoma papilífero de tireóide, Kawachi et al. (2000) observaram uma menor expressão de galectina-3 (estatisticamente significativa) nas metástases em relação aos tumores primários correspondentes. Segundo estes autores, a perda de expressão de galectina-3 poderia facilitar a liberação das células neoplásicas dos tumores primários, resultando na formação de metástases (Kawachi et al., 2000).

Observamos que a sobrevida livre de evento (recorrência, progressão ou óbito) foi menor para os pacientes com carcinoma de tireóide que não expressaram galectina-3 em relação aos pacientes com tumores positivos para galectina-3. Além disso, a perda da expressão imunoistoquímica de galectina-3 foi um fator independente relacionado ao evento nos pacientes com carcinoma de tireóide. Os demais marcadores biomoleculares (NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR e HIF-1α) não apresentaram correlação estatisticamente significativa com o desfecho neste grupo de pacientes com carcinoma de tireóide. Neste estudo, outros fatores relacionados ao evento foram a idade maior ou igual a 45 anos,

tumores maiores do que 4,0 cm e estadio IV do TNM. De fato, estes fatores clínico-patológicos geralmente se encontram associados a um pior prognóstico no câncer de tireóide. Portanto, baseados nestes achados, poderíamos postular, segundo um modelo hierárquico, que em pacientes mais idosos, a perda de galectina-3 poderia predispor a ocorrência de tumores maiores e, portanto, em estadios mais avançados, determinado, assim, um desfecho desfavorável.

6. CONCLUSÕES

As neoplasias de tireóide (adenoma folicular, carcinoma papilífero clássico e variante folicular, carcinoma folicular e metástases de carcinoma papilífero de tireóide) apresentaram um aumento da expressão de NDRG1, osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, HIF-1α e galectina-3 se comparadas ao bócio e tireóide normal.

A galectina-3 mostrou-se um marcador biomolecular útil para o diagnóstico de lesões malignas da tireóide.

A expressão imunoistoquímica de NDRG1, VEGF-A e VEGF-C nos carcinomas de tireóide associou-se com tumores mais avançados, segundo o estadiamento TNM e o índice prognóstico de *AMES*.

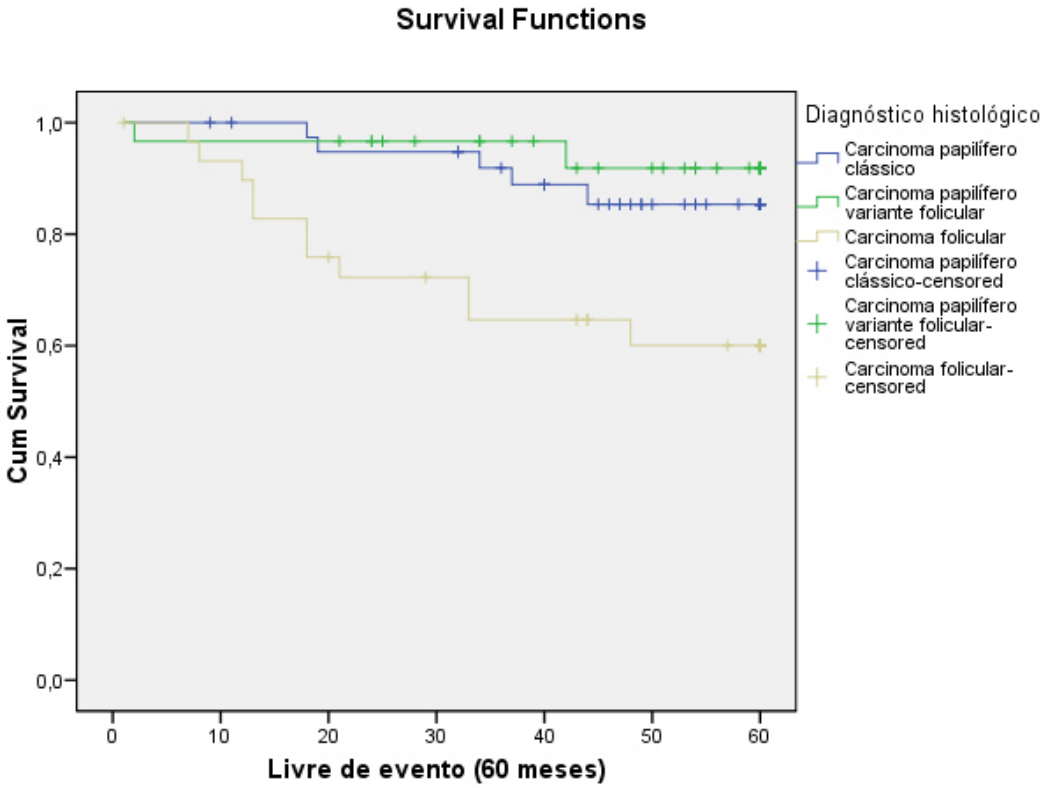
A expressão imunoistoquímica de galectina-3 nos carcinomas papilífero de tireóide (clássico e variante folicular) associou-se à presença de multicentricidade e extensão tumoral extra-tireoideana.

As variáveis demográficas e clínico-patológicas como idade ≥ 45 anos, tamanho do tumor > 4,0 cm, estádio IV do TNM e alto risco pelo índice prognóstico de *AMES* associaram-se com pior prognóstico em pacientes com carcinoma de tireóide.

A idade ≥ 45 anos, a ausência de expressão imunoistoquímica de galectina-3, o tamanho do tumor > 4,0 cm e o estádio IV do TNM foram fatores de risco independentes para a recorrência ou óbito em pacientes com carcinoma de tireóide.

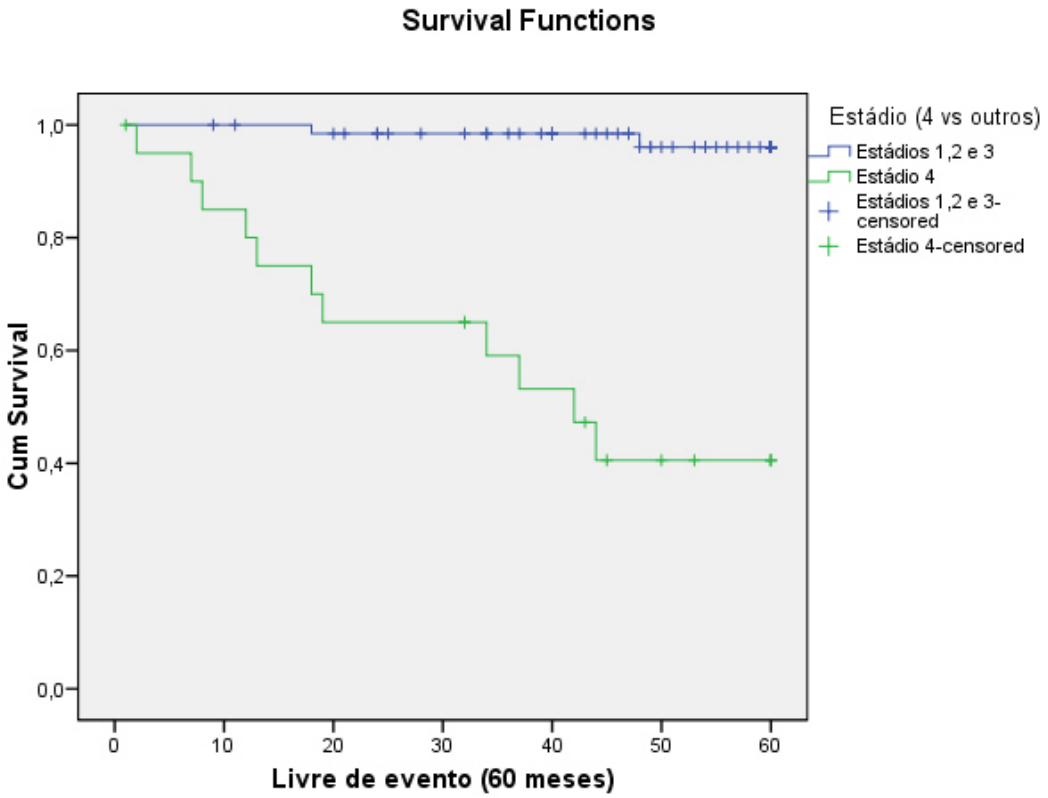
ANEXO, GRÁFICO A1

Gráfico A1. Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma de tireóide de acordo com o diagnóstico histológico



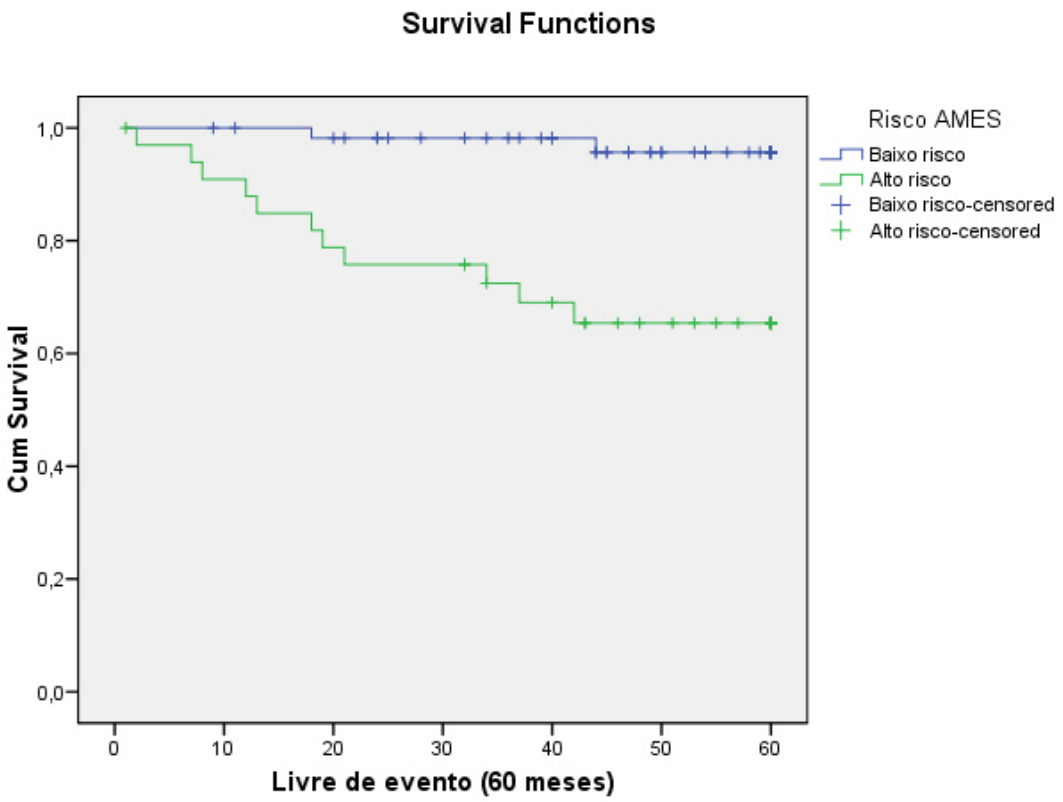
ANEXO, GRÁFICO A2

Gráfico A2. Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma de tireóide de acordo com o estadiamento TNM



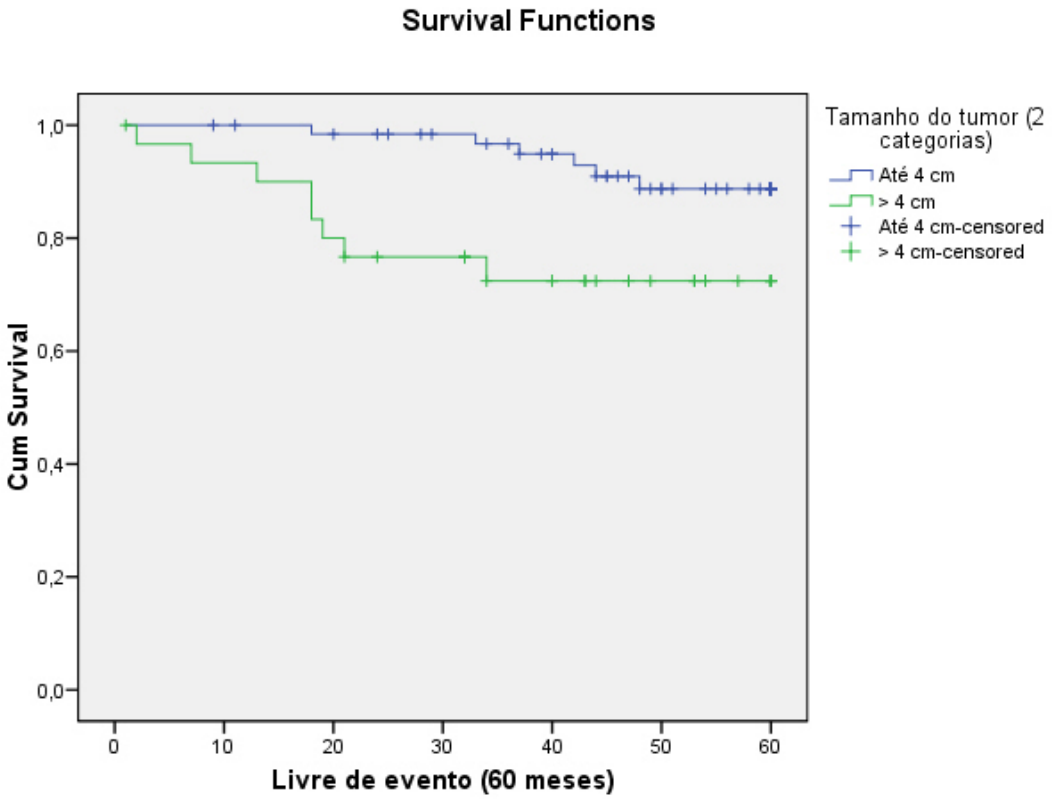
ANEXO, GRÁFICO A3

Gráfico A3. Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma de tireóide de acordo com o índice prognóstico de *AMES*



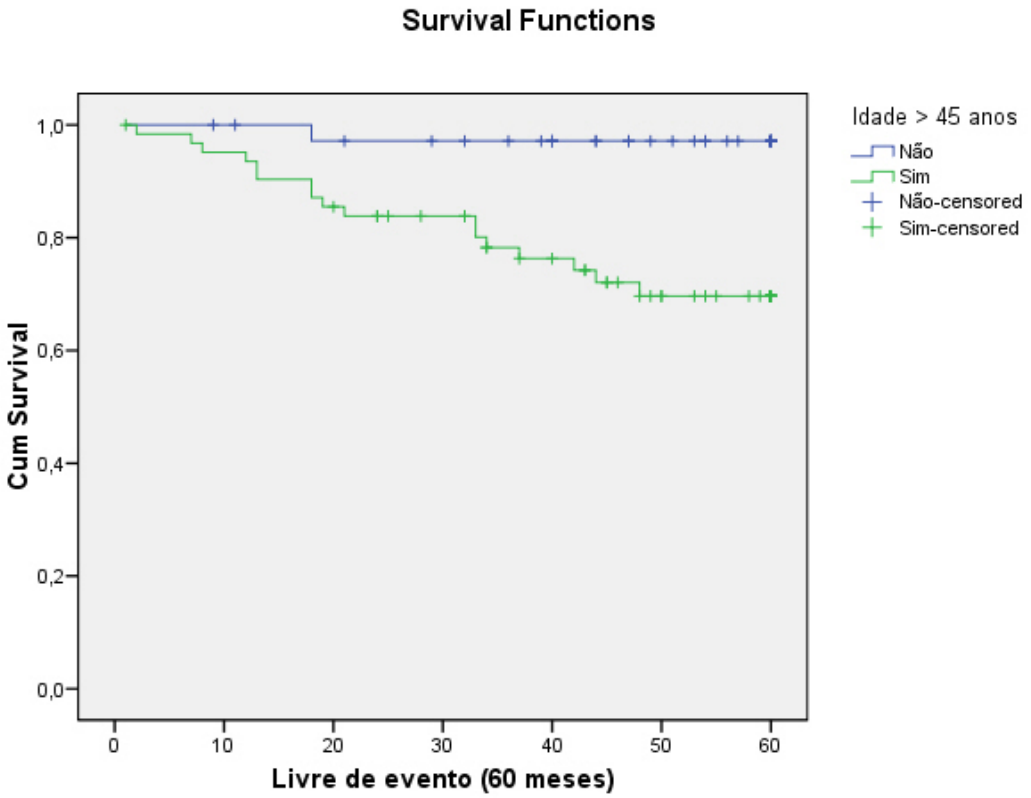
ANEXO, GRÁFICO A4

Gráfico A4. Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma de tireóide de acordo com o tamanho do tumor



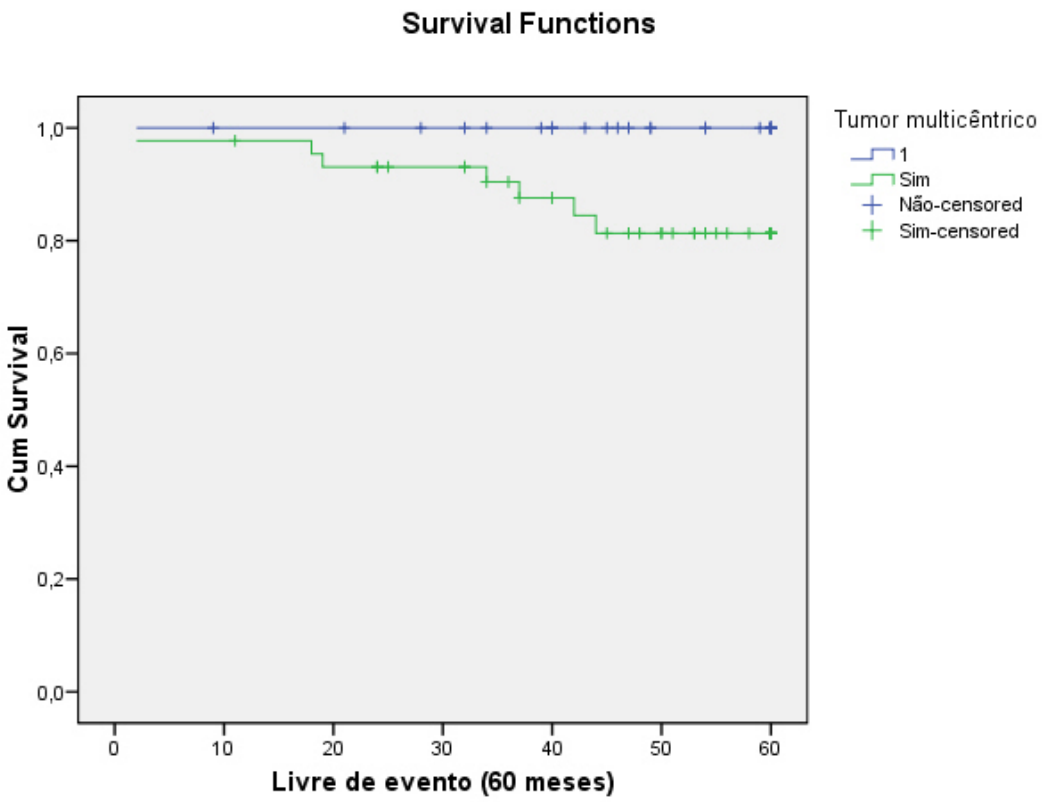
ANEXO, GRÁFICO A5

Gráfico A5. Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma de tireóide de acordo com a idade



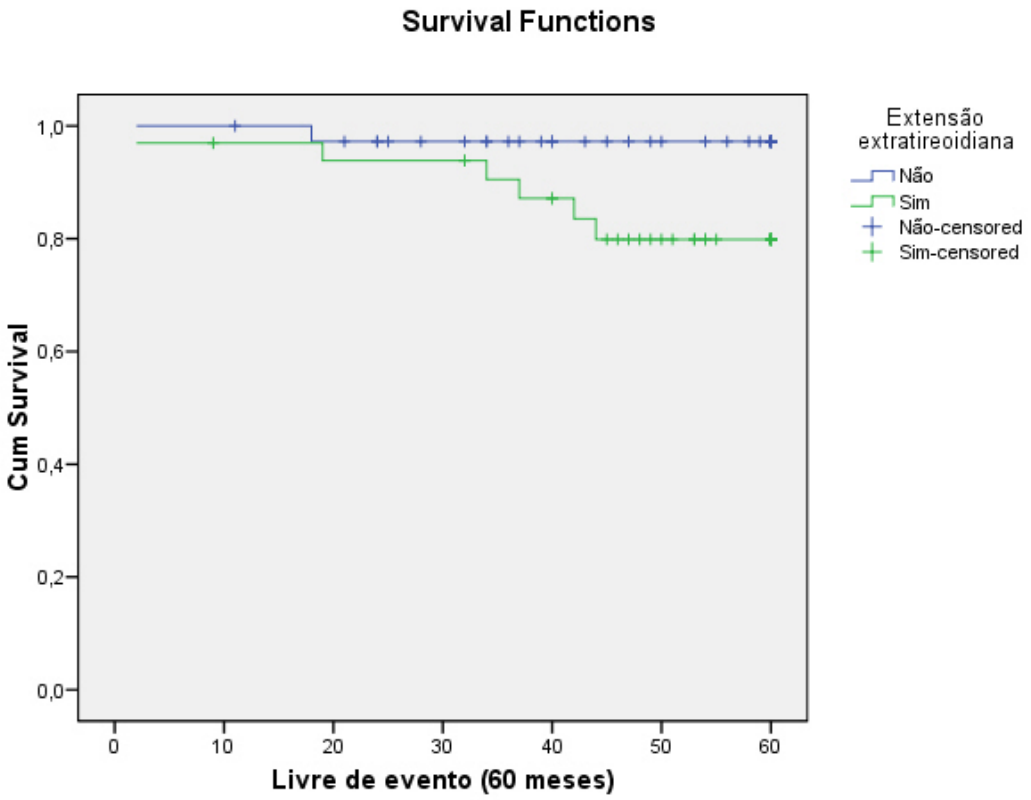
ANEXO, GRÁFICO A6

Gráfico A6. Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma papilífero de tireóide (clássico e variante folicular) de acordo com a multicentricidade do tumor



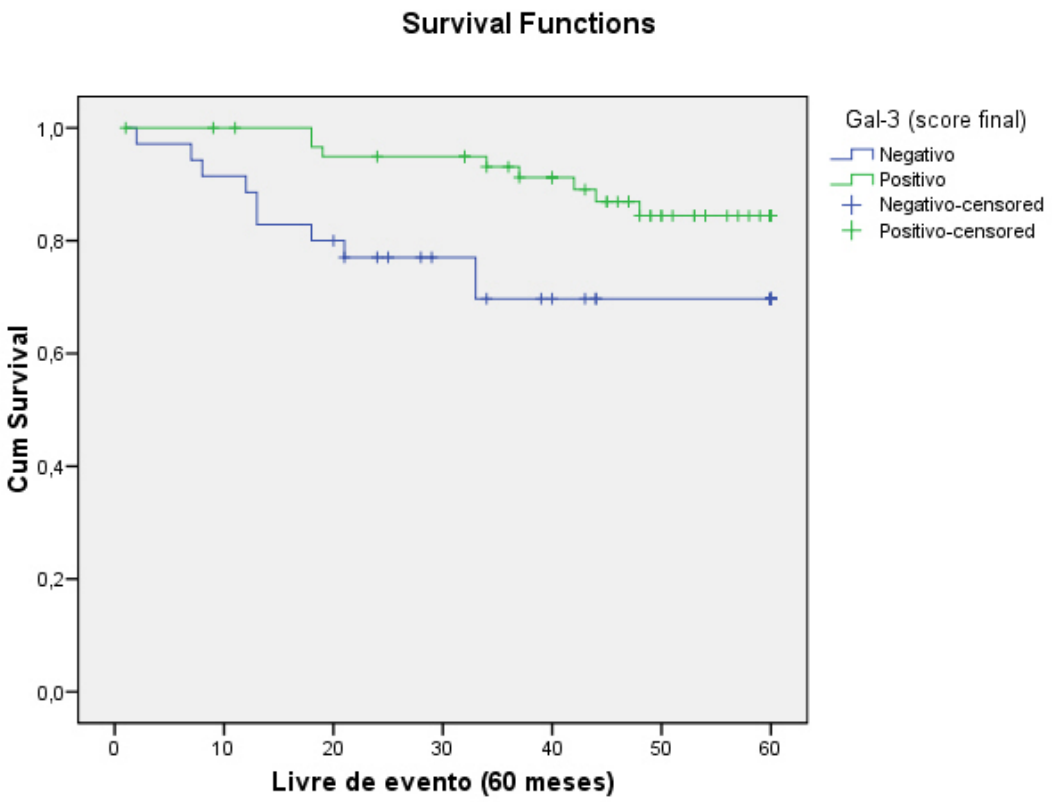
ANEXO, GRÁFICO A7

Gráfico A7. Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma papilífero de tireóide (clássico e variante folicular) de acordo com a extensão tumoral extra-tireoideana



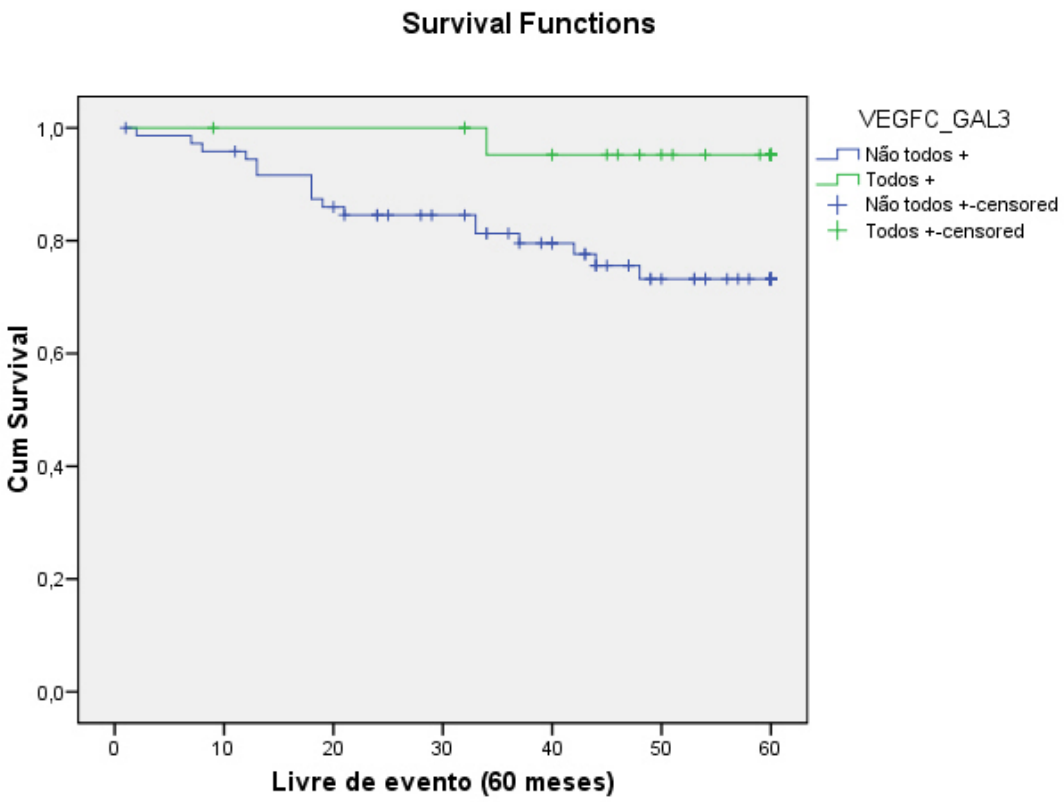
ANEXO, GRÁFICO A8

Gráfico A8. Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma de tireóide de acordo com a expressão imunoistoquímica de galectina-3



ANEXO, GRÁFICO A9

Gráfico A9. Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma de tireóide de acordo com a co-expressão imunoistoquímica de VEGF-C e galectina-3



ANEXO, GRÁFICO A10

Gráfico A10. Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento em pacientes com carcinoma de tireóide de acordo com a co-expressão imunoistoquímica de Flk-1/KDR e galectina-3

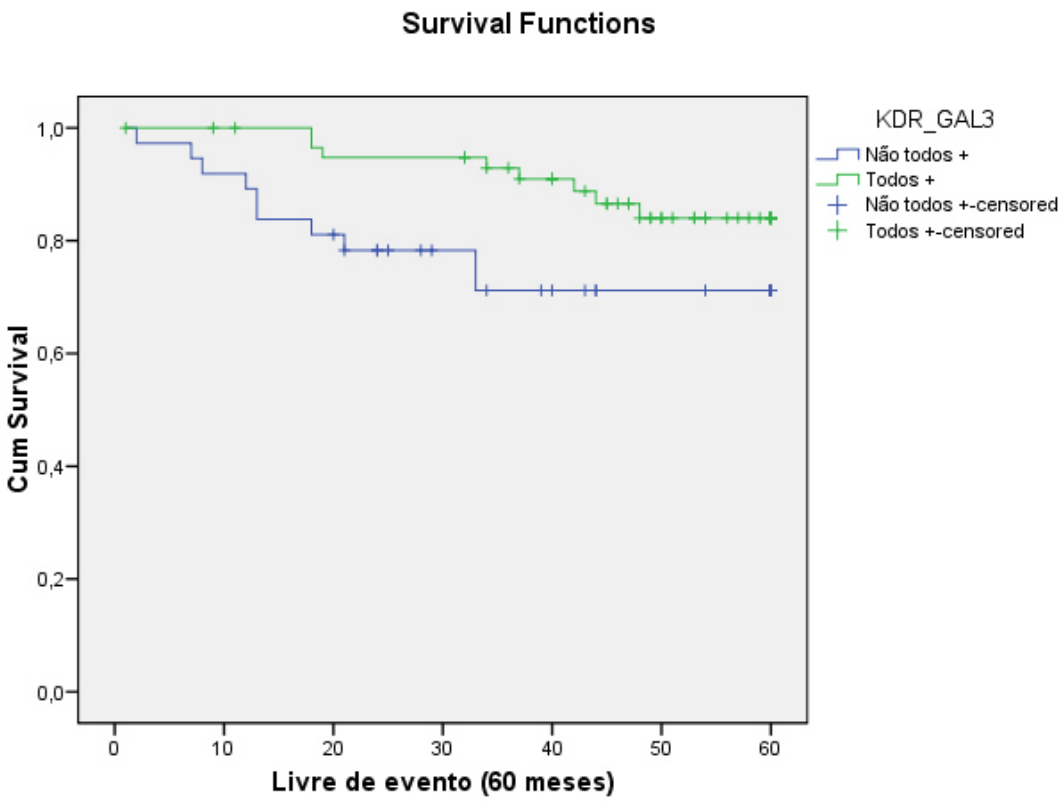


Tabela A1 – Classificação TNM do carcinoma da glândula tireóide

Sigla	Característica
T	Tumor primário
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor menor ou igual a 2,0 cm, limitado à glândula tireóide
T2	Tumor maior do que 2,0 cm e até 4,0 cm, limitado à glândula tireóide
T3	Tumor maior do que 4,0 cm, limitado à glândula tireóide ou de qualquer tamanho com extensão extra-tireoideana mínima
T4a	Tumor com invasão de tecido celular subcutâneo, laringe, traquéia, esôfago, nervo laríngeo recorrente
T4b	Tumor com invasão da fáscia pré-vertebral, vasos mediastinais ou envolvimento da artéria carótida
N	Metástases para linfonodos regionais
NX	Metástases para linfonodos regionais não podem ser avaliadas
N0	Sem evidência de metástases para linfonodos regionais
N1	Metástases para linfonodos regionais
N1a	Metástases para linfonodos da região cervical do nível VI (linfonodos pré-traqueais e paratraqueais)
N1b	Metástases para outros linfonodos cervicais unilaterais, bilaterais ou contra-laterais ou linfonodos do mediastino superior
M	Metástases à distância
MX	Metástases à distância não podem ser avaliadas
M0	Sem metástases à distância
M1	Metástases à distância

FONTE: Sobin LH, Wittekind Ch. TNM classification of malignant tumours. 6th ed. New York: John Wiley & Sons, INC.; 2002.

Tabela A2 - Estadiamento do carcinoma bem diferenciado (papilífero e folicular) da glândula tireóide com base no TNM

Estádio	Característica
Estádio I	Paciente menor de 45 anos, qualquer T, qualquer N, M0
	Paciente de 45 anos ou mais, T1N0M0
Estádio II	Paciente menor de 45 anos, qualquer T, qualquer N, M1
	Paciente de 45 anos ou mais, T2N0M0
Estádio III	Paciente de 45 anos ou mais, T3N0M0
	Paciente de 45 anos ou mais, T1/T2/T3, N1a, M0
Estádio IV A	Paciente de 45 anos ou mais, T1/T2/T3, N1b, M0)
	Paciente de 45 anos ou mais, T4a, qualquer N, M0
Estádio IV-B	Paciente de 45 anos ou mais, T4b, qualquer N, M0
Estádio IV-C	Paciente de 45 anos ou mais, qualquer T, qualquer N, M1

FONTE: Sobin LH, Wittekind Ch. TNM classification of malignant tumours. 6th ed. New York: John Wiley & Sons, INC.; 2002.

Tabela A3 – Índice prognóstico de *AMES*[1]

Baixo risco	Alto risco
sexo masculino < 41 anos ou sexo feminino < 51 anos sem metástases à distância	sexo masculino ou feminino, qualquer idade, com metástases à distância
sexo masculino de 41 anos ou mais ou sexo feminino de 51 anos ou mais com:	sexo masculino de 41 anos ou mais ou sexo feminino de 51 anos ou mais com:
carcinoma papilífero intra-tireoideano ou carcinoma folicular minimamente invasivo e tumor primário menor do que 5,0 cm e ausência de metástases à distância	carcinoma papilífero com extensão extra-tireoideana ou carcinoma folicular extensamente invasivo e/ou tumor primário maior ou igual a 5,0 cm

FONTE: Cady B, Rossi R. An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. *Surgery.* 1988;104:947-53.

[1]*AMES* (***a****ge of the patient,* ***m****etastases of the tumor,* ***e****xtent of primary tumor,* ***s****ize of the tumor*)

8. REFERÊNCIAS

1. Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor-1α: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res.* 2001;61:2911-6.

2. Akagi K, Ikeda Y, Miyazaki M, Abe T, Kinoshita J, Maehara Y, Sugimachi K. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Br J Cancer.* 2000;83:887-91.

3. Aldred MA, Huang Y, Liyanarachchi S, Pellegata NS, Gimm O, Jhiang S, Davuluri RV, de La Chapelle A, Eng C. Papillary and follicular thyroid carcinomas show distinctly different microarray expression profiles and can be distinguished by a minimum of five genes. *J Clin Oncol.* 2004;17:3531-9.

4. Ando T, Ishiguro H, Kimura M, Mitsui A, Kurehara H, Sugito N, Tomoda K, Mori R, Takashima N, Ogawa R, Fujii Y, Kuwabara Y. Decreased expression of NDRG1 is correlated with tumor progression and poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus.* 2006;19:454-8.

5. Asa SL. The role of immunohistochemical markers in the diagnosis of follicular-patterned lesions of the thyroid. *Endocr Pathol.* 2005;16:295-309.

6. Bandyopadhyay S, Pai SK, Gross SC, Hirota S, Hosobe S, Miura K, Saito K, Commes T, Hayashi S, Watabe M, Watabe K. The Drg-1 gene suppresses tumor metastasis in prostate cancer. *Cancer Res.* 2003;63:1731-6.

7. Bandyopadhyay S, Pai SK, Hirota S, Hosobe S, Takano Y, Saito K, Piquemal D, Commes T, Watabe M, Gross SC, Wang Y, Ran S, Watabe K. Role of the putative tumor metastasis suppressor gene Drg-1 in breast cancer progression. *Oncogene.* 2004;23:5675-81.

8. Barden CB, Shister KW, Zhu B, Guiter G, Greenblatt DY, Zeiger MA, Fahey TJ 3rd. Classification of follicular thyroid tumors by molecular signature: results of gene profiling. *Clin Cancer Res.* 2003;9:1792-800.

9. Barondes SH, Copper DNW, Gitt MA, Leffler H. Galectins: structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem.* 1994;269:20807-10.

10. Bartolazzi A, Gasbarri A, Papotti M, Bussolati G, Lucante T, Khan A, Inohara H, Marandino F, Orlandi F, Nardi F, Vechione A, Tecce R, Larsson O. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet.* 2001;357:1644-50.

11. Bartolazzi A, Orlandi F, Saggiorato E, Volante M, Arecco F, Rossetto R, Palestini N, Ghigo E, Papotti M, Bussolati G, Mantegani MP, Pantellini F, Carpi A, Giovagnoli MR, Monti S, Toscano V, Sciacchitano S, Pennelli GM, Mian C, Pelizzo MR, Rugge M, Troncone G, Palombini L, Chiappetta G, Botti G, Vecchione A, Bellocco R. Galectin-3 expression analysis in the surgical selection of follicular thyroid nodules with indeterminate fine-needle aspiration cytology: a prospective multicentre study. *Lance Oncol.* 2008;9:543-9.

12. Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res.* 2000;60:4693-6.

13. Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest GL, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible fator-1α independentely predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer.* 2003;97:1573-81.

14. Bradshaw AD, Sage EH. SPARC, a matricellular protein that function in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest.* 2001;107:1049-54.

15. Bunone G, Vigneri P, Mariani L, Butó S, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA, Bongarzone I. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am J Pathol.* 1999;155:1967-76.

16. Cady B, Rossi R. An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. *Surgery.* 1988;104:947-53.

17. Cangul H. Hypoxia upregulates the expression of the NDRG1 gene leading to its overexpression in various human cancers. *BMC Genet*. 2004;5:27.

18. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9:653-60.

19. Cascinu S, Staccioli MP, Gasparini G, Giordani P, Catalano V, Ghiselli R, Rossi C, Baldelli AM, Graziano F, Saba V, Muretto P, Catalano G. Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6:2803-7.

20. Cerutti JM. Nódulos com diagnóstico de padrão folicular: marcadores biológicos são o futuro? *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007; 51:832-42.

21. Cerutti JM, Delcelo R, Amadei MJ, Nakabashi C, Maciel RM, Peterson B, Shoemaker J, Riggins GJ. A preoperative diagnostic test that distinguishes benign from malignant thyroid carcinoma base don gene expression. *J Clin Invest.* 2004;113:1234-42.

22. Cerutti JM, Latini FRM, Nakabashi C, Delcelo R, Andrade VP, Amadei MJ, Maciel RMB, Hojaij FC, Hollis D, Shoemaker J, Riggins GJ. Diagnosis of suspicious thyroid nodules using four protein biomarkers. *Clin Cancer Res.* 2006;12:3311-18.

23. Chevillard S, Ugolin N, Vielh P, Ory K, Levalois C, Elliott D, Clayman GL, El-Naggar AK. Gene expression profiling of differentiated thyroid neoplasms: diagnostic and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2004;10:6586-97.

24. Chua M-S, Sun H, Cheung ST, Mason V, Higgins J, Ross DT, Fan ST, So S. Overexpression of NDRG1 is an indicator of poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol.* 2007;20:76-83.

25. Ciampi R, Nikiforov YE. Minireview: RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology.* 2007;148:936-41.

26. Clark CJ, Sage EH. A prototypic matricellular protein in the tumor microenvironment – where there´s SPARC, there´s fire. *J Cell Biochem.* 2008;104:721-32.

27. Coeli CM, Britto AS, Barbosa FS, Ribeiro MG, Sieiro APAV, Vaisman M. Incidência e mortalidade por câncer de tireóide no Brasil. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;49:503-9.

28. Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc.* Series B 1972;34:187-200.

29. Dales J-P, Garcia S, Meunier-Carpentier S, Andrac-Meyer L, Haddad O, Lavant M-N, Allasia C, Bonnier P, Charpin C. Overexpression of hypoxia-inducible factor HIF-11α predicts early relapse in breast cancer: retrospective study in a series of 745 patients. *Int J Cancer.* 2005;116:734-9.

30. de La Torre NG, Buley I, Wass JAH, Turner HE. Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumour behaviour. *Endocr Relat Cancer.* 2006;13: 931-44.

31. DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs.* Lyon: IARC Press; 2004.

32. Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochem Biophys Acta.* 2006;1760:616-35.

33. Endo K, Kohnoe S, Tsujita E, Watanabe A, Nakashima H, Baba H, Maehara Y. Galectin-3 expression is a potent prognostic marker in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2005;25:3117-21.

34. Ellen TP, Ke Q, Zhang P, Costa M. NDRG1, a growth and cancer related gene: regulation of gene expression and function in normal and disease states. *Carcinogenesis.* 2008;29:2-8.

35. Fajas L, Debril M-B, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ: from adipogenesis to carcinogenesis. *J Mol Endocrinol.* 2001;27:1-9.

36. Ferrajoli A, Manshouri T, Estrov Z, Keating MJ, O`Brien S, Lerner S, Beran M, Kantarjian HM, Freireich EJ, Albitar M. High levels of vascular endothelial growth factor receptor-2 correlate with shortened survival in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2001;7:795-9.

37. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280:C1358-66.

38. Finley DJ, Arora N, Zhu B, Gallagher L, Fahey TJ 3rd. Molecular profiling distinguishes papillary carcinoma from benign thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:3214-23.

39. Fischer RA. On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *J R Stat Soc.* 1929;85:87-94.

40. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Med.* 1995;1:27-31.

41. Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J, Wu R, Carcangiu ML, Costa J, Tallini G. RAS mutations are associated with aggressive tumor phenotype and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21:3226-35.

42. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Turley H, Sivridis E, Harris AL, Gatter KC. Phosphorylated KDR expression in endometrial cancer cells relates to HIF1α/VEGF pathway and unfavorable prognosis. *Mod Pathol.* 2006;19:701-7.

43. Gordan JD, Simon MC. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Gen & Developm.* 2007;17:71-7.

44. Guan RJ, Ford HL, Fu Y, Li Y, Shaw LM, Pardee AB. DRG-1 as a differentiation-related, putative metastatic supressor gene in human colon cancer. *Cancer Res.* 2000;60:749-55.

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

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

47. Hashimoto I, Kodama J, Seki N, Hongo A, Yoshinouchi M, Okuda H, Kudo T. Vascular endothelial growth factor-C expression and its relationship to pelvic lymph node status in invasive cervical cancer. *Br J Cancer.* 2001;85:93-7.

48. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol.* 2005;23:1011-27.

49. Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006;59:15-26.

50. Honjo Y, Inohara H, Akahani S, Yoshii T, Takenaka Y, Yoshida J-I, Hattori K, Tomiyama Y, Raz A, Kubo T. Expression of cytoplasmatic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2000;6:4635-40.

51. Hoos A, Stojadinovic A, Singh B, Dudas ME, Leung DH, Shaha AR, Shah JP, Brennan MF, Cordon-Cardo C, Ghossein R. Clinical significance of molecular expression profiles of Hürthle cell tumors of the thyroid gland analyzed via tissue microarrays. *Am J Pathol.* 2002;160:175-83.

52. Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technique. *Am J Clin Pathol.* 1981;75:816-21.

53. Hung CH, Ginzinger DG, Zarnegar R, Kanauchi H, Wong MG, Kebebew E, Clark OH, Duh Q-Y. Expression of vascular endothelial growth factor-C in benign and malignant thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:3694-9.

54. Infante JR, Matsubayashi H, Sato N, Tonascia J, Klein AP, Riall TA, Yeo C, Iacobuzio-Donahue C, Goggins M. Peritumoral fibroblast SPARC expression and patient outcome with resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2007;25:319-25.

55. Inohara H, Honjo Y, Yoshii T, Akahani S, Yoshida J-I, Hattori K, Okamoto S, Sawada T, Raz A, Kubo T. Expression of galectin-3 in fine-needle aspirates as a diagnostic marker differentiating benign from malignant thyroid neoplasms. *Cancer.* 1999;85:2475-84.

56. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008;58:71-96.

57. Kalaydjieva L, Hallmayer J, Chandler D, Savov A, Nikolova A, Angelicheva D, King RH, Ishpekova B, Honeyman K, Calafell F, Shmarov A, Petrova J, Turnev I, Hristova A, Moskov M, Stancheva S, Petkova I, Bittles AH, Georgieva V, Middleton L, Thomas PK. Gene mapping in Gypsies identifies a novel demyelinating neuropathy on chromosome 8q24. *Nat Genet.* 1996;14:214-17.

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

59. Kamat AA, Merritt WM, Coffey D, Lin YG, Patel PR, Broaddus R, Nugent E, Han LY, Landen Jr CN, Spannuth WA, Lu C, Coleman RL, Gershenson DM, Sood AK. Clinical and biological significance of vascular endothelial growth factor in endometrial cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13:7487-95.

60. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observation. *J Am Stat Assoc.* 1958;53:457-81.

61. Kawachi K, Matsushita Y, Yonezawa S, Nakano S, Shirao K, Natsugoe S, Sueyoshi K, Aikou T, Sato E. Galectin-3 expression in various thyroid neoplasms and its possible role in metastasis formation. *Hum Pathol.* 2000;31:428-33.

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

63. Klein M, Picard E, Vignaud J-M, Marie B, Bresler L, Toussaint B, Weryha G, Duprez A, Leclère J. Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma. *J Endocrinol.* 1999;161:41-9.

64. Klein M, Vignaud J-M, Hennequin V, Toussaint B, Bresler L, Plénat F, Leclère J, Duprez A, Weryha G. Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:656-8.

65. Klein M, Catargi B. VEGF in physiological process and thyroid disease. *Ann Endocrinol* (Paris). 2007;68:438-48.

66. Kokame K, Kato H, Miyata T. Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. *J Biol Chem.* 1996;271:29659-65.

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

68. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Brekken RA, Sivridis E, Gatter KC, Harris AL, Sage EH. Enhanced expression of SPARC/osteonectin in the tumor-associated stroma of non-small cell lung cancer is correlated with markers of hypoxia/acidity and with poor prognosis of patients. *Cancer Res.* 2003;63:5376-80.

69. Kowanetz M, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res.* 2006;12:5018-22.

70. Kranz A, Mattfeldt T, Waltenberger J. Molecular mediators of tumor angiogenesis enhanced expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor KDR in primary breast cancer. *Int J Cancer.* 1999;84:293-8.

71. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma. *Science.* 2000;289:1357-60.

72. Kung S-P, Lee C-H, Yang A-H, Chi C-W, Tseng L-M, Wu C-W. Expression of c-Kit, Flk-1, and Flk-2 receptors in benign and malignant tumors of follicular epithelial origin. *Chin Med Assoc.* 2006;69:74-9.

73. Kupprion C, Motamed K, Sage EH. SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998;273:29635-40.

74. Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, Onogawa S, Matsutani N, Kaio E, Ito M, Chayama K. Expression of hypoxia-inducible factor-1α is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer.* 2003;105:176-81.

75. Lachat P, Shaw P, Gebhard S, van Belzen N, Chaubert P, Bosman FT. Expression of NDRG1, a differentiation-related gene, in human tissues. *Histochem Cell Biol.* 2002;118:399-408.

76. Lacroix L, Mian C, Barrier T, Talbot M, Caillou B, Schlumberger M, Bidart JM. PAX8 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 gene expression status in benign and malignant thyroid tissues. *Eur J Endocrinol.* 2004;151:367-74.

77. Liu F-T, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:29-41.

78. Liu YY, Morreau H, Kievit J, Romijn JA, Carrasco N, Smit JW. Combined immunostaining with galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, Hector Battifora mesothelial-1, cytokeratin-19, peroxisome proliferation-activated receptor-(gamma), and sodium/iodide symporter antibodies for the differential diagnosis of non-medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2008;158:375-84.

79. Mabjeesh NJ, Amir S. Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis. *Histol Histopathol.* 2007;22:559-72.

80. Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, Leite V. Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangement in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:3947-52.

81. Martins L, Matsuo SE, Ebina KN, Kulcsar MA, Friguglietti CUM, Kimura ET. Galectin-3 messenger ribonucleic acid and protein are expressed in benign thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:4806-10.

82. Maruyama Y, Ono M, Kawahara A, Yokoyama T, Basaki Y, Kage M, Aoyagi S, Kinoshita H, Kuwano M. Tumor growth suppression in pancreatic cancer by a putative metastasis suppressor gene Cap43/NDRG1/Drg-1 through modulation of angiogenesis. *Cancer Res.* 2006;66:6233-42.

83. Mathieu A, Saal I, Vuckovic A, Ransy V, Vereerstraten P, Kaltner H, Gabius H-J, Kiss R, Decaestecker C, Salmon I, Remmelink M. Nuclear galectin-3 expression is an independent predictive factor of recurrence for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol.* 2005;18:1264-71.

84. Matsuo SE, Martins L, Leoni SG, Hajjar D, Ricarte-Filho JCM, Ebina KN, Kimura ET. Marcadores biológicos de tumores tiroidianos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004;48:114-25.

85. Maxwell PH. The HIF pathway in cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2005;16:523-30.

86. Mazzanti C, Zeiger MA, Costourous NG, Umbricht C, Westra WH, Smith D, Somervell H, Bevilacqua G, Alexander HR, Libutti SK. Using gene expression profiling to differentiate benign versus malignant thyroid tumors. *Cancer Res.* 2004;64:2898-903.

87. Nakahara S, Raz A. Regulation of cancer-related gene expression by galectin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26:605-10.

88. Nakamura N, Erickson LA, Jin L, Kajita S, Zhang H, Qian X, Rumilla K, Lloyd RV. Immunohistochemical separation of follicular variant of papillary thyroid carcinoma from follicular adenoma. *Endocr Pathol.* 2006;17:213-23.

89. Nakanishi K, Hiroi S, Tominaga S, Aida S, Kasamatsu H, Matsuyama S, Matsuyama T, Kawai T. Expression of hypoxia-inducible factor-1α protein predicts survival in patients with transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Clin Cancer Res.* 2005;11:2583-90.

90. Nikiforov YE. Genetic alterations involved in the transition from well-differentiated to poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas. *Endocr Pathol.* 2004;15:319-27.

91. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:5399-404.

92. Nishida N, Yano H, Komai K, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 2 are related closely to the prognosis of patients with ovarian carcinoma. *Cancer.* 2004;101:1364-74.

93. Nishio S, Ushijima K, Tsuda N, Takemoto S, Kawano K, Yamaguchi T, Nishida N, Kakuma T, Tsuda H, Kasamatsu T, Sasajima Y, Kage M, Kuwano M, Kamura T. Cap43/NDRG1/Drg-1 is a molecular target for angiogenesis and a prognostic indicator in cervical adenocarcinoma. *Cancer Lett.* 2008;264:36-43.

94. O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer.* 2001;92:556-68.

95. Okada K, Shimura T, Suehiro T, Mochiki E, Kuwano H. Reduced galectin-3 expression is an indicator of unfavorable prognosis in gastric cancer. *Anticancer Res.* 2006;26:1369-76.

96. Orlandi F, Saggiorato E, Pivano G, Puligheddu B, Termine A, Cappia S, De Giuli P, Angeli A. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res.*, 1998;58:3015-20.

97. Pallares J, Rojo F, Iriarte J, Morote J, Armadans LI, de Torre I. Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues. *Histol Histopathol.* 2006;21:857-65.

98. Pauws E, Moreno JC, Tijssen M, Baas F, de Vijlder JJ, Ris-Stalpers C. Serial analysis of gene expression as a tool to assess the human thyroid expression profile and to identify novel thyroid genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:1923-7.

99. Petrosyan K, Tamayo R, Joseph D. Sensitivity of a novel biotin-free detection reagent (powervision+) for immunohistochemistry. *J Histotech.* 2002;25:247-50.

100. Perillo NL, Marcus ME, Baum LG. Galectins: vesatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med.* 1998;76:402-12.

101. Piantelli M, Iacobelli S, Almadori G, Iezzi M, Tinari N, Natoli C, Cadoni G, Lauriola L, Ranelletti FO. Lack of expression of galectin-3 is associated with a poor outcome in node-negative patients with laryngeal squamous-cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2002;20:3850-6.

102. Piquemal D, Joulia D, Balaguer P, Basset A, Marti J, Commes T. Differential expression of the RTP/Drg/Ndr1 gene product in proliferating and growth arrested cells. *Biochim Biophys Acta..* 1999;1450:364-73.

103. Podhajcer OL, Benedetti L, Girotti MR, Prada F, Salvatierra E, Llera AS. The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host. *Cancer Metastasis Rev.* 2008;27:323-37.

104. Porter PL, Sage EH, Lane TF, Funk SE, Gown AM. Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *J Histochem Cytochem.* 1995;43:791-800.

105. Qu X, Zhai Y, Wei H, Zhang C, Xing G, Yu Y, He F. Characterization and expression of three novel differentiation-related genes belong to the human NDRG gene family. *Mol Cell Biochem.* 2002;229:35-44.

106. Ramsden JD. Angiogenesis in the thyroid gland. *J Endocrinol.* 2000;166:475-80.

107. Reis EM, Ojopi EP, Alberto FL, Rahal P, Tsukumo F, Mancini UM, Guimarães GS, Thompson GM, Camacho C, Miracca E, Carvalho AL, Machado AA, Paquola AC, Kowalski LP, Verjovski-Almeida S, Tajara EH, Dias-Neto E, Head and Neck Annotation Consortium. Large-scale transcriptome analyses reveal new genetic marker candidates of head, neck and thyroid cancer. *Cancer Res.* 2005;65:1693-9.

108. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386:671-4.

109. Robert G, Gaggioli C, Bailet O, Chavey C, Abbe P, Aberdam E, Sabatié E, Cano A, Garcia de Herreros A, Ballotti R, Tartare-Deckert S. SPARC represses E-caderin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res.* 2006;66:7516-23.

110. Sage EH, Reed M, Funk SE, Truong T, Steadele M, Puolakkainen P, Maurice DH, Bassuk JA. Cleavage of the matricellular protein SPARC by matrix metaloproteinase 3 produces polypetides that influence angiogenesis. *J Biol Chem.* 2003;278:37849-57.

111. Salnikow K, An WG, Melillo G, Blagosklonny MK, Costa M. Nickel-induced transformation shifts the balance between HIF-1 and p53 transcription factors. *Carcinogenesis.* 1999;20:1819-23.

112. Sanabria A, Carvalho AL, Piana de Andrade V, Rodrigo JP, Vartanian JG, Rinaldo A, Ikeda MK, Devaney KO, Magrin J, Augusto Soares F, Ferlito A, Kowalski LP. Is galectin-3 a good method for the detection of malignancy in patients with thyroid nodules and a cytologic diagnosis of "follicular neoplasm"? A critical appraisal of the evidence. *Head Neck.* 2007;29:1046-54.

113. Sanders LE, Cady B. Differentiated thyroid cancer: reexamination of risk groups and outcome of treatment. *Arch Surg.* 1998;133:419-25.

114. Santoro M, Melillo RM, Fusco A. RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture. *Eur J Endocrinol.* 2006;155:645-53.

115. Savin S, Cvejic D, Isic T, Paunovic I, Tatic S, Havelka M. Thyroid peroxidase and galectin-3 immunostaining in differentiated thyroid carcinoma with clinicopathologic correlation. *Hum Pathol.* 2008;39:1656-1663.

116. Scarpino S, d´Alena FC, Di Napoli A, Pasquini A, Marzullo A, Ruco LP. Increased expression of Met protein is associated with up-regulation of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) in tumor cells in papillary carcinoma of the thyroid. *J Pathol.* 2004;202:352-8.

117. Segev DL, Clark DP, Zeiger MA, Umbricht C. Beyond the suspicious thyroid fine needle aspirate: a review. *Acta Cytol.* 2003;47:709-722.

118. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:721-32.

119. Semenza GL. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J Cell Biochem.* 2007;102:840-7.

120. Shi S-R, Guo J, Cote RJ, Young LL, Hawes D, Shi Y, Thu S, Taylor CR. Sensitivity and detection efficiency of a novel two-step detection system (PowerVision) for immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 1999;7:201.

121. Shimamura T, Sakamoto M, Ino Y, Shimada K, Kosuge T, Sato Y, Tanaka K, Sekihara H, Hirohashi S. Clinico-pathological significance of galectin-3 expression in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res.* 2002;8:2570-5.

122. Shimono A, Okuda T, Kondoh H. N-myc-dependent repression of ndr1, a gene identified by direct subtraction of whole mouse embryo cDNAs between wild type and N-myc mutant. *Mech Dev.* 1999;83:39-52.

123. Soares P, Sobrinho-Simões M. Recent advances in cytometry, cytogenetics and molecular genetics of thyroid tumours and tumour-like lesions. *Pathol Res Pract.* 1995;191:304-17.

124. Sobin LH, Wittekind Ch. TNM classification of malignant tumours. 6th ed. New York: John Wiley & Sons, INC.; 2002.

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

126. Soh EY, Duh Q-Y, Sobhi SA, Young DM, Epstein HD, Wong MG, Garcia YK, Min YD, Grossman RF, Siperstein AE, Clark OH. Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:3741-7.

127. Stein S, Thomas EK, Herzog B, Westfall MD, Rocheleau JV, Jackson RS 2nd, Wang M, Liang P. NDRG1 is necessary for p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem.* 2004;279:48930-40.

128. Stewart M, Turley H, Cook N, Pezzella F, Pillai G, Olgivie D, Cartlidge S, Paterson D, Copley C, Kendrew J, Barnes C, Harris AL, Gatter KC. The angiogenic receptor KDR is widely distributed in human tissues and tumours and relocates intracellulary on phosphorylation. An immunohistochemical study. *Histopathology.* 2003;43:33-9.

129. Straume O, Akslen LA. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptors (FLT-1, KDR) and TSP-1 related to microvessel density and patient outcome in vertical growth phase melanomas. *Am J Pathol.* 2001;159:223-35.

130. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. *Am J Pathol.* 2000;157:411-21.

131. van den Brûle FA, Waltregny D, Liu FT, Castronovo V. Alteration of the cytoplasmatic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression. *Int J Cancer.* 2000;89:361-7.

132. Victora CG, Huttly SR, Fuchs SC, Olinto MT. The role of conceptual frameworks in epidemiological analysis: a hierarquical approach. *Int J Epidemiol.* 1997;26:224-7.

133. Vieira JM, Santos SCR, Espadinha C, Correia I, Vag T, Casalou C, Cavaco BM, Catarino AL, Dias S, Leite V. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in thyroid carcinomas of follicular origin: a potential autocrine loop. *Eur J Endocrinol.* 2005;153:701-9.

134. Wang C-S, Lin K-H, Chen S-L, Chan Y-F, Hsueh S. Overexpression of SPARC gene in human gastric carcinoma and its clinic-pathologic significance. *Br J Cancer.* 2004;91:1924-30.

135. Wang JF, Milosveski V, Schramek C, Fong CH, Becks GP, Hill DJ. Presence and possible role of vascular endothelial growth factor in thyroid cell growth and function. *J Endocrinol.* 1998;157:5-12.

136. Wang Z, Wang F, Wang W-Q, Gao Q, Wei W-L, Yang Y, Wang G-Y. Correlation of N-myc downstream-related gene 1 overexpression with progressive growth of colorectal neoplasm. *World J Gastroenterol.* 2004;10:550-4.

137. Wasenius VM, Hemmer S, Kettunen E, Knuutila S, Franssila K, Joensuu H. Hepatocyte growth factor receptor, matriz metalloproteinase-11, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and fibronectin are up-regulated in papillary thyroid carcinoma: a cDNA a and tissue microarray study. *Clin Cancer Res.* 2003;9:68-75.

138. Weber F, Shen L, Aldred MA, Morrison CD, Frilling A, Saji M, Schuppert F, Broelsch CE, Ringel MD, Eng C. Genetic classification of benign and malignant thyroid follicular neoplasia based on a three-gene combination. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:2512-21.

139. Weinberger PM, Adam BL, Gourin CG, Moretz WH 3rd, Bollag RJ, Wang BY, Liu Z, Lee JR, Terris DJ. Association of nuclear, cytoplasmatic expression of galectin-3 with beta-catenin/Wnt-pathway activation in thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;133:503-10.

140. Wiesener MS, Münchenhagen PM, Berger I, Morgan NV, Roigas J, Schwiertz A, Jürgensen JS, Gruber G, Maxwell PH, Löning SA, Frei U, Maher ER, Gröne H-J, Eckardt K-U. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1α in clear cell renal carcinomas. *Cancer Res.* 2001;61:5215-22.

141. Xue LY, Hu N, Song YM, Zou SM, Shou JZ, Qian LX, Ren LQ, Lin DM, Tong T, He ZG, Zhan QM, Taylor PR, Lu N. Tissue microarray analysis reveals a tight correlation between protein expression pattern and progression of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2006;6:296.

142. Yan Q, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem.* 1999;47:1495-506.

143. Yiu GK, Chan WY, Ng S-W, Chan PS, Cheung KK, Berkowitz RS, Mok SC. SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. *Am J Pathol.* 2001;159:609-22.

144. Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, Fushida S, Ninomiya I, Bandou E, Taniguchi K, Miwa K, Oboyama S, Sugiyama K, Sasaki T. Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 1999;5:1823-9.

145. Yu X-M, Lo C-Y, Chan W-F, Lam K-Y, Leung P, Luk JM. Increased expression of vascular endothelial growth factor C in papillary thyroid carcinoma correlates with cervical lymph node metastasis. *Clin Cancer Res.* 2005;11:8063-9.

146. Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1α in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer.* 2000;88:2006-18.

147. Zhong H, de Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1α in common human cancers and their metástases. *Cancer Res.* 1999;59:5830-5.

148. Zlobec I, Steele R, Michel RP, Compton CC, Lugli A, Jass JR. Scoring of p53, VEGF, Bcl-2 and APAF-1 immunohistochemistry and interobserver reliability in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2006;19:1236-42.

APÊNDICES

Apêndice A

Aprovação do Protocolo de Pesquisa 283/06 pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) em 27 de abril de 2006.

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

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27.04.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **283/06**, intitulado: **"Detecção de marcadores moleculares em espécimes tireoideanos obtidos por punção aspirativa por agulha fina"** apresentado pelo Departamento de **RADIOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai**
Pesquisador (a) Executante: **Dr. Renê Gerhard**

CAPPesq, 27 de Abril de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos. 225, 5º andar - CEP 05403 010 – São Paulo – SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 – e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Apêndice B

Parecer sobre o Protocolo de Pesquisa 283/06 pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) em 27 de abril de 2006.

HC

Diretoria Clínica

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq.

PARECER

PROTOCOLO DE PESQUISA Nº: 283/06	Data de entrada: 04/04/2006 Sessão de: 27/04/06

TÍTULO DA PESQUISA: **Detecção de marcadores moleculares em espécimes tireoideanos obtidos por punção aspirativa por agulha fina**
PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Profa Dra Maria Aparecida Nagai
PESQUISADOR(A) EXECUTANTE: Dr René Gerhard
DEPARTAMENTO: Radiologia

CONSIDERAÇÕES DO RELATOR APROVADAS PELO PLENÁRIO:

Projeto de tese de Doutorado, retrospectivo, cujo objetivo primário é avaliar a ocorrência de alguns genes específicos como marcadores de malignidade, em fragmentos tireoidianos obtidos por punção aspirativa por agulha fina. O projeto será relizado em amostras previamento estocadas na divisão de Anatomia Patológica a partir de 1999 Previsto para ser executado em 3 anos, o projeto não prevê financiamento, entretanto os pesquisadores do LIM-24 atestam possuir infraestrutura para custear as análises laboratoriais previstas. O TCLE não se aplica , entretanto vale ressaltar **a necessidade de se manter sigilo e confidencialidade das informações contida no protocolo**..

x☐ APROVAR	☐ REPROVAR
☐ **DEVOLVER PARA MODIFICAÇÕES**	☐ CIENTE

TEMÁTICA ESPECIAL:	☐ SIM	x☐ NÃO
CONEP:	☐ SIM	x☐ NÃO
SVS (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA):	☐ SIM	x☐ NÃO

Profº Euclides Ayres de Castilho
Presidente
Comissão de Ética P/ Análise
de Projetos de Pesquisa

Apêndice C

Parecer sobre a alteração de título do Protocolo de Pesquisa 283/06 pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) em 10 de outubro de 2007.

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS

PROTOCOLO
Local: Pós-Graduação
Recebido por:
Data: 16/10/07

Ref: Carta datada de 11.08.07

Ao
Departamento de Radiologia

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 03.10.07, tomou conhecimento da **alteração de título** do Protocolo de Pesquisa nº **283/06** "Detecção de marcadores moleculares em espécimes tireoideanos obtidos por punção aspirativa por agulha fina" **para** "***Estudo da expressão imuno-histoquímica de marcadores moleculares em espécimes tireoideanos através de Tissue Microarrays***", conforme parecer anexo.

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai**

Pesquisador (a) Executante: **Dr. René Gerhard**

CAPPesq, 10 de outubro de 2007.

Ciente,
Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador da Pós-Graduação
Área de Oncologia
FMUSP

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos. 225, 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
matc

Apêndice D

Aprovação do Projeto de Pesquisa 1081/08 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital A.C. Camargo em 18 de junho de 2008.

Hospital A.C.Camargo

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 18 de Junho de 2008.

Ao
Dr. Fernando Augusto Soares

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1081/08
"Estudo da expressão imuno-histoquímica de marcadores moleculares em espécimes tireoideanos por Tissue Microarrays".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo, em sua última reunião de 10/06/2008, **aprovaram** a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Justificativa da não apresentação do Orçamento Financeiro;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo;
- Carta de aprovação do projeto na Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa – CAPPesq/FMUSP;
- Carta de aprovação do projeto na Comissão de Pesquisa para Análise de Projetos de Pesquisa – FMUSP.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Rua Prof. Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo – SP CEP 01509-900 - CNPJ 60.961.968/0001-06
Tel/Fax (0XX11) 2189.5020 – cep_hcancer@hcancer.org.br

Apêndice E

Parecer sobre o Projeto de Pesquisa 1081/08 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital A.C. Camargo (página 1).

PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto: 1081/08

Título: "Estudo da expressão imuno-histoquímica de marcadores moleculares em espécimes tireoideanos através de *Tissue Microarrays*"

Pesquisador Responsável: Dr. Fernando Augusto Soares

Aluno: Renê Gerhard (Doutorado – USP)

Orientador na Instituição Vinculada: Dra. Maria Aparecida Nagai (FMUSP)

Comentários Gerais:

Trata-se de um estudo de marcadores moleculares aplicados a neoplasias da tireóide, ligados direta ou indiretamente à angiogênese tumoral.

Serão analisados os marcadores **NDRG1** (associada à parada do crescimento celular), **SPARC** (osteonectina – família de genes relacionadas à regulação da síntese de matriz extracelular e diminuição da adesividade à matriz), **VEGF-A** (regulador de angiogênese), **VEGF-C** (linfangiogênese) **Flk1/KDR** (VEGFR-2)(mediador da ação angiogênica do VEGF-A), **HIF-1a** (as subunidades de HIF-1, HIF-1a e HIF-1b – sob hipóxia iniciam transcrição de fatores relacionados à angiogênese e sobrevivência celular). O estudo será aplicado em TMA incluindo tireóide normal, adenoma folicular, carcinoma folicular, carcinoma papilífero, carcinoma pouco diferenciado e metástases (folicular e papilífero).

Adequação do título:

O título é adequado.

Adequação da revisão de literatura:

A literatura revisada é ampla e adequada.

Adequação dos objetivos frente à literatura:

Objetivos adequados.

Desenho e metodologia do projeto (grupos experimentais, procedimentos, indicadores de resultado, tipo de estudo, fase da pesquisa):

O estudo, retrospectivo, pretende utilizar imunoistoquímica em TMA, com amostra de 239 tireóides (mencionados apenas na folha de rosto do SISNEP e não no projeto) para os marcadores indicados, associados a uma planilha com seguimento clínico dos pacientes, em arquivos da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da FMUSP. A metodologia de contagem está detalhada e adequada, sendo utilizados testes de correlação, estimativas de sobrevida por Kaplan Meier comparando-se as curvas com modelo de riscos proporcionais de COX.

Critério de participação (recrutamento, critérios de inclusão/exclusão, interrupção da pesquisa):

Não mencionados.

Análise crítica de riscos:

Não há.

Apêndice F

Parecer sobre o Projeto de Pesquisa 1081/08 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital A.C. Camargo (página 2).

Termo de consentimento livre e esclarecido:
Solicitada a dispensa por se tratar de estudo retrospectivo.

Duração total da pesquisa:
12 meses

Explicitação das responsabilidades:
- **do pesquisador:** explicitas.
- **do patrocinador:** não se aplica.

Local de pesquisa:
Disciplina de Oncologia, Departamento de Radiologia, FMUSP; Divisão de Anatomia Patológica, Departamento de Patologia FMUSP, Departamento de Anatomia Patológica, Hospital A.C. Camargo.

Fonte financeira:
Solicitada a dispensa da apresentação do orçamento.

Parecer da CENP:
Aprovado com probabilidade alta de sucesso do projeto.

Comentários finais:
Trata-se de projeto relevante, bem estruturado e com boa revisão da literatura. Tem alta probabilidade de conclusão com êxito.

Parecer Final:
Projeto Aprovado

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
Hospital do Câncer A. C. Camargo
Comitê de Ética em Pesquisa
Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador

Apêndice G

Ata do Exame de Qualificação (18 de novembro de 2008).

MEDICINA
USP

Comissão de Pós-Graduação

ATA DE EXAME DE QUALIFICAÇÃO

O(A) aluno (a) **RENÊ GERHARD** - matrícula **1684412** - curso de **Doutorado** do Programa de Pós-Graduação em ONCOLOGIA , submeteu-se ao exame de qualificação, perante a Comissão Examinadora, atendendo ao disposto no Regimento da Pós-Graduação da Universidade de São Paulo (Res.CoPGr.4678/99 - Capítulo III - Seção IV).

A Comissão Examinadora, indicada pela Comissão de Pós-Graduação da FMUSP, é de parecer que:

O aluno apresentou aula com boa didática, demonstrando conhecimento sobre o tema. Na introdução do tema o aluno deve enfocar melhor o direcionamento à escolha dos marcadores e aos objetivos do projeto. Os resultados devem ser revistos frente aos questionamentos dos bancas examinadoras. A parte da discussão não foi apresentada, espera-se que na versão final esta aborde todos os aspectos dos resultados obtidos e da organização realizada.

Membros Participantes da Comissão Examinadora
Assinale com um "X" - Aprovado (APR) ou Reprovado (REP) e assine

São Paulo, 18 de Novembro de 2008

(X) APR ( ) REP - André Lopes Carvalho - Titular

(X) APR ( ) REP - Chin Jia Lin - Titular

( ) APR ( ) REP - Igor Moyses Longo Snitcovsky - Titular

(X) APR ( ) REP - Edna Teruko Kimura - Suplente

( ) APR ( ) REP - Luiz Paulo Kowalski - Suplente

Apêndice H

Parecer da CAPPesq sobre o Relatório Parcial do Projeto de Pesquisa 0283/06 em 5 de fevereiro de 2009.

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

CIÊNCIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 04.02.09, **tomou ciência** do ***Relat ório Parcial do Estudo*** referente ao Protocolo de Pesquisa nº **0283/06**, intitulado: **"Estudo da expressão himunohistoquimica de marcadores moleculares em espécimes tireoideanos através de tissue microarrays"**, apresentado pelo **Departamento de Radiologia**

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai**

CAPPesq, 05 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão
de Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Apêndice I

Dados do aluno de pós-graduação no sistema Fenixweb da Universidade de São Paulo, no qual consta o título atual do estudo cuja alteração havia sido sugerida pelos membros da Banca do Exame de Qualificação.

Banca de Defesa | Banca ExQua | Ata ExQua

ELIZANGELA (*ONCOLOGIA*)

Documento sem validade oficial .

Matrícula 1684412

Nome do Aluno RENÊ GERHARD

Aluno Especial NÃO

E-mail regerhard@terra.com.br

Área de Concentração ONCOLOGIA

Nível DD

Mestrado Anterior

Data (Reconhecimento do Título)

Nova matrícula

Instituição de Mestrado Anterior

Área

Data Obtenção Título Mestre

Data de Início 04/07/2005

Prazo Final 04/07/2009

Data da Matrícula 04/07/2005

Resolução /98

Data (Transferência do Nível ME/DO)

Orientador MARIA APARECIDA NAGAI

Programa NÃO

Co-Orientador

Data (Entrada do Co-orientador)

Prorrogação do Prazo

Número de dias

Data (Início da Prorrogação)

Data (Entrega do Plano Pesquisa) 16/12/2008

Título Plano Pesquisa
"Avaliação do papel diagnóstico e prognóstico da expressão imuno-histoquímica de NDRG1, Osteonectina, VEGF-A, VEGF-C, Flk-1/KDR, HIF-1a e Galectina-3 em espécimes tireoideanos por tissue microarrays"

Disciplinas			**Créditos**	**Conceito**
Exigidos	0	**Obtidos**	0	

Data (Declaração de Apto)

Data (Exame de Qualificação) 18/11/2008

Data (Depósito do Trabalho)

Título Trabalho

Situação Aluno:
matrícula de acompanhamento - 07/02/2009

Voltar para Menu