



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA

JANAÍNA STEGER DE OLIVEIRA COSTA PIRES

**Avaliação Imuno-histoquímica de VEGF-C e COX-2
em Carcinomas Papilíferos de Tireoide**

Dissertação de Mestrado

Goiânia
2013

JANAÍNA STEGER DE OLIVEIRA COSTA PIRES

**Avaliação Imuno-Histoquímica de VEGF-C e COX-2
em Carcinomas Papilíferos de Tireoide**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida Saddi

Goiânia
2013

ATA COMPLEMENTAR Nº 76/2013

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
DISCENTE: JANAINA STEGER DE OLIVEIRA COSTA PIRES
DEFENDIDA EM 28 DE JUNHO DE 2013 E APROVADA COM CONCEITO 0

BANCA EXAMINADORA

Vera Aparecida Saddi
.....
Dr^a Vera Aparecida Saddi
(presidente-orientadora)

Flávia Melo Rodrigues
.....
Profa. Dra. Flávia Melo Rodrigues
(membro interno)

Denise Gonçalves Pereira
.....
Prof^a Dra Denise Gonçalves Pereira / Fac. Estácio de Sá de Goiás
(membro externo)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, esposo e filhos por estarem sempre presentes, estimulando-me e incentivando-me a prosseguir nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Preliminarmente, quero agradecer a Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais, Neusa Maria Steger de Oliveira Costa e Telêmaco Carlos dos S.C. Leite, pela presença constante em meu caminhar. A vocês devo a vida, por guiarem meus passos dando-me força e coragem para seguir em frente.

Ao meu esposo Antônio Pires Pereira Neto pelo imenso companheirismo e incentivo recebido ao longo desses anos. Em especial aos meus queridos filhos Vinícius Steger Pires e Fabrício Steger Pires por estarem sempre presentes em minha vida e em meu coração.

À minha irmã Fernanda Steger e ao meu cunhado Rhaynemann Rogério pelos momentos felizes e pelo suporte em momentos importantes de minha vida. À querida Ironilda Maria do Nascimento pela ajuda nas tarefas de casa e pela convivência diária. À minha prima Isadora Steger pela amizade e incentivo.

Aos meus amigos de trabalho Glenda Batista, Jaciane Soares de Sá, Paulo Paim, Guilherme Pires e Susy Ricardo Lemes cujos convívios são fontes de estímulos pessoal e profissional.

A minha orientadora, Dra. Vera Aparecida Saddi, pela atenção, conselhos e apoio que sempre foram fundamentais na construção deste trabalho. Agradeço sua incontestável ajuda.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, em especial a professora Dra. Flávia de Melo pela paciência, gentileza e ensinamentos que muito contribuíram para meu crescimento acadêmico.

Por fim, o meu profundo agradecimento a todas as pessoas que colaboraram para concretização dessa dissertação, estimulando-me emocional e intelectualmente.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ACCG	Associação de Combate ao Câncer de Goiás
AGES	<i>Age, Grade, Extracapsular spread, and Size</i> (do inglês, Idade, Grau, Extravasamento Extracapsular e Tamanho)
AMES	<i>Age, Metastasis, Extracapsular tumor, and Size</i> (do inglês, Idade, Metástase, Invasão de tecido adjacente e Tamanho)
CAT	Carcinoma Anaplásico da Tireoide
CMT	Carcinoma Medular da Tireoide
CPT	Carcinoma Papífero da Tireoide
CFT	Carcinoma Folicular da Tireoide
CMT	Carcinoma Anaplásico da Tireoide
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
DIT	Diiodotirosina
HAI	Hospital Araújo Jorge
HLA	Sistema Leucocitário Humano
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IHQ	Imuno-Histoquímica
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEN	Neoplasia Endócrina Múltipla
MIT	Monoiodotirosina
MS	Ministério da Saúde
NCDB	<i>National Cancer Date Base</i> (do inglês, Base de Dados Nacional de Câncer)
NIS	Co-transportador de Sódio e Iodeto
NTRK1	Receptor de Tirosina – Quinase Neurotrófico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PI3K	Fosfatidilinositol-3 Quinase

SEER	<i>Surveillance Epidemiology and End Results Program</i> (do inglês, Vigilância Epidemiologia e do Programa de Resultados Finais)
TPO	Tireoperoxidase
TSH	Hormônio estimulante do tireoide
T3	Hormônio tireoidiano (triiodotironina)
T4	Hormônio tireoidiano (tetraiodotironina)
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo
VEGF	Vascular Endothelium Growth Factor (do inglês, Fator de Crescimento Endotelial Vascular)
VEGF-A	Vascular Endothelium Growth Factor – A (do inglês, Fator de Crescimento Endotelial Vascular –A)
VEGF-B	Vascular Endothelium Growth Factor – B (do inglês, Fator de Crescimento Endotelial Vascular –B)
VEGF-C	Vascular Endothelium Growth Factor – C (do inglês, Fator de Crescimento Endotelial Vascular –C)
VEGF-D	Vascular Endothelium Growth Factor – D (do inglês, Fator de Crescimento Endotelial Vascular –D)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.	Peça cirúrgica (A) e Fotomicrografia mostrando aspectos histológicos de carcinoma papilífero de tireóide	20
Figura 2.	Peça cirúrgica (A) e Fotomicrografia mostrando aspectos histológicos de carcinoma folicular de tireóide	21
Figura 3.	Peça cirúrgica (A) e Fotomicrografia mostrando aspectos histopatológicos de carcinoma medular de tireóide	24
Figura 4.	Tipos de translocações detectadas nos oncogenes RET/PTC 1 a 10 descritas em carcinomas papíferos de tireóide.	30
Figura 5.	Esquema demonstrando as ações fisiológicas da ciclooxigenase	37
Tabela 1.	Revisão dos estudos da literatura que investigaram a expressão de COX-2 e VEGF-C em Carcinoma Papilífero de Tireóide	39
Tabela 2.	Análise descritiva dos pacientes com carcinoma papilífero da tireoide em relação ao gênero e idade	44
Tabela 3.	Análise descritiva dos pacientes com carcinoma papilífero da tireóide em relação à presença de metástase linfonodal e metástase à distância	44
Tabela 4.	Análise descritiva dos pacientes com carcinoma papilífero da tireóide em relação à invasão capsular e invasão de tecido adjacente	45
Tabela 5.	Análise comparativa investigando as possíveis associações entre os aspectos clínicos e a expressão das proteínas COX-2 e VEGF-C em 165 pacientes com CPT	46

SUMÁRIO

RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEORICO.....	17
2.1 Anatomia e fisiologia da glândula tireoide.....	17
2.2 Tumores Tiroideanos	18
2.2.1 Carcinoma Papilífero de Tireóide	19
2.2.1.1 Aspectos Clínicos do CPT	20
2.2.2 Carcinoma Folicular da Tireóide (CFT).....	21
2.2.3 Carcinomas Anaplásicos da Tireóide (CAT)	22
2.2.4 Carcinoma Medular da Tireóide (CMT).....	23
2.3 Epidemiologia dos Carcinomas Papilíferos da Tireoide.....	25
2.4 Fatores de Risco para o desenvolvimento dos Carcinomas Papilíferos de Tireoide.....	26
2.5 Fatores Prognósticos para os Carcinomas Papilíferos da Tireóide	28
2.6 Genética dos Carcinomas Papilíferos de Tireóide	28
2.7 A Imuno-histoquímica na Patologia Cirúrgica	31
2.8 Angiogênese - Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF).....	32
2.8.1 VEGF e seus Receptores	32
2.8.2 Angiogênese e Hipóxia	34
2.8.3 Germinação das Células Endoteliais	34
2.9 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF C), Angiogênese e Linfangiogênese	35
2.10 VEGF-C em Carcinoma Papilífero de Tireóide	36
2.11 Cicloxigenase-2 (COX- 2).....	36
2.12 COX-2 em Carcinomas Papilíferos de Tireóide	38
2.13 Expressão de VEGF-C e COX-2 em Carcinomas Papilíferos de Tireóide....	38
3. OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos Específicos.....	40

4. METODOLOGIA	41
4.1 Sujeitos da Pesquisa	41
4.2 Análise Imuno-histoquímica	42
4.3 Análise Estatística	43
5. RESULTADOS.....	44
5.1 Grupo de Estudo.....	44
5.2 Associações investigadas entre a expressão de COX-2 e VEGF-C com os aspectos clínicos e histopatológicos.....	45
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO	50
8. REFERÊNCIAS.....	51
ANEXOS	59

RESUMO

O câncer de tireóide é a neoplasia maligna mais comum do sistema endócrino. Embora seja uma patologia relativamente rara, responsável por aproximadamente 1% dos novos casos de doenças malignas, uma tendência no aumento de sua incidência tem sido reconhecida em várias partes do mundo. O objetivo desse estudo consistiu em avaliar a expressão de COX-2 e VEGF-C em pacientes diagnosticados com Carcinoma Papilífero da Tireóide (CPT) em Goiânia, bem como as possíveis associações entre a expressão desses marcadores e os seguintes fatores: metástase linfonodal, metástase à distância, tamanho do tumor, idade, extravasamento/invasão de tecidos adjacentes e gênero. Para isso foram analisados 165 casos de carcinomas papilíferos de tireoide diagnosticados no Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, em Goiânia, Goiás. A análise molecular foi feita por imuno-histoquímica. Análises estatísticas descritiva e comparativa com o teste Chi-quadrado foram usadas nesse estudo. O estudo avaliou 165 pacientes com diagnóstico histopatológico comprovado de CPT. A análise imuno-histoquímica da expressão de COX-2 e VEGF-C, possibilitou a classificação da expressão de COX-2 e VEGF-C em dois grupos, sendo um com expressão $\leq 50\%$ para COX-2 e VEGF-C (90 casos/ 54,5%; 102 casos/ 40,6%), e outro com expressão $> 50\%$ (50 casos/ 30,3%; 62 casos/ 37,6%). Associações estatisticamente significativas foram observadas entre o tamanho ($p=0,0048$; $p<0,0001$) e invasão de tecido adjacente ($p=0,0006$; $p<0,0001$) com a hiperexpressão de COX-2 e VEGF-C, e também entre metástase linfonodal ($p<0,0001$) com a expressão de VEGF-C. Os dados obtidos demonstraram que a superexpressão de COX-2 e VEGF-C nos CPT podem ser importantes biomarcadores moleculares no prognóstico do carcinoma papilífero de tireóide. Nossos resultados corroboram com outros estudos que demonstraram a utilidade dessas proteínas na identificação de pacientes com CPT, com maior risco de progressão da doença por sua associação com a presença de metástases para linfonodos regionais e com a invasão de tecido adjacente.

Palavras-chave: Carcinoma Papilífero da Tireóide, Imuno-histoquímica; VEGF-C; COX-2.

ABSTRACT

Thyroid câncer is the most common endocrine system malignant neoplasia. Although it is a relatively rare pathology, responsible for approximately 1% of new malignant disease cases, there has been recognized all over the world a tendency to increase its incidence. This study aimed to evaluate the expression of COX-2 and VEGF-C in patients diagnosed with Thyroid Papillary Carcinoma (TPC) in the city of Goiania, Goias State, Brazil, as well as the possible associations between this expression markers and the following factors: lymph node metastasis, distant metastasis, tumor size, age, adjacent tissue invasion and gender. In this regard, 165 thyroid papillary carcinoma cases diagnosed at the Araujo Jorge Hospital Patologic Anatomy Department in Goiania, Goias State, Brazil were analyzed. The molecular analysis was held by immunohistochemistry. Descriptive and comparative statistical analysis using Chi square test were held in this study. The study evaluated 165 patients who had documented histopathologic TPC diagnosis. The immunohistochemical analysis of the expression COX-2 e VEGF-C made possible to classify the expression COX-2 e VEGF-C in two groups, one of them with the expression $\leq 50\%$ to COX-2 and VEGF-C (90 cases/ 54,5%; 102 cases/ 40,6%), and the other one with the expression $> 50\%$ (50 cases/ 30,3%; 62 cases/ 37,6%). Significant statistical associations were observed between the size ($p=0,0048$; $p<0,0001$) and adjacent tissue invasion ($p=0,0006$; $p<0,0001$) with the expression of COX-2 and VEGF-C, and also between lymph node metastasis ($p<0,0001$) with expression VEGF-C. The collected data showed that the over expression COX-2 and VEGF-C in TPC cases can be important molecular biomarkers in thyroid papillary carcinoma prognosis. Our results corroborate to other studies that demonstrated the usability of these proteins to identify TPC patients, with a higher risk of disease progression because of its association with the presence of regional lymph node metastasis and with adjacent tissue invasion.

Keywords: Thyroid Papillary Carcinoma, immunohistochemistry; VEGF-C; COX-2.

1. INTRODUÇÃO

A palavra câncer origina-se do grego *KarKinos* e Hipócrates, o pai da medicina foi quem a utilizou pela primeira vez entre 460 a 377 a.C. O fato de ter sido detectado em múmias egípcias comprova que o câncer não é uma doença nova e que já comprometia o homem a mais de 3 mil anos antes de Cristo (INCA,2008^a). No Brasil, a morte ocasionada por neoplasias aumentou de forma considerável nas últimas décadas. A mortalidade por câncer em 2004 representou 13,7% de todos os óbitos registrados no país, acompanhando o crescimento de mortalidade relacionada às doenças do aparelho cardiovascular (INCA, 2008b). O câncer é resultante de alterações que se acumulam no material genético (DNA) de uma célula e por essa razão, é considerada uma doença genética (INCA, 2008a; ROCHA & FERREIRA, 2010). Portanto, identificar e caracterizar genes alterados no câncer pode ser de grande valia para a compreensão das bases moleculares da doença (GARNIS et al., 2004; ROCHA & FERREIRA, 2010).

A função e a integridade de um tecido são garantidas pelo equilíbrio entre a proliferação e morte celular, por meio de um complexo sistema de sinalização intra e extracelular. Quando ocorre a perda desse equilíbrio, as células proliferam-se de forma anômala, constituindo-se em um tumor primário. Adquirem maior capacidade de multiplicação, e são capazes de transmitir geneticamente essa mutação para todas as células que se originarem a partir dela (INCA, 2008a; ROCHA & FERREIRA, 2010).

O processo de carcinogênese pode ocorrer de forma espontânea ou provocada pela ação de agentes carcinogênicos (físicos, químicos ou biológicos) (INCA, 2008a). Em ambas a situações, nota-se a indução de alterações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, amplificação gênica, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos, onde os principais grupos de genes envolvidos são: proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados ao reparo de DNA (ROCHA & SILVA, 2003).

Várias formas de crescimento celular controladas e não controladas são conhecidas. A hiperplasia, a metaplasia e a displasia são formas de crescimentos

controlados. As neoplasias são formas de crescimento não controlados, conhecidas como tumores. Atualmente, define-se neoplasia como uma multiplicação anormal de um tecido que foge parcialmente ou totalmente ao controle do organismo (INCA, 2008a; ROBBINS & COTRAN, 2010).

A classificação mais utilizada para diferenciação de tumores benignos de malignos, leva em consideração aspectos básicos como, o comportamento biológico do tumor e a histogênese. Compreender esta diferença, talvez seja umas das etapas mais importantes do estudo das neoplasias (INCA, 2008a).

A evolução de uma neoplasia maligna envolve várias etapas, que geralmente dependem da velocidade do crescimento tumoral, do órgão sede do tumor, de fatores ambientais e ainda de fatores constitucionais do hospedeiro (INCA, 2008b).

Dentre os diferentes tipos de câncer, o de tireóide é considerado o mais comum da região de cabeça e pescoço. A presença de um nódulo na glândula tireóide nem sempre implica na ocorrência de uma neoplasia. No entanto, a ocorrência de um nódulo tireoidiano em indivíduos com história familiar de câncer na tireóide, exposição à radiação ionizante, sintomas como rouquidão, bem como presença de linfanodomegalia são considerados fatores indicativos de um câncer tireoidiano (INCA, 2008b; VARTANIAN, 2013).

Nódulos tireoidianos são comuns, com prevalência de 20% - 50% em exames ultrassonográficos, entretanto, o câncer de tireóide corresponde a 1% das neoplasias malignas diagnosticadas e incide em 5% desses nódulos. Apesar do carcinoma de tireóide ser a neoplasia endócrina mais comum, ainda é considerado um tipo raro de câncer (SIIRONEN et al., 2006; ERDEM et al., 2011; BAI JI et al., 2012; VARTANIAN, 2013).

O Carcinoma Papilífero da Tireóide (CPT) é o subtipo histológico mais comum. É um tipo de neoplasia que apresenta características peculiares, dentre elas, a idade e a falta de associação da sobrevida com a presença de metástases linfáticas (ML) (SIIRONEN et al, 2006). Estudos revelam que a presença de ML, está associada com o aumento da taxa de recidiva loco-regional da doença, mas não com a sobrevida (SIIRONEN et al., 2006; HORTA et al., 2009; BERGELIN et al.,2010). No entanto, alguns estudos relatam que em pacientes mais idosos, a

presença de ML gera um efeito negativo na sobrevida do indivíduo (STURGIS et al., 2006; SIIRONEN et al., 2006; HSUEH et al., 2011). As metástases linfáticas são comuns nos carcinomas papilíferos da tireóide e mais frequentes entre os pacientes jovens, cujo prognóstico é excelente (SIIRONEN et al., 2006; MIAO et al., 2009; YONG et al., 2012). Em indivíduos jovens, as células metastáticas em linfonodos regionais não apresentam a capacidade de crescimento em outros órgãos (CADY, 1998; SIIRONEN et al., 2006).

Após a confirmação diagnóstica, o tratamento do carcinoma papilífero da tireóide é baseado na tireoidectomia (total ou quase total), ablação do remanescente tireoideano com radioiodo e supressão do hormônio estimulante da tireóide (TSH) com administração de doses de levotiroxina. Um estudo envolvendo pacientes com carcinoma papilífero da tireóide revelou um índice de recidiva local e metástases para linfonodos em 14% a 19% dos pacientes submetidos à lobectomia respectivamente (HAY et al., 1998). Índices menores de recorrência local e metástases para linfonodos de 2% a 6% respectivamente, foram encontrados nesse mesmo estudo em pacientes submetidos à tireoidectomia total (NÓBREGA, 2008; VARTANIAN, 2013)

A tireoidectomia total, portanto, é considerada o procedimento de escolha para pacientes com carcinomas papilíferos da tireóide, inclusive para aqueles classificados como de baixo risco. Pacientes com diagnóstico no pós-operatório de carcinoma papilífero da tireóide que realizaram lobectomia devem ser submetidos posteriormente à tireoidectomia em um segundo tempo cirúrgico (SHUSHANOV et al., 2000; HANAHAN & WEINBERG, 2000; CHEN et al., 2009).

Segundo o Consenso Europeu (PACINI et al., 2006), a administração de iodo 131 deve ser feita após a cirurgia para eliminação dos remanescentes tireoideanos, diminuindo os índices de recorrência da doença por meio da eliminação de focos microscópicos. Indivíduos de muito baixo risco, aqueles com tumores menores que 1,5 cm, sem invasão extratireoideana e sem comprometimento para linfonodos não são beneficiados pela radioiodoterapia (NÓBREGA, 2008).

O hipotireoidismo ocorre após o procedimento cirúrgico e para que ele seja corrigido, doses suprafisiológicas de levotiroxina sódica são impostas no tratamento

do carcinoma papilífero de tireóide, já que o crescimento de células tumorais são dependentes de TSH (COOPER & COLS,2006).

A recomendação da Sociedade Americana de Tireóide (COOPER & COLS, 2006) é inicialmente manter, o TSH menor do que 0,1 mU/L em pacientes de alto risco e no limite inferior da normalidade (0,1 e 0,5mU/L) em pacientes de baixo risco, já que não existe benefício em manter o TSH em níveis menores no último grupo.

Apesar do carcinoma papilífero de tiróide ser considerado um tumor de ótimo prognóstico, o potencial de malignidade desses tumores não pode ser menosprezado. Assim, a busca por marcadores moleculares associados aos fatores de pior prognóstico torna-se relevante no sentido planejar protocolos terapêuticos mais eficientes e de selecionar pacientes candidatos ao tratamento com novas drogas, especialmente aquelas dirigidas para alvos moleculares específicos, como é o caso da cicloxigenase – 2 (COX-2) e do fator de crescimento vascular C (VEGF-C).

2. REFERENCIAL TEORICO

2.1 Anatomia e fisiologia da glândula tireoide

A glândula tireóide se desenvolve do endoderma e está ligada à parte faríngea do aparelho digestório. Localiza-se na porção anteroinferior do pescoço, onde se divide em dois lobos interligados por um istmo, que se encontra abaixo da cartilagem tireóide, à frente da traqueia (VARTANIAN, 2013). Os dois lobos da tireóide adulta pesam em média, cerca de 20 gramas, sendo que cada lobo tem cerca de quatro centímetros em seu maior diâmetro. É através das artérias tireocervicais e inervação advinda do sistema nervoso autônomo que a glândula obtém um rico aporte sanguíneo e nervoso (BERNE et al., 2004; ROBBINS & COTRAN et al., 2010; RUBIN et al., 2010).

Microscopicamente, o parênquima da glândula tireóide está organizado em folículos, que apresentam em média 200 a 300 µm de diâmetro. Tais folículos são envolvidos por um epitélio, no qual as características dependem da demanda de hormônio tireoidiano. Na luz folicular, o hormônio secretado é armazenado na forma de colóide, uma substância proteínácea, eosinófila de aspecto vítreo. Além das células foliculares epiteliais, a glândula tireóide contém as células parafoliculares, denominadas células C, que estão entremeadas com células epiteliais foliculares, ou que ficam no espaço intersticial. As células C produzem calcitonina, um hormônio que reduz a concentração de cálcio sanguíneo (BERNE et al., 2004; ROBBINS & COTRAN et al., 2010).

Os produtos secretados pela glândula tireóide são a triiodotironina (T3) e a tetraiodotironina (T4), compostos resultantes da união de duas moléculas de tirosina iodadas e a calcitonina, hormônio protéico que pode influenciar o metabolismo do cálcio. A tetraiodotironina (T4), é um pro-hormônio, enquanto que a molécula T3 é o principal efetor da função da tireóide, sendo responsável pela maioria das ações tissulares do hormônio tireoidiano (ROBBINS & COTRAN, 2010; VARTANIAN, 2013). O bom funcionamento da glândula tireóide depende do iodeto,

que exerce um importante papel. O iodeto fica concentrado nas glândulas gástricas, salivares, lacrimais, mamárias e também no plexo coróide. Seu conteúdo total é aproximadamente 7.500 µg, que estão na forma de iodotironinas (BERNE et al., 2004).

Em condições de equilíbrio, 1% do total de iodeto é diariamente liberado, que será secretado como hormônio tireoidiano ou como iodeto livre. Um sistema chamado de co-transportador de sódio e iodeto, (NIS) permite que iodeto seja transportado ativamente para o interior da célula (Berne et al., 2004). Dentro da glândula tireóide, o iodeto move-se para a superfície apical das células epiteliais e, posteriormente, é encaminhado para a luz folicular por meio de um transportador de iodeto-cloreto independente, conhecido por pendrina. Consequentemente, o iodeto é oxidado, transformado em iodo e incorporado em moléculas de tirosina, moléculas essas unidas por ligações peptídicas dentro da partícula de tireoglobulina. A tireoglobulina é iodada para sintetizar monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT) (BARRA et al., 2004; BERNE et al., 2004).

A síntese de T4 é elaborada a partir da iodação de duas moléculas de DIT, enquanto que uma molécula de MIT e outra de DIT são ligadas para formar T3. Um complexo enzimático localizado na membrana apical, chamado de tireoperoxidase (TPO), é responsável pela a sequência de reações catalisadas. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é o oxidante imediato para a reação iodeto – iodo e para a formação de H₂O₂ na tireóide, necessário à redução do oxigênio pelo NADPH. A expressão do gene NIS é inibida pelo iodeto e estimulada pelo TSH (BERNE et al., 2004; TOUZOPOULOS et al., 2011).

2.2 Tumores Tiroideanos

A Organização Mundial da Saúde classificou os cânceres de tireóide como: Carcinomas papilíferos, Carcinomas foliculares e Carcinomas medulares e anaplásicos (DELELLIS et al., 2004).

Devido às características clínicas e biológicas únicas associadas a cada variante de carcinoma tireoidiano, esses subtipos serão descritos separadamente:

2.2.1 Carcinoma Papilífero de Tireóide

O carcinoma papilífero de tireóide, corresponde a 90 % dos casos. (RUBIN, 2010; CABRUZZI et al., 2011; VARTANIAN, 2013). As lesões no carcinoma papilífero da tireóide (CPT), variam de tumores maiores que a glândula normal até lesões microscópicas, podendo ser únicas ou multifocais, de tamanhos variados, com margens mal definidas, alguns circunscritos ou até mesmo encapsulados e outros podem se infiltrar no parênquima adjacente (SCIUTO et al., 2009; ROBBIN & COTRAN, 2010; RUBIN, 2010; KRAWCZYK-RUSIECKA et al., 2011; VARTANIAN, 2013).

Nos cânceres papilíferos da tireóide, tumores medindo menos que 1 mm podem ser identificados em grande proporção. No entanto, metástases linfonodais, nesses casos, são raras. O aspecto arenoso, firme e pálido pode ser visto nas lesões no momento da análise macroscópica (LISKA et al., 2005; ROBBINS & COTRAN, 2010). Na análise microscópica observam-se papilas ramificadas, com uma haste fibrovascular coberta por uma camada múltipla de células epiteliais cubóides, variados tamanhos e com margem mal definidas (VERBURG et al., 2009; SCIUTO et al., 2009; RUBIN et al., 2010).

No CPT, as células são diferentes na captação e concentração de iodo, bem como na produção do hormônio tireoidiano. Múltiplas variantes histológicas são observadas no CPT, dentre elas as variantes foliculares, variantes encapsuladas, difusas esclerosantes e oxifílicas (LISKA, 2005; VERBURG, 2009; CABRUZZI et al., 2011). A variante folicular é a mais comum e apresenta uma estrutura quase folicular, porém, apresenta um núcleo característico de carcinoma papilífero (VERBURG et al., 2009). As células do CPT possuem em seus núcleos uma cromatina dispersa, o que nos fornece uma aparência clara. O epitélio que recobre as papilas consiste em células cubóides e anaplásicas, bem diferenciadas e uniformes, o que revela uma variação morfológica, celular e nuclear (Figura 1).

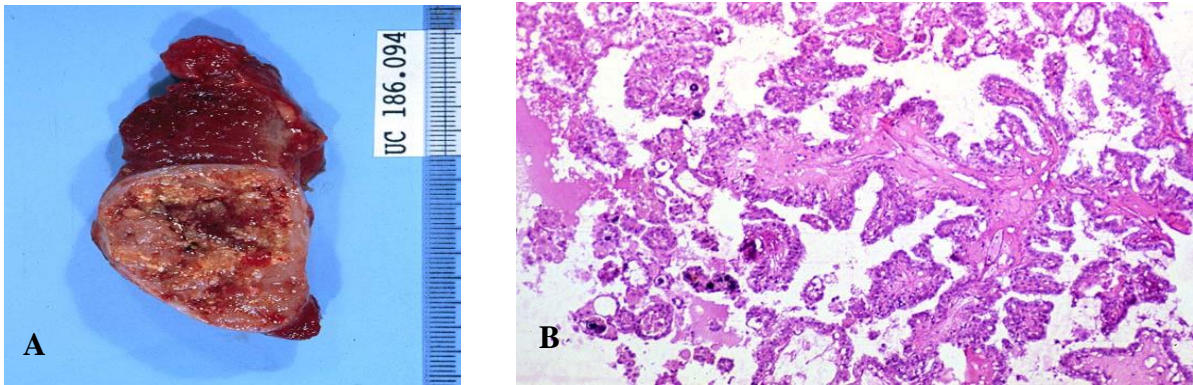


Figura 1. Peça cirúrgica (A) e fotomicrografia mostrando aspectos histológicos de carcinoma papilífero de tireóide. Fonte: CAMBOIM et al (2009).

Metástases à distância ocorrem em 1% a 25% dos pacientes, enquanto que a metástase para linfonodos cervicais são estimadas em mais da metade dos casos (REYNOLDS et al., 2006; VARTANIAN, 2013). A presença de metástases para tais linfonodos por ocasião da cirurgia não modifica o prognóstico, pois menos de 10% desses pacientes falecem em virtude do tumor. O CPT apresenta um crescimento lento, o que propicia altas taxas de cura quando diagnosticado precocemente (Vartanian, 2013). O prognóstico é excelente, mesmo tendo o CPT uma grande variação histológica. O óbito causado por CPT é decorrente de metástases para o cérebro, pulmões ou por obstrução da traquéia ou esôfago. Estudos recentes revelam que a taxa de sobrevivência em um ano, no CPT é de 97,5% (SIIRONEN et al., 2006; VERBURG et al., 2009).

Em relação à idade, a faixa etária mais acometida pelo CPT, é a que está entre 20 a 50 anos (VARTANIAN, 2013). Pacientes com mais de 50 anos, apresentam prognóstico geralmente mais sério (SIIRONEN et al., 2006; VARTANIAN, 2013). Em crianças, a perspectiva é boa mesmo na presença de metástases pulmonares. Quanto maior o tumor primário, maior será sua agressividade e a sua extensão direta para tecidos moles adjacentes sugere um prognóstico mais sombrio. O CPT incide com maior frequência no gênero feminino, numa proporção de 2:1 a 4:1 (GIUSTI et al., 2010; VARTANIAN, 2013).

2.2.1.1 Aspectos Clínicos do CPT

O CPT geralmente se manifesta como nódulos assintomáticos e o primeiro sinal, pode ser uma massa em um linfonodo cervical (INCA, 2011). Entretanto, a

presença de metástases em linfonodos cervicais isoladas parece não ter influência no prognóstico das lesões. O carcinoma se move livremente durante a deglutição e não é distinguível de um nódulo benigno. Disfagia, tosse, rouquidão e dispneia sugerem a doença em estágio avançado (LISKA et al., 2005; BHARGAV et al., 2010; INCA, 2011).

2.2.2 Carcinoma Folicular da Tireóide (CFT)

Os carcinomas foliculares são responsáveis por 5% a 15% dos cânceres tireoidianos (LISKA et al., 2005). Diferentemente do CPT, o carcinoma folicular (CF), raramente apresenta metástases linfonodais. No entanto, metástases à distância são vistas mais frequentemente, sinalizando assim, um pior prognóstico (Verburg et al., 2009). São mais comuns em mulheres (3:1) e se manifestam em idades mais avançadas do que os carcinomas papilíferos (CABRUZZI et al., 2009; VERBURG et al., 2009; VARTANIAN, 2013).

Os CFT (Figura 2) são nódulos que podem estar bem circunscritos ou infiltrados. Na análise macroscópica, é difícil distinguir as lesões dos adenomas foliculares. As lesões maiores podem penetrar e infiltrar além da cápsula tireoidiana até o pescoço. Manifestam-se na cor acinzentada, parda e até rosada e, dificilmente, são translúcidas, devido à presença de grandes folículos repletos de colóides. Fibrose central e focos de calcificação estão algumas vezes presentes (SCUITO et al., 2009; VERBURG et al., 2009; ROBBINS & COTRAN, 2010).

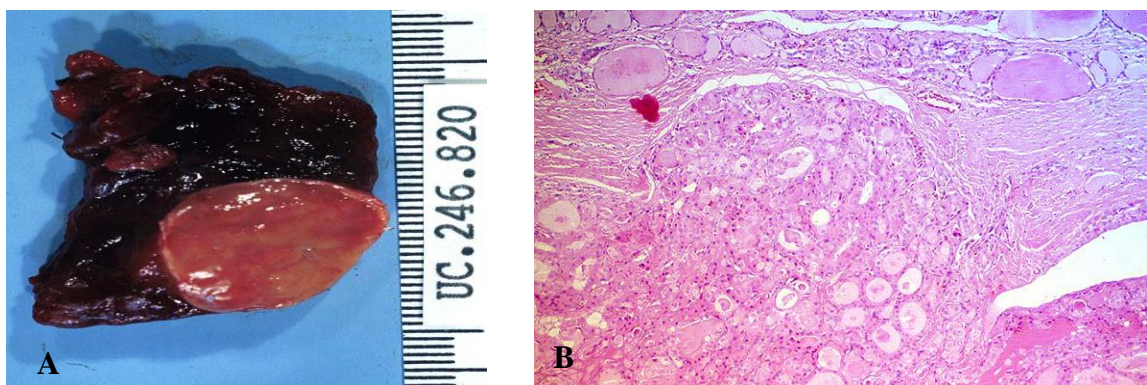


Figura 2. Peça cirúrgica (A) e fotomicrografia mostrando aspectos histológicos de carcinoma folicular de tireóide. Fonte: VIANNA et al (2012)

A incidência é maior entre os 40 e 60 anos de idade. É mais frequente em áreas com deficiência alimentar de iodo (25% a 40% dos cânceres tireoidianos), enquanto sua incidência tem diminuído em áreas com iodo suficiente. Geralmente, abrigam mutações na via de sinalização PI-3K- AKT. Essa subclassificação de casos envolve tumores com mutações pontuais de ganho de função de RAS e PIK3CA (BRADLY et al., 2009; VERBURG et al., 2009).

O CF manifesta-se como nódulos indolores que aumentam lentamente. Apresentam pequena capacidade de infiltração nos vasos linfáticos, portanto, os linfonodos regionais raramente são acometidos. Contudo a disseminação hematogênica é comum, com metástases para pulmões, fígado e ossos. Quanto ao prognóstico, é amplamente dependente da extensão da invasão e do estágio da apresentação (KIM et al., 2009; VERBURG et al., 2009; ROBBINS & COTRAN, 2010; VARTANIAN et al., 2013). A manifestação do CF apresenta metástases sistêmicas, sendo que 50% dos pacientes que apresentam a doença morrem em até 10 anos, ficando evidente que a sobrevida é menor se comparada com pacientes que desenvolvem o CPT (VERBURG et al., 2009; KIM et al., 2009; VARTANIAN, 2013). Contrastando com a taxa de sobrevivência dos carcinomas minimamente invasivos, que é maior que 90%. O tratamento baseia-se em tireoidectomia total e administração de iodo radioativo, o que pode distinguir e retirar essas lesões, além da administração de hormônios tireoidianos no pós-operatório para diminuir o TSH endógeno (ROBBINS & COTRAN, 2010).

2.2.3 Carcinomas Anaplásicos da Tireóide (CAT)

São responsáveis por 5% dos tumores que acometem a glândula tireóide. Possuem comportamento extremamente agressivo, com taxa de mortalidade próxima a 100% (ROBBINS & COTRAN, 2010; VIANNA et al., 2012). Os indivíduos acometidos são mais velhos, do que os portadores de outros tipos de cânceres da tireóide, com idade média de 65 anos. É mais incidente em mulheres (VIANNA et al., 2012). Um quarto dos pacientes tem histórico de carcinoma tireoidiano (BHARGAV et al., 2010; VIANNA et al., 2012).

Pode-se dizer que, na análise microscópica, que os carcinomas anaplásicos da tireóide são constituídos por células anaplásicas, com morfologia variável, incluindo células pleomórficas gigantes, células fusiformes e células gigantes e fusiformes misturadas.

Os carcinomas anaplásicos da tireóide manifestam-se como massas volumosas na região cervical, que apresentam crescimento súbito, muitas vezes relacionados aos sintomas obstrutivos (VIANNA et al., 2012). Geralmente, a doença se espalha além da cápsula tireoidiana para as estruturas do pescoço, ou metastatizam para os pulmões. São comuns os sintomas como dispnéia, tosse, rouquidão e disfagia. Não há terapia efetiva e a doença quase sempre é fatal. A sobrevida é de um ano, em virtude do crescimento agressivo e do comprometimento de estruturas da região do pescoço (KIM et al., 2009; BHARGAV et al., 2010; VIANNA et al., 2012).

2.2.4 Carcinoma Medular da Tireóide (CMT)

Ao contrário dos carcinomas citados anteriormente que tem origem nas células foliculares, esse tumor se origina das células parafoliculares da tireóide, e são responsáveis por 5% das neoplasias tireoidianas. Sua incidência é maior em mulheres (RODRIGUES et al., 2010). É mais agressivo e rapidamente invade os vasos linfáticos e se propaga para a glândula e cápsula metastatizando-se para linfonodos cervicais. O carcinoma medular produz calcitonina, cujos níveis séricos se elevam na vigência de um tumor primário ou metástases, desempenhando assim um importante papel no diagnóstico e no acompanhamento pós – operatório dos pacientes (PINHEIRO, 2010).

Geralmente, 70% dos tumores surgem esporadicamente. Os demais ocorrem na condição da síndrome de Neoplasia Endócrina Múltipla (MEN) 2A e 2B, ou como tumores familiares sem uma síndrome de MEN relacionada. Os casos associados de MEN 2A e 2B desenvolvem em pacientes mais jovens (ROBBINS & COTRAN, 2010; PINHEIRO, 2010). Os carcinomas medulares esporádicos e familiares são lesões da fase adulta, que incidem comumente aos 40 a 50 anos (VERBURG et al., 2009; BHARGAV et al., 2010).

Grandes lesões apresentam regiões necrosadas e hemorrágicas e podem se estender pela glândula tireóide. O tecido do tumor tem um aspecto pálido, infiltrativo, de coloração parda a acinzentada (ROBBINS & COTRAN, 2010)

Os carcinomas medulares, na avaliação microscópica, são constituídos de células poligonais fusiformes, que formam ninhos, trabéculas e folículos. Células menores, mas anaplásicas, se manifestam e podem ser do tipo celular predominante, em algumas situações (BHARGAV et al.,2010) Segue uma imagem de um carcinoma medular (Figura. 3).

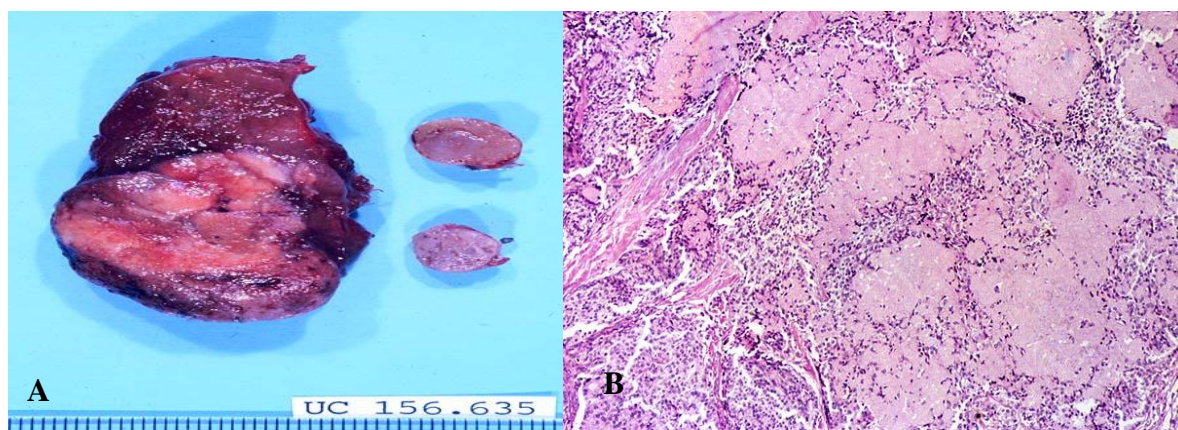


Figura 3. Peça cirúrgica (A) e fotomicrografia mostrando aspectos histopatológicos de carcinoma medular de tireóide. Fonte: VIANA et al (2012)

Na análise de microscópica eletrônica, observa-se variação nos grânulos eletrondensos, envolvidos por membrana no citoplasma das células neoplásicas. Uma característica singular de carcinoma medular familiar é a presença de hiperplasia multicêntrica de células C, no parênquima tireoidiano circundante (RODRIGUES et al., 2010).

Os carcinomas medulares que se desenvolvem do contexto de MEN 2B, são mais agressivos e metastatizam-se com maior frequência do que aqueles que ocorrem em pacientes com tumores esporádicos (RODRIGUES et al., 2010).

O único achado histopatológico na tireóide em pacientes assintomáticos é a presença de hiperplasia de células C ou pequenos carcinomas “micromedulares” menores que um centímetro. As contribuições da patogênese molecular concentram-

se na possibilidade de identificação da mutação do gene RET, em famílias que desenvolveram o carcinoma medular, e conseqüentemente a obtenção da cura antes da apresentação clínica da doença (STURGIS et al., 2009).

2.3 Epidemiologia dos Carcinomas Papilíferos da Tireoide

O INCA, órgão vinculado ao Ministério da Saúde (MS), lançou a edição Estimativa 2012, com a inclusão de sete novas localizações de tumores mais incidentes para população do Brasil. Dentre eles: bexiga, ovário, tireóide (mulheres), sistema nervoso central, corpo do útero, laringe (homens) e linfoma não Hodgkin. Essas estimativas levam em consideração a taxa bruta de incidência por 100 mil habitantes, o número de novos casos segundo a localização primária e o gênero, o número de casos novos por estados e capitais, a distribuição proporcional dos dez tipos mais incidentes por gênero (estados e capitais) e a representação espacial das taxas brutas de incidência no Brasil (INCA, 2011).

Embora seja uma patologia relativamente rara, o câncer de tireóide é a neoplasia maligna mais comum do sistema endócrino, sendo responsável por aproximadamente 1% dos novos casos de câncer (SIIRONEN et al., 2006; ERDEM et al., 2011; TALINI et al., 2012; VARTANIAN, 2013). No entanto, uma tendência no aumento da incidência de câncer tireoidiano tem sido reconhecida em várias regiões do mundo (CABRUZZI et al., 2009; REIS et al., 2010; VARTANIAN, 2013).

Nos Estados Unidos da América, estimou-se que surgem 30 a 60 novos casos em 1.000.000 de habitantes por ano em 2010. No Brasil, foram estimados para o ano de 2012, 10,6 mil novos casos da doença, sendo estas, atualmente, a quarta neoplasia mais incidente na população feminina (VARTANIAN, 2013). O câncer de tireóide incide em 2% a 5% das mulheres com idades entre 20 e 50 anos, enquanto que, em menos de 2% dos homens (CABRUZZI et al., 2009; ERDEM et al., 2011; INCA, 2011; VARTANIAN, 2013). Em Goiânia, a taxa de incidência bruta em mulheres variou de 7,28, no ano 2000 para 10,5, em 2005 (INCA, 2008b) e no período de 1988 a 2003, foram identificados 613 casos de câncer de tireoide, com uma incidência de 509 (83%) casos em mulheres e 104 (17%) em homens (REIS et al., 2008).

A frequência do carcinoma de tireoide em homens é geralmente a metade das mulheres, porém o risco de morte é o dobro para esse gênero. Uma das hipóteses é que, ao diagnóstico os homens são mais idosos que as mulheres (WARD & ASSUMPÇÃO 2004).

Apesar de incidir mais em mulheres, o prognóstico é melhor do que em homens (LISKA et al., 2005; MASSAFERRI et al., 2010). Uma elevada taxa de recorrência da doença ou um pior prognóstico é encontrado em homens com idade superior a 40 anos (CABRUZZI et al., 2009). Alterações hormonais relacionadas ao ciclo menstrual, gravidez e menopausa são fatores etiológicos que podem explicar as razões do gênero feminino ser o mais acometido (MACK et al., 1999).

Uma ampla disponibilidade de exames ultrassonográficos e a realização de citologia de material obtido por punção aspirativa com agulha fina (PAAF), certamente possibilitaram a melhoria na capacidade de rastrear a malignidade em nódulos tireoidianos (DEAN & GHARIB, 2008; REIS et al., 2010; GOMES et al., 2011; VARTANIAN, 2013). Tais fatores contribuíram para exatidão do diagnóstico do câncer de tireoide, refletindo assim, no aumento do número de casos desse tipo de tumor (KENT et al., 2007; SCUITO et al., 2009; INCA, 2011; VARTANIAN, 2013).

A melhoria das condições socioeconômicas aliada à facilidade de acesso da população aos serviços de saúde, bem como, a divulgação e implantação de normas e diretrizes que subsidiam as ações do sistema de saúde, fizeram com que ocorresse a redução da mortalidade por esse tipo de neoplasia, pois se o câncer de tireoide for diagnosticado precocemente, torna-se um tumor curável (KENT et al., 2007; INCA, 2011). Uma avaliação cuidadosa das manifestações clínicas como odinofagia, disfagia, rouquidão, tosse, dispnéia, fatores que devem ser reconhecidos durante a anamnese, é necessário para que ocorra o mais precoce diagnóstico da neoplasia tireoidiana (SCIUTO et al., 2009; INCA, 2011).

2.4 Fatores de Risco para o desenvolvimento dos Carcinomas Papilíferos de Tireoide

A etiologia multifatorial do carcinoma papilífero da tireoide é resultante da complexa interação entre fatores genéticos, ambientais e radiação ionizante

(CABRUZZI et al., 2009; ERDEM et al., 2011). Estudos epidemiológicos sugerem os seguintes fatores de risco: gênero e idade, diferenças étnicas, fatores ambientais, genéticos e hormonais, exposição anterior à radiação ionizante, idade quando ocorreu a irradiação, história prévia de doença benigna na glândula tireóide, história familiar e contribuição do iodo na alimentação (CABRUZZI et al., 2009; ERDEM et al., 2011). Portanto, os fatores de risco baseiam-se em dados clínicos e anatomopatológicos que, em análises multivariadas, mostram-se independentemente responsáveis pelo prognóstico da doença (INCA, 2011).

Fatores clínicos e epidemiológicos também vêm sendo utilizados na seleção dos pacientes de risco para o câncer da tireóide, dentre eles, fatores autoimunes, fatores genéticos relacionados ao sistema leucocitário humano (HLA) e fatores ambientais (COELI et al., 2005;). Estudos realizados, desde o acidente de Chernobyl, evidenciam que a exposição à radiação ionizante tem uma forte associação com o câncer de tireóide (TOMER et al., 2003). Entretanto, existem poucas evidências de que a exposição à radiação ionizante na fase adulta, ou seja, após os vinte anos de idade, seja um fator de risco para o CPT (WARD, 2008; RICHARDSON, 2009). A investigação dos antecedentes familiares é extremamente importante, pois de 5% a 10% dos pacientes que desenvolveram o carcinoma papilífero da tireóide, possuíam histórico familiar. O câncer de origem hereditário ocorre quando a neoplasia torna-se mais prevalente em indivíduos da mesma família. Ele ocorre por meio de um padrão mendeliano autossômico dominante, culminando em um risco de transmissão de 50% para os descendentes, independentemente do gênero (ALVARENGA et al., 2003).

Pacientes com polipose adenomatosa familiar apresentam um maior risco de desenvolver CPT (ROBIN, 2010). São comuns no CPT os rearranjos somáticos do protooncogene RET no cromossomo 10 (ROBBINS & COTRAN, 2010; RUBIN, 2010). Crianças expostas à radiação no acidente de Chernobyl mostravam essa mutação (TOMER et al., 2003). Essa mesma mutação ocorre após irradiação externa da tireóide. A maioria dos casos de carcinoma da tireóide ocorre no início ou meio da vida adulta, embora possa se manifestar em qualquer idade, até mesmo na infância (VARTANIAN, 2013).

2.5 Fatores Prognósticos para os Carcinomas Papilíferos da Tireóide

Os fatores prognósticos para indivíduos com carcinoma papilífero da tireóide podem ser avaliados em três momentos diferentes. Primeiramente, fatores como a idade do paciente, tamanho do tumor e a presença ou não de metástases, regionais ou à distância, são utilizados pelo sistema de estadiamento, com objetivo de decisão sobre a medida da terapêutica da doença. Em um segundo momento, é considerado o tipo de tratamento ofertado ao paciente. No último momento, é feita uma reavaliação entre 6 a 12 meses após o tratamento inicial da doença para reclassificar o risco de recorrência da doença (NÓBREGA, 2008; ERDEM et al., 2011).

Assim, na tentativa de otimizar a abordagem cirúrgica, têm-se tentado identificar fatores prognósticos que possam auxiliar e dividir os indivíduos com carcinoma papilífero da tireóide em pacientes de baixo risco e alto risco (SCHLUMBERGER et al., 1986; HAY et al., 1989; NÓBREGA, 2008; WONG et al., 2012). Baseado nesses critérios foi elaborado um sistema de estadiamento e classificação de tumores, que incluem o AGES (*Age, Grade, Extracapsular spread, and Size*) e o AMES (*Age, Metastasis, Extracapsular tumor, and Size*). Sistemas baseados, sobretudo na idade do paciente e características anatomopatológicas do tumor (HAY et al, 1987;).

A base norte-americana de registros de câncer (*National Cancer Data Base-NCDB*) e os dados do programa em vigilância epidemiológica norte americana (*Surveillance Epidemiology and End Results Program – SEER*), demonstram a importância da idade na sobrevivência do paciente e relatam índices próximos de 95% a 100% em cinco anos para indivíduos com idade inferior a 45 anos de idade em estadio I e II (GILLILAND et al., 1991; HUNDAHL et al.,1998). Em contraste, pacientes com idade superior a 70 anos possuem 70% de chance de sobrevivência (*American Cancer Society 2003*).

2.6 Genética dos Carcinomas Papilíferos de Tireóide

As últimas décadas têm sido marcadas pela expansão dramática para a compreensão da base molecular da carcinogênese da tireóide. Uma mutação inicial

em algum gene envolvido na regulação da proliferação e/ou diferenciação celular ocorre, culminando na formação dos carcinomas (SCIUTO et al., 2009).

Alterações genéticas estão envolvidas nas principais variações histológicas do câncer de tireóide. Tais alterações ocorrem em células foliculares e estão agrupadas em duas vias oncogênicas – via ativada por proteína quinase, (MAPK), e a via da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K)-AKT (KNOSTMAN et al., 2007). Essas vias são transitoriamente ativadas pela ligação de fatores solúveis ao domínio extracelular do receptor, possibilitando a transdução intracelular dos sinais, em condições normais. As mutações de ganho de função, presentes nos cânceres de tireoide, em conjunto com os componentes dessas vias, levam à ativação do ciclo, mesmo na ausência de um ligante, e conseqüentemente a carcinogênese (KNOSTMAN et al., 2007; ROBBINS & RUBIN, 2010).

A via mais estudada na tumorigênese da tireoide é MAPK (MAP quinase). A via MAPK é uma via de sinalização intracelular conservada que realiza um papel importante na homeostase tireoidiana. Controla funções como a expressão de citocinas e proteases, progressão do ciclo celular, aderência, motilidade e metabolismo celular. Portanto, as MAPKs influenciam na proliferação celular, diferenciação, sobrevivência, apoptose, desenvolvimento e tem controle na sobrevivência e crescimento de tumores. Geralmente, envolve rearranjos de gene RET ou NTRK1 (receptor de tirosina – quinase neurotrófico), nos quais, um dos rearranjos, codifica receptores transmembrana com domínio de tirosina – quinase, e o segundo envolve mutações pontuais ativadoras em no gene BRAF, cujo produto é um constituinte de sinalização na via da MAP-quinase (Patel et al., 2006).

Nos carcinomas papilíferos de tireóide, ocorre tanto uma inversão paracêntrica do cromossomo 10, como uma translocação entre os cromossomos 10 e 17, que colocam o domínio de tirosina quinase do gene RET sob o controle transcricional de genes que são expressos no epitélio da glândula tireoide (PATEL et al., 2006; KNOSTMAN et al., 2007) (Figura 4).

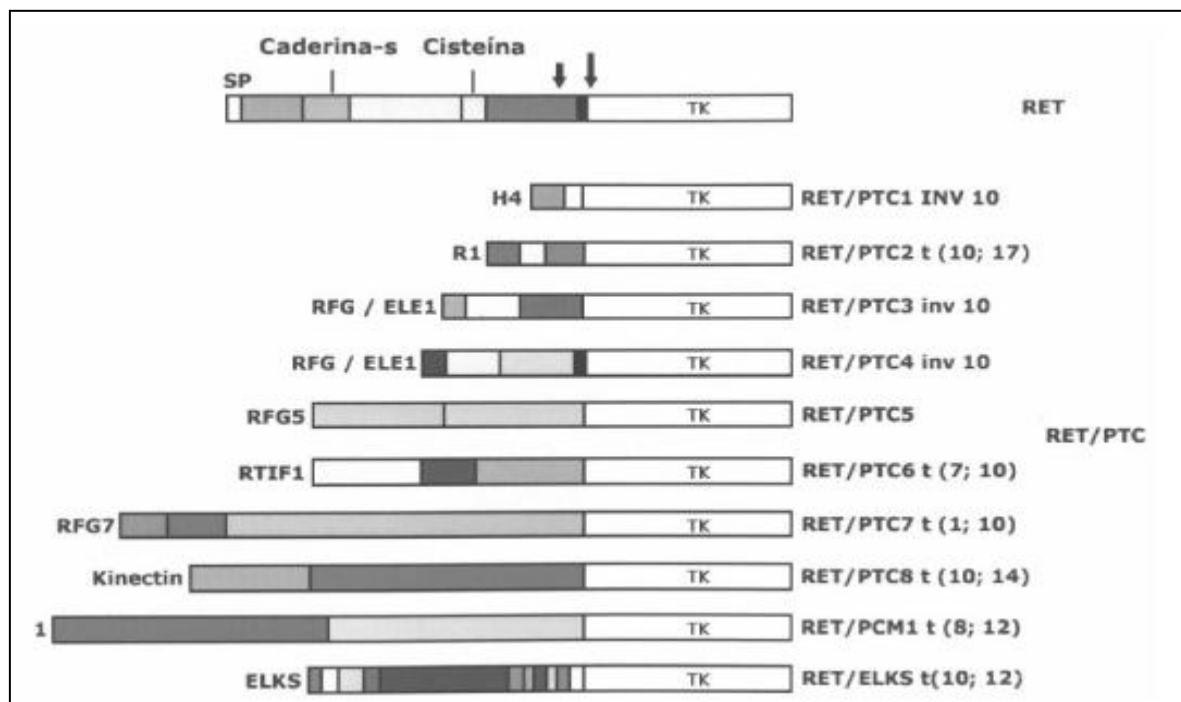


Figura 4. Tipos de translocações detectadas nos oncogenes RET/PTC 1 a 10 descritas em carcinomas papíferos de tireóide. Fonte: <http://www.arthritis.co.za>.

As proteínas de fusão, então formadas, são denominadas RET- PTC, e aparecem em 20% a 40% dos carcinomas papilíferos da tireóide. Mais de 15 parceiros de fusão do RET são reconhecidos, sendo dois mais conhecidos como RET/PTC1 e RET/PTC2, comuns em cânceres papilíferos esporádicos (STURGIS et al., 2009).

A frequência dos rearranjos RET/ PTC é alta nos carcinomas papilíferos de tireoide (PATEL et al., 2006; KNOSTMAN et al., 2007; WONG & LANG, 2012). O gene RET situa-se no cromossomo 10q11, e o receptor tirosina-quinase que ele codifica, é expresso nas células foliculares tireoidianas (STURGIS et al., 2009; ROBBINS & COTRAN, 2010). A existência da proteína de fusão RET/PTC leva à expressão de uma tirosina quinase quimérica nas células foliculares tireoidianas e à ativação resultante da via da MAP quinase (XING, 2007; STURGIS et al., 2009).

As translocações ou inversões do NTRK1 no cromossomo 1q21 são vistas em 5% a 10% dos cânceres de tireóide e as respectivas proteínas de fusão são expressas em células tireoidianas, o que leva à ativação da sinalização de vias oncogênicas, como a via da MAP quinase (Maciel, 2005). Os carcinomas papilíferos tireoidianos papilares apresentam mutações de ganho de função no gene BRAF,

sendo que a mais comum é uma troca de valina por glutamato no códon 600 (PATEL et al., 2006; KNOSTMAN et al., 2007; STURGIS et al., 2009).

As mutações presentes em BRAF associam-se com fatores prognósticos adversos como extensão extra-tireoideana e doença metastática. No CPT, as variantes histológicas demonstram algumas características únicas diante da frequência ou natureza da mutação de BRAF. Essas mutações em BRAF e os rearranjos cromossômicos dos genes RET ou NTRK1 possuem os mesmos mecanismos que resultam na ativação na de sinalização da MAP quinase. Os rearranjos de RET/ PTC e as mutações pontuais de BRAF não são vistas nos adenomas foliculares (PATEL et al., 2006; STURGIS et al., 2009).

2.7 A Imuno-Histoquímica na patologia cirúrgica

A imuno-histoquímica (IHQ) é um método de detecção da expressão de proteínas localizadas nos tecidos, utilizando o princípio antígeno/anticorpo. A IHQ é largamente utilizada no diagnóstico e prognóstico do câncer (RAMOS et al., 2005).

A IHQ surgiu por meio de pesquisas em imunopatologia, durante a década de 1940. Em 1974, foi possível demonstrar alguns antígenos tissulares pela técnica de imunoperoxidase em tecidos fixados com formalina e incluídos em parafina. Nessa ocasião a imuno-histoquímica foi aceita como um método prático e simples na rotina diagnóstica de patologia cirúrgica (BODEY, 2002). O desenvolvimento de anticorpos monoclonais resultou na produção de reagentes altamente específicos para demonstração de antígenos celulares ou tissulares e juntamente com a recuperação antigênica marcaram a evolução da imuno-histoquímica (TORRES et al., 2005).

As reações de imuno-histoquímica podem ser utilizadas nas seguintes situações na prática laboratorial de patologia cirúrgica: elucidação do tecido de origem de uma neoplasia indiferenciada, determinação do órgão de origem de uma neoplasia indiferenciada, pesquisa de fatores prognósticos e terapêuticos, identificação de estruturas, organismos e materiais produzidos pelas células e detecção de células neoplásicas metastáticas (WERNER et al., 2000).

Embora seja um método simples, os resultados da imuno-histoquímica são influenciados por diversos fatores como, a fixação do espécime, a escolha dos anticorpos a serem utilizados e até mesmo a interpretação das lâminas (ROSAI, 1996).

2.8 Angiogênese - Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

No desenvolvimento tumoral, os mediadores endógenos ativadores do crescimento celular superam os inibidores endógenos, favorecendo o desequilíbrio e estimulando, dentre outros processos, a angiogênese. Tal fato resulta na formação de novos vasos sanguíneos e, conseqüentemente, no maior fornecimento de oxigênio para a nutrição tumoral (ROCHA & FERREIRA, 2011).

Em 1971, Judah Folkman (1933-2008), publicou um artigo no *New England Journal of Medicine*, mencionando que o crescimento tumoral seria dependente da formação de novos vasos sanguíneos, a partir de uma rede pré-existente. E, para que ocorra o crescimento e o desenvolvimento tumoral, a angiogênese exerce uma função extremamente importante (NAKAMOTO et al., 2007; INDA et al., 2009; ROCHA & FERREIRA 2011). Os fatores de crescimento endoteliais vasculares (VEGF) são famílias de proteínas que funcionam como fatores de regulação da angiogênese fisiológica e da angiogênese tumoral (XIAOYAN et al., 2008).

Atualmente, dois tipos de angiogênese são reconhecidos: a fisiológica e a patológica. A angiogênese fisiológica participa dos processos como: ciclo menstrual, reparo tecidual e cicatrização de feridas (ROCHA & FERREIRA, 2011). Geralmente, é restrita e localizada. Já a angiogênese patológica, apresenta uma persistência do processo, sempre relacionado a uma desordem, um processo crônico e desregulado, onde o produto final é a formação de vasos sanguíneos (ROCHA & FERREIRA, 2011).

2.8.1 VEGF e seus Receptores

O fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), e tido como uma molécula importantíssima na formação de novos vasos sanguíneos (XIAOYAN SHI, 2008; YONG LI, 2012). Cinco membros da família

VEGF humano são descritos: VEGFA, VEGFB, VEGFC e D, além do fator de crescimento da placenta (PIGF) (KOWANETZ, 2006; ROCHA & FERREIRA, 2011). Além disso, múltiplas isoformas de VEGF são geradas por meio de *splicing* alternativo do pré-mRNA. As famílias VEGF ligadas interagem com os receptores correlatos: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. São também reguladas por co-receptores neuropitilinas (PNR) -1 e NRP 2 (ROCHA & FERREIRA et al.,2011).

O VEGF, também conhecido como fator de permeabilidade vascular, é importante para sobrevivência, crescimento e migração celular (ROCHA & FERREIRA, 2011; SANG et al., 2012; YING et al., 2012). A expressão do VEGF é altamente regulada e a perda de um alelo do gene VEGFA culmina em morte embrionária, devido à ausência de vasos sanguíneos. A atividade biológica do VEGF varia por diferentes mecanismos, tais como a co-expressão de diferentes membros da família, produção de várias isoformas por *splicing* alternativo do RNA mensageiro e modulação da sua atividade por ligação a múltiplos receptores (ROCHA & FERREIRA, 2011).

O VEGF humano compreende um grupo de proteínas de 121,145, 165, 189 ou 205 aminoácidos, e a distinção entre elas está no domínio de ligação com a heparina, existente na porção carboxila terminal. O VEGF e os membros de suas famílias unem-se de forma distinta e seletiva com três receptores tirosina quinase (VEGFR-1, 2 e 3) e com as neuropitilinas (NRP-1 e NRP-2) (XIAOYAN et al., 2008).

É sabido que, NRP-1 é co-receptor para VEGF 165, o que favorece sua atividade proliferativa e mitogênica nas células endoteliais. A atividade do VEGF é mediada principalmente pela ligação ao receptor VEGF-2, e que promove a autofosforilação do domínio tirosina quinase do receptor e a ativação de cascatas de sinalização intracelular, resultando na diferenciação de células endoteliais (ROCHA & FERREIRA, 2011; XIAOYAN et al., 2008). A atividade do VEGF é contrabalanceada pela união de seu receptor, o VEGF-1, que tem pouca afinidade de tirosina quinase. O VEGF-1 é produzido por *splicing* alternativo, sem os domínios transmembranares e intracelulares (ROCHA & FERREIRA, 2011).

Estudos sugerem que o domínio de ligação VEGF -1 é importante para a formação de novos vasos sanguíneos, sequestrando o VEGF e diminuindo sua disponibilidade para a ativação de VEGF-2.

VEGF é usualmente encontrado como homodímero, como por exemplo, PlGF/VEGF e VEGF-B/VEGF, aptos para o favorecimento da promoção, ativação e a ligação cruzada dos receptores VEGFR-1 e elevando, estímulo angiogênico (ROCHA & FERREIRA, 2011). O VEGF-1 tem sido mencionado na iniciação e avanço de metástases. Portanto, são tidos como novos alvos terapêuticos no tratamento de várias patologias em que a angiogênese é um fator que possibilita a progressão da doença (FISCHER et al., 2008; YIANG et al., 2012).

2.8.2 Angiogênese e Hipóxia

A angiogênese pode ser conceituada como uma resposta do organismo frente à falta de oxigênio nos tecidos, que ocorre em circunstâncias fisiológicas e patológicas, como no desenvolvimento embrionário e no aumento da massa tumoral (RANKIN et al., 2008).

Os fatores induzidos por hipóxia (HIF) regulam a expressão de mais de 100 genes envolvidos no transporte de oxigênio ou com as adaptações de tecidos em situações de hipóxia. A atividade de HIF é controlada por enzimas sensíveis aos níveis de oxigênio. Entre elas, as prolinas hidroxilases (PHD1-3) e o fator inibidor de HIF (RANKIN et al., 2008). O fator de crescimento endotelial vascular - VEGF está relacionado com o câncer, quando sua expressão é aumentada. Mas, na periferia de tumores, onde não há hipóxia, há uma alta concentração do VEGF, o que leva a concluir que há uma produção de VEGF independente de hipóxia por células tumorais, provocada pela inativação de supressores tumorais, tais como p53 ou por fatores exógenos, como hormônios ou fatores de crescimento (CAPP et al., 2009).

2.8.3 Germinação das Células Endoteliais

As células endoteliais produzem fatores de crescimento, como VEGF e citocinas, que em situações de hipoxemia induzem a saída da célula de sua condição basal, seu desprendimento da parede do vaso sanguíneo e a iniciação de

um processo de migração para a formação de novos vasos sanguíneos (ROCHA & FERREIRA, 2011). Dois tipos de células coordenam o processo migratório: as células endoteliais de ponta (*tip cells*), que coordenam o processo angiogênico e as células endoteliais que seguem as células de ponta (*stalk cells*) (ROCHA & FERREIRA, 2011). Células endoteliais *stalk* são aquelas que formam o lúmen do vaso por meio de novas junções celulares e esse fato, que manterá a estabilidade do vaso recém-formado (VIANNA et al., 2012).

Estudos revelam que o VEGF-3 regula a angiogênese fisiológica e patológica e que anticorpos contra esse receptor são inibidores de angiogênese (ROCHA & FERREIRA, 2011).

2.9 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF C), Angiogênese e Linfagiogênese

O fator de crescimento endotelial vascular C (VEGF-C) é uma glicoproteína que apresenta atividade angiogênica e mitogênica. É considerado um potente mitógeno para as células endoteliais vasculares (NAKAMOTO, 2007; DU et al., 2011). Sua expressão está significativamente relacionada com metástases linfonodais no carcinoma papilífero de tireóide (SIIRONEN et al., 2006; YU, 2008; MIAO et al., 2009). Foi identificado inicialmente, como um fator estimulante do receptor tirosina quinase Flt4, conhecido por VEGF-3. O gene do VEGF-C está localizado, no cromossomo 4q34 e apresenta um alto grau de homologia com o VEGF-A (PAAVONEN et al., 1997; INDA et al., 2009).

O VEGF-C ativa os receptores VEGF-2 e VEGF-3, ambos importantes para o desenvolvimento vascular no ser humano. Em tumores primários com invasão linfática e metástases para linfonodos, observou-se uma correlação entre VEGF-C e VEGF-3 (INDA, 2009). É sabido que há uma relação entre VEGF-C e VEGF-3 em tumores primários com invasão linfática e metástases para linfonodos (Inda, 2009). O VEGF-C age através de receptores de tirosina-quinases, não apenas como citocina angiogênica, mas também com fator linfagiogênico, mostrando que a alta expressão dessa proteína resulta em disseminação linfática e hiperplasia da vasculatura linfática. A expressão dessa proteína é observada no carcinoma

papilífero da tireóide (BUNONE et al., 1999; SHUSHANOV et al., 2000; TANAKA et al., 2002; HUNG; 2003). Estudos mostram que VEGF-C é expresso de forma mais agressiva em pacientes com a idade mais avançada e sua expressão sugere um pior prognóstico (SIIRONEN et al, 2006; INDA et al., 2009).

Os fatores de crescimento endoteliais vasculares (VEGF) são frequentemente relacionados a tumores com fenótipos mais agressivos e de pior prognóstico. Muito embora a relação entre VEGF-C e sobrevida ainda não seja totalmente esclarecida (INDA et al.,2009).

2.10 VEGF-C em Carcinoma Papilífero de Tireóide

A família VEGF compreende proteínas estimuladoras potentes do crescimento de células endoteliais e pode promover tanto a angiogênese (VEGF-A) quanto à linfangiogênese (VEGF-C). Os papéis de VEGF-A, como fator angiogênico, e de VEGF-C como um fator linfangiogênico, em tumores malignos estão bem estabelecidos. Apesar de inúmeros fatores que promovem ambos os processos, muito pouco se sabe sobre os mecanismos que inibem a angiogênese ou linfangiogênese em carcinomas papilíferos da tireóide (FOX et al., 1997; PEPPER et al., 2001).

A expressão de VEGF-C é correlacionada intimamente com linfangiogênese, e metástases linfáticas, portanto, é possível que VEGF-C, seja um marcador tumoral importante no CPT, associada à diminuição da sobrevida dos pacientes (BUNONE et al., 1999; JELSHCH et al., 2006; SIIRONEN et al., 2006; X TIAN et al., 2008). O aumento dos níveis séricos de VEGF-C foram significativamente associados com metástases linfonodais, invasão linfática, metástases à distância e um prognóstico ruim nos CPT (YU et al., 2008).

2.11 Cicloxigenase-2 (COX- 2)

O gene que codifica a COX-2 humana está localizado no cromossomo 1 (1q25.2-q25.3) e apresenta cerca de 60% de homologia com a COX-1. A COX-2 localiza-se principalmente no retículo endoplasmático e no envelope nuclear. O

retículo endoplasmático favorece a dimerização e ativação da enzima e a localização nuclear propicia efeitos mitogênicos derivados de prostaglandinas (RIZZO et al., 2011; BAI JI et al., 2012). Cicloxigenase-2 é uma enzima presente em pequenas quantidades nas vesículas seminais e rins. É indetectável na mucosa colônica normal, estando superexpressa em alta proporção em tumores (KRAWCZYK-RUSIECKA et al., 2011; RIZZO et al., 2011). COX-2 participa como uma enzima da cascata da síntese de prostaglandinas, pois favorece a transformação do ácido araquidônico em prostaglandinas responsáveis pela permeabilidade vascular e quimiotaxia de células inflamatórias. Em diversos tipos de cânceres a alta expressão de COX -2 têm sido descrita (Rizzo et al., 2011; Bai Ji et al., 2012) (Figura 5)

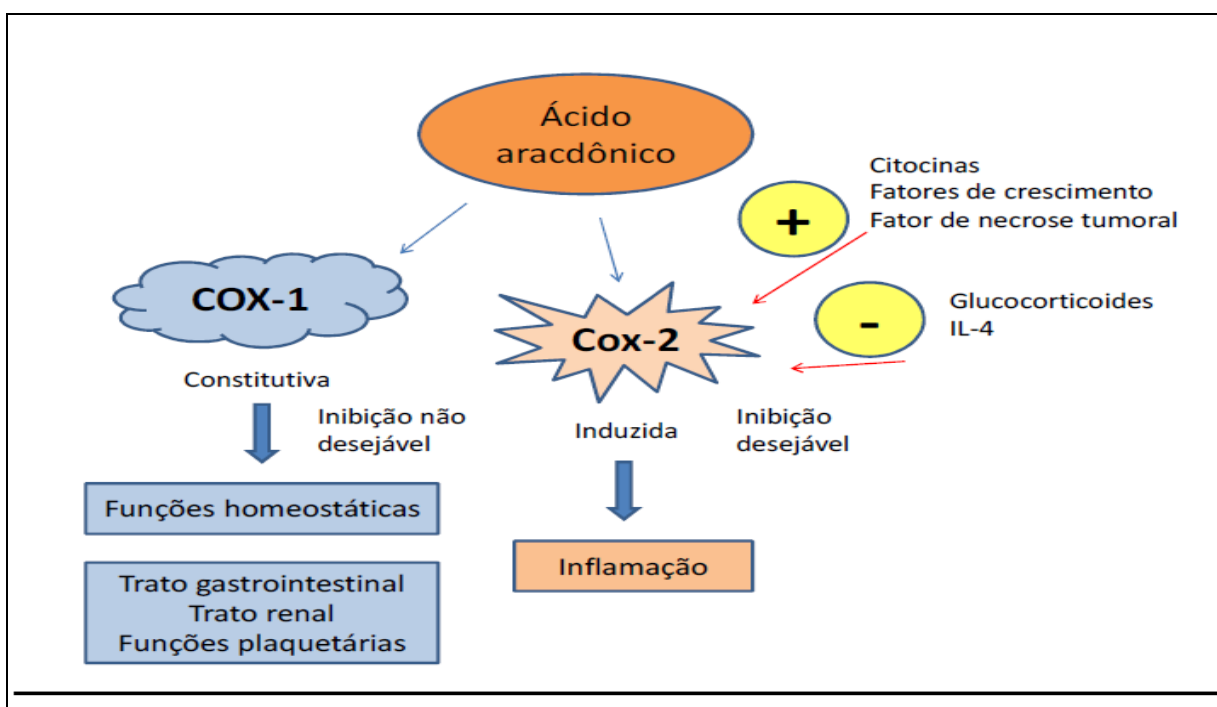


Figura 5. Esquema demonstrando as ações fisiológicas da ciclooxigenase

1 e 2. Fonte: <http://www.arthritis.co.za/cox.html>.

Em condições normais a expressão de COX-2 aumenta de forma transitória frente ao estímulo inflamatório e retorna aos níveis basais após esse estímulo, porém, sua expressão persistente está relacionada a neoplasias e a um pior prognóstico em alguns casos (SIRONEN et al., 2006; XIAOYAN et al., 2008; RIZZO et al., 2011).

2.12 COX-2 em Carcinomas Papilíferos de Tireóide

Estudos revelam que a COX-2 desempenha um papel importante na carcinogênese e na progressão de tumores, bem como, na indução de angiogênese (KRAWCZYK-RUSIECKA et al., 2011). No entanto, o mecanismo não é muito claro (JI et al., 2012). A COX-2 é hiperexpressa em tecidos tumorais quando comparada com a sua expressão em tecidos normais. A COX-2 deve ser investigada, pois, no CPT ela está envolvida nos processos de angiogênese, carcinogênese, inibição de apoptose, e estimulação da invasão e proliferação celular (KRAWCZYK-RUSIECKA et al., 2011). A expressão aumentada da COX-2 foi demonstrada em tireoidites, lesões benignas e malignas da tireóide, e nenhuma expressão em tecidos normais da tireóide (LEE et al., 2008; KRAWCZYK-RUSIECKA et al., 2011). Entretanto, nos estudos de Kajita et al. (2005), não houve diferenças significativas na expressão de COX-2 entre tecido tireoidiano normal e CPT, em virtude da variação nos níveis de mRNA.

A expressão de COX-2, no estudo de Krawczyk-Rusiecka et al. (2011), foi elevada e confirmada em todas as amostras de CPT. Dessa forma, acredita-se que o gene da COX-2 pode desempenhar um papel significativo na patogênese do CPT. A utilidade da COX-2 como um marcador de malignidade da tireóide tem sido desafiada, mas sua atividade na carcinogênese desperta um interesse pelo seu estudo (KRAWCZYK-RUSIECKA et al., 2011).

2.13 Expressão de VEGF-C e COX-2 em Carcinomas Papilíferos de Tireóide

Estudos recentes demonstram uma forte correlação entre a expressão de COX-2 e VEGF-C em carcinomas papilíferos da tireoide e revelam que a COX-2 pode ser um fator que regula a expressão de VEGF-C (XIAOYAN, 2008; BAI JI et al., 2012). Portanto, a expressão de COX-2 no carcinoma papilífero da tireóide parece ser um fator indutor de metástases (SIRONEN et al., 2006; YING et al. 2012). O VEGF-C sinaliza a indução de vasculogênese, angiogênese e linfangiogênese e para que ocorra o crescimento tumoral, existe a necessidade de aumento no suprimento sanguíneo (BERGELIN et al., 2010). A co-expressão de COX-2 e VEGF-C tem sido investigada e analisada, pois COX-2 está relacionada com a alta expressão e participação de VEGF-C na linfangiogênese, mostrando sua importância na

proliferação linfática e disseminação de tumores sólidos (SIIRONEN et al., 2006; MÉRIC et al., 2006; MIAO et al., 2009).

No CPT, a idade parece ser o mais importante fator prognóstico e a falta de associação entre a sobrevida e metástases linfáticas também é outra característica dessa neoplasia (SIIRONEN et al., 2006). Metástases linfáticas são mais comuns em pacientes mais velhos e sugerem um mau prognóstico. O bom prognóstico em pacientes jovens pode ser explicado pelo fato de que esses pacientes tem um padrão genético peculiar que permite a aderência e retenção de células que não estão relacionadas à capacidade de crescimento celular em outros órgãos (CADY, 1998; SIIRONEN et al., 2006). A expressão de VEGF-C é maior em pacientes com idade mais avançada, o que explica a agressividade do comportamento das metástases linfáticas nesses pacientes (SIIRONEN et al., 2006). O CPT, não demonstra uma relação clara entre metástases linfáticas e sobrevida (SAMAAN et al., 1992; SIIRONEN et al., 2006).

A expressão de VEGF- C e COX-2 deve ser analisada, visto que, ambas possuem um papel importante na carcinogênese. Estudos moleculares evidenciam a expressão aumentada de VEGF-C e sua forte relação com a disseminação por via linfática em carcinomas de pulmão, estômago, cólon, mama, próstata, e tireóide (SIIRONEN et al., 2006; STURGIS et al., 2006). A expressão elevada de COX-2 está associada, em diversos tumores, a um prognóstico ruim (BAI JI et al., 2012; KRAWCZYK-RUSIECKA et al., 2011) (Tabela1).

Tabela 1. Revisão dos estudos da literatura que investigaram a expressão de COX-2 e VEGF-C em Carcinoma Papilífero de Tireóide

Autores/ Ano	N / Local do estudo	Proteína	Associações Significativas
Lo et. al., 2005	70/ China	COX-2	CPT
Jaing et al. 2005	135/ China	VEGF-C	CPT, Metástases Linfonodais
Yu et al., 2005	39/ China	VEGF-C	CPT, Metástases Linfonodais
Sironen et al.,2006	106 / Helsink	COX-2 e VEGF-C	CPT, idade, gênero e metástases linfonodais
Miao et al., 2009	40/ China	COX-2 e VEGF-C	CPT, Metástases Linfonodais
Ling et al., 2010	58/ China	VEGF-C	CPT, Metástases
Hsueh et al., 2011	101/ Taiwan	VEGF-C	CPT, Estadiamento
Erdem et al., 2011	79/ Turquia	COX-2 e VEGF-C	CPT, Idade, Gênero e Estadiamento

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão de VEGF-C e COX-2 em carcinomas papilíferos de tireoide (CPT) utilizando imuno-histoquímica, bem como as possíveis associações entre a expressão desses marcadores e os aspectos clínicos e patológicos dos tumores.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão de VEGF-C e COX-2, por meio de imuno-histoquímica, em carcinomas papilíferos de tireóide.
- Investigar as possíveis associações entre a hiperexpressão de VEGF-C e COX-2 e os seguintes fatores: metástase linfonodal, metástase à distância, tamanho do tumor, invasão de tecido adjacente, idade e gênero;
- Avaliar o potencial prognóstico dos marcadores VEGF-C e COX-2 nos carcinomas papilífero de tireóide;

4. METODOLOGIA

4.1 Sujeitos da Pesquisa

Estudo retrospectivo, com análise de dados clínicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos de um grupo de pacientes com carcinoma papilífero de tireoide, operados no Hospital Araújo Jorge da Associação Goiana de Combate ao Câncer (ACCG), com as peças cirúrgicas disponíveis e analisadas no Setor de Anatomia Patológica, durante o período de 2004 a 2006. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Araújo Jorge e o termo de aprovação encontra-se no Anexo I dessa dissertação.

Os sujeitos do estudo foram pacientes com carcinoma papilífero de tireoide atendidos consecutivamente e operados no Hospital Araújo Jorge, selecionados a partir dos livros de arquivo de laudos anatomopatológicos do Setor de Anatomia Patológica. Os dados clínicos foram coletados a partir de informações contidas nos prontuários e laudos hispotopatológicos e incluíram:

- Informações sobre gênero, idade na época do diagnóstico, tamanho do tumor e invasão capsular;
- Informações sobre diagnóstico histológico da doença, o tamanho tumoral, comprometimentos linfonodais regionais e a presença de metástases à distância, além da invasão de tecidos adjacentes também foram coletadas.

Foram incluídos apenas pacientes com comprovado diagnóstico histopatológico de carcinomas papilíferos de tireóide, cujos blocos de parafina encontravam-se disponíveis no Setor de Anatomia Patológica (SAP) e cujos prontuários encontravam disponíveis no Setor de Arquivo do hospital.

Um total de 177 (cento e setenta e sete) pacientes teve as peças cirúrgicas analisadas no Setor de Anatomia Patológica no período estabelecido. Cento e sessenta e cinco (165) pacientes, preencheram os critérios de inclusão e doze (12) foram excluídos da análise, especialmente por não possuírem tumor primário

disponível, ou por falta de confirmação diagnóstica, após revisão histopatológica dos casos.

4.2 Análise Imuno-Histoquímica

A análise imuno-histoquímica empregou o método da imunoperoxidase associada a polímeros (Kit comercial MACH4 – *Universal HRP-Polymer kit - BioCare*). A imunodeteção da proteína VEGF-C foi feita por meio de anticorpo policlonal (Rabbit anti-VEGF-C polyclonal antibody, Invitrogen) e a de COX-2 empregou o anticorpo monoclonal COX229 (Mouse anti-COX-2, clone: COX229, Invitrogen). Os cortes, montados em lâminas sinalizadas, foram desparafinizados e desidratados, em temperatura controlada. Em seguida, foram submetidos à recuperação antigênica pelo calor, em panela de pressão, durante 5 minutos, utilizando-se o citrato 0,01M, pH 6,0. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente, para resfriamento, por cerca de 1 hora. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em peróxido de hidrogênio 3%, durante 10 minutos, e em seguida, as lâminas foram lavadas com tampão fosfato (PBS) por 5 minutos. Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas a 4°C, durante a noite, com o anticorpo policlonal anti-VEGF-C, diluído (1:600) e anticorpo monoclonal anti-COX-2, diluído (1:800), em solução de PBS contendo 1% de albumina bovina e com o anticorpo monoclonal anti-COX-2. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS, por 5 minutos, e incubadas durante 1 hora com o anticorpo secundário conjugado com o polímero contendo a biotina-avidina peroxidase. Depois de uma nova lavagem com PBS, por 5 minutos, a reação foi revelada com tetra-hidroclorato de 3-3'diaminobenzidina, por 5 minutos, e as lâminas levemente contra coradas com hematoxilina. Em seguida, as lâminas foram desidratadas e montadas com lamínula.

A análise microscópica das preparações de IHQ utiliza o índice de marcação da respectiva proteína no citoplasma das células, classificando as marcações quantitativamente, em 04 categorias:

- Negativa;
- Positiva em até 10% das células;
- Positiva em 11% a 50% das células;

- Positiva em 50% ou mais das células.

4.3 Análise Estatística

Análise estatística descritiva dos dados foi realizada para avaliação dos principais aspectos clinicopatológicos relacionados ao prognóstico dos carcinomas papilíferos de tireoide. Os casos avaliados foram divididos em dois grupos de acordo com a percentagem de células tumorais marcadas (\leq a 50% e $>$ 50%) e analisadas por estatística comparativa, utilizando o teste do Chi-quadrado. Esse teste permite comparar dois grupos e dizer se eles são diferentes estatisticamente, ou melhor, se existe uma associação estatisticamente significativa entre os fatores analisados. Portanto, as comparações foram feitas, utilizando o nível de 95% de confiança, sendo considerado significativo o resultado com p igual ou menor que 0,05% em todas as análises.

5. RESULTADOS

5.1 Grupo de Estudo

Os dados clínicos e patológicos dos pacientes incluídos neste estudo estão descritos nas tabelas 2, 3 e 4. Na tabela 2, verifica-se que os CPT foram mais prevalentes no gênero feminino (81,2%) especialmente na faixa etária de 45 anos (59%).

Tabela 2. Análise descritiva dos pacientes com carcinoma papilífero da tireoide em relação ao gênero e idade

Gênero	Nº	%	< 45	> 45
Masculino	31	18,8	21	10
Feminino	134	81,2	79	55

Quanto à presença de metástases (Tabela 3), foram encontradas metástases linfonodais em 35 indivíduos portadores de CPT, perfazendo um total de 21,2% da amostra, sendo 10 casos de ocorrência no gênero masculino e 25 no gênero feminino.

Em relação às metástases à distância, apenas 3,6% (n=6) do total analisado apresentou essa característica clínica. Além disso, metástases à distância foram encontradas apenas em indivíduos do sexo feminino, estando ausente no gênero masculino (Tabela 3).

Tabela 3. Análise descritiva dos pacientes com carcinoma papilífero da tireoide em relação à presença de metástase linfonodal e à distância

Variável	Total	(n = 165)	Homens	(n = 31)	Mulheres	(n = 134)
Metástase Linfonodal						
Presente	35	21,2	10	32,3	25	18,7
Ausente	130	78,8	21	67,7	109	81,3
Metástase à Distância						
Presente	6	3,6	0	0,0	6	4,5
Ausente	159	96,4	31	100,0	128	95,5

Na tabela 4 verifica-se que a análise histopatológica detectou invasão capsular em 71 casos (43,0%), sendo 54 casos descritos no gênero feminino e 17 no gênero masculino. Em 9 casos (5,5%), não foi possível realizar essa análise. O extravasamento da glândula pelo tumor foi verificado em 40 (24,2%) dos tumores analisados, sendo 31 casos detectados em mulheres e 9 casos em homens. Em três casos (1,8% da amostra), não foi possível fazer esta análise, e esta característica estava ausente em 122 (73,9%) casos.

Tabela 4. Análise descritiva dos pacientes com carcinoma papilífero da tireóide em relação à invasão capsular e invasão de tecido adjacente

Variável						
Invasão Capsular	Total	(n = 165)	Homens	(n = 31)	Mulheres	(n = 134)
Presente	71	43,0	17	54,8	54	40,3
Ausente	85	51,5	11	35,5	74	55,2
Não especificado	9	5,5	3	9,7	6	4,5
Invasão Tecido Adjacente						
Presente	40	24,2	9	29,0	31	23,1
Ausente	122	73,9	22	71,0	100	74,6
Não especificado	3	1,8	0	0,0	3	2,2

5.2 Associações investigadas entre a expressão de COX-2 e VEGF-C com os aspectos clínicos e histopatológicos

A análise imuno-histoquímica de COX-2 e VEGF-C foi realizada em 165 amostras de carcinomas papilíferos da tireoide. A análise imuno-histoquímica da expressão de COX-2 e VEGF-C, apresentou escore de marcação entre 1 e 4, e em 3 casos a análise foi inconclusiva. A classificação da expressão de COX-2 e VEGF-C dividiu os tumores em dois grupos, sendo um com expressão $\leq 50\%$ para COX-2 (54,5%) e VEGF-C (40,6%), e outro com expressão $> 50\%$ para COX-2 (30,3%) e VEGFC (37,6%). As possíveis associações entre os níveis de expressão de COX-2 e VEGF-C com os aspectos clínicos e histopatológicos encontram-se descritas na tabela 5.

Tabela 5. Análise comparativa investigando as possíveis associações entre os aspectos clínicos e a expressão das proteínas COX-2 e VEGF-C em 165 pacientes com CPT

Variáveis	COX-2 (n=163)*					VEGF-C (n=164)**				
	≤ 50%		> 50%		p	≤ 50%		> 50%		p
	N	f(%)	N	f(%)		N	f(%)	n	f(%)	
Gênero										
Masculino	23	14,1	8	4,9		17	10,4	14	8,5	
Feminino	90	55,2	42	25,8	0,6623	85	51,8	48	29,3	0,4640
Idade										
< 45 anos	74	45,9	25	15,3		66	40,2	33	20,1	
≥ 45 anos	39	23,9	25	15,3	0,0904	36	22,0	29	17,7	0,1961
Tamanho										
Tx	7	4,3	0	0,0		6	3,7	1	0,6	
T1	53	32,5	18	11,0		48	29,3	23	14,0	
T2	30	18,4	9	5,5		30	18,3	9	5,5	
T3	5	3,1	2	1,2		6	3,7	1	0,6	
T4	18	11,0	21	12,9	0,0048	12	7,3	28	17,1	<0,0001
Nódulo										
Uninodular	86	52,8	34	20,9		79	48,2	42	25,6	
Multinodular	27	16,6	16	9,8	0,3733	23	14,0	20	12,2	0,2349
Metástase Lindonodal										
Presente	22	13,5	13	8,0		10	6,1	25	15,2	
Ausente	91	55,8	37	22,7	0,4657	92	56,1	37	22,6	<0,0001
Metástase à Distância										
Presente	3	1,8	3	1,8		1	0,6	5	3,0	
Ausente	110	67,5	47	28,8	0,5519	101	61,6	57	34,8	0,0556
Invasão Capsular***										
Presente	40	24,5	31	19		47	28,7	23	14,0	
Ausente	57	35,0	28	17,2	0,2266	61	37,2	24	14,6	0,6546
Invasão Tecido Adjacente****										
Presente	18	11,0	21	12,9		12	7,3	28	17,1	
Ausente	94	57,7	28	17,2	0,0006	89	54,3	33	20,1	<0,0001

Número de pacientes excluídos da análise por falta de dados: (*) 1 paciente e (**) 2 pacientes

A hiperexpressão de COX-2 esteve significativamente associada ao tamanho dos tumores ($p=0,0048$) e à invasão de tecido adjacente ($p=0,0006$).

A hiperexpressão de VEGFC esteve significativamente associada ao tamanho dos tumores ($p<0,0001$), à presença de metástases linfonodais ($p<0,0001$) e à invasão tumoral de tecidos adjacentes ($p<0,0001$).

6. DISCUSSÃO

A análise imuno-histoquímica é de grande valia para o estudo do perfil de expressão dos genes de interesse. Neste estudo, investigou-se a expressão de VEGF-C e COX-2 em carcinomas papilíferos de tireoide (CPT) e as possíveis associações entre a expressão desses marcadores e os aspectos clínicos e patológicos dos tumores.

A via linfática é o principal mecanismo de disseminação dos carcinomas papilíferos de tireoide (Siironen et al., 2006; Robbins & Cotran, 2010). COX-2 parece promover linfagiogênese pela supra-regulação do VEGF-C (SIIRONEN et al., 2006), sendo o VEGF-C o mais potente fator linfagiogênico conhecido (INDA et al. 2009). Nosso estudo revelou associação significativa entre a presença de metástase linfonodal ($p < 0,0001$) e a expressão de VEGF-C.

O carcinoma papilífero da tireoide é o tipo mais comum de neoplasia maligna do sistema endócrino, responsável por 70% a 80% dos casos. Variações na incidência de carcinomas papilíferos de tireoide são registradas em diversas partes do mundo, o que reflete possíveis características ambientais e genéticas que favorecem o seu desenvolvimento (WARTHOFSKY, 2010). Nossa pesquisa também revelou maior ocorrência de CPT no gênero feminino, com uma proporção de 4,3 mulheres para 1 homem. Estes dados se assemelham com os achados de Cabruzzi et al (2011) que também constatou a presença de CPT em 4 mulheres para 1 homem e verificou que a grande maioria dos tumores ocorre em adultos com idades entre 20 e 50 anos.

Estudos que investigam marcadores moleculares permitem a identificação de alvos importantes para o melhor direcionamento do tratamento dos carcinomas papilíferos de tireoide. As moléculas VEGF-C e COX-2 têm sido analisadas com resultados que evidenciam suas participações na tumorigênese dos carcinomas papilíferos de tireoide, bem como, ao pior prognóstico desses tumores (SIIRONEN et al., 2006).

O grupo aqui estudado apresenta características semelhantes aos da literatura (CABRUZZI et al., 2011; ERDEM et al., 2011; INCA, 2011; VARTANIAN, 2013). A maior prevalência da doença em mulheres (81,2%) foi verificada em nosso estudo. Além disso, nossos resultados revelam uma maior prevalência de CPT em mulheres com idade inferior a 45 anos. Para Mack et al. (1999) a maior prevalência de CPT em mulheres se justifica em virtude das alterações hormonais provenientes do ciclo menstrual, gravidez, ciclos reprodutivos e menopausa, no entanto, esses dados não são bem compreendidos. Já os homens correspondem a apenas 18,8% dos casos e dentre estes, 67,7% possuíam menos de 45 anos. Segundo Wang et al. (2004), os homens apresentam aproximadamente metade da frequência de carcinoma papilífero de tireóide das mulheres, como demonstrado em nosso trabalho.

A relação entre a atividade de COX-2 e VEGF-C na carcinogênese está sendo examinada em várias neoplasias humanas, inclusive no câncer colorretal, mama, pulmão entre outros. Com o auxílio da (PAAF) punção aspirativa por agulha fina no diagnóstico de nódulos da tireóide, foi possível reduzir o número de casos de tratamento cirúrgico de 67% para 44%, pois a realização da citopatologia permite a melhoria no rastreamento da malignidade em nódulos teroidianos. Este exame juntamente com a utilização de marcadores moleculares, aumenta a probabilidade de um diagnóstico correto (KRAWCZYK-RUSIECKA & LEWIŃSK, 2010).

A literatura descreve a associação entre a idade e um pior prognóstico para os CPT. Siironen et al. (2006) demonstraram que nos tumores de pacientes idosos com CPT, a expressão de COX-2 e VEGF-C foi maior. Mas, não houve associação significativa entre os níveis de expressão em tumores de pacientes mais idosos em relação aos pacientes mais jovens. Já Ito et al. (2011) demonstraram que os níveis de COX-2 foram significativamente reduzidos em pacientes idosos.

Nossos dados revelaram que não houve diferença significativa entre a idade ou gênero com níveis de expressão de COX-2 e VEGF-C. No entanto, pode se observar uma associação significativa entre níveis de expressão baixos de COX-2 com uma maior prevalência de tumores menores (T1 e T2), e uma hiperexpressão associada aos tumores maiores (T3 e T4) ($p=0.0048$). Este resultado sugere que a hiperexpressão de COX-2, esteja relacionada com aumento do tamanho tumoral.

Segundo Siironen et al. (2006) o nível de expressão foi maior em CPT em estágio avançado, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa.

O envolvimento linfonodal é evento comum, nos CPT ocorrendo em cerca de 30% dos pacientes. Segundo Slough (2006), a extensão extratireoidiana ocorre de 8% a 32% dos casos, sendo tecido adjacente (8%) os sítios extratireoidianos mais acometidos, seguidos do envolvimento do nervo laríngeo-recorrente (6%) e traquéia (5%). Metástases à distância são percebidas em apenas 1 a 25% dos pacientes com CPT, o que representa uma taxa pequena entre os carcinomas bem diferenciados da tireóide. Em nosso trabalho todos esses fatores foram observados com presença de comprometimento linfonodal em 21,2% da amostra; invasão de tecido adjacente em 24,2%. Além disso, o índice de metástase à distância na população estudada foi de apenas 3,6%, o que vai de encontro com a literatura (SCIUTO et al., 2009), que refere que, mais de 80% dos pacientes com CPT apresentam estadiamento TNM baixo (estágios T1 e T2) quando analisados, o que também ocorreu na nossa amostra com 50,9% do total.

Nos pacientes de nosso estudo observamos uma associação da hiperexpressão do VEGF-C com invasão de tecido adjacente, metástases linfonodal e à distância, e observamos associação entre hiperexpressão de COX-2 com o aumento do tamanho tumoral, bem como o extravasamento do tecido adjacente. O resultado da associação do VEGF-C com fatores de pior prognóstico vai de encontro aos achados de alguns autores com publicações mais recentes. Isso poderia ser explicado pela ativação da linfangiogênese pelo VEGF-C, facilitando a disseminação tumoral (NAKAMOTO et al. 2007; INDA et al. 2009).

7. CONCLUSÃO

Os nossos resultados permitem concluir que:

- 1- A hiperexpressão de COX-2 foi verificada em 50 casos (30,6%) de carcinomas papilíferos de tireóide.
- 2- A hiperexpressão de VEGF-C foi verificada em 62 casos (37,8%) de carcinomas papilíferos de tireóide.
- 3- A hiperexpressão de COX-2 esteve significativamente associada ao tamanho dos tumores ($p=0,0048$) e à invasão do tecido adjacente ao tumor ($p=0,0006$).
- 4- A hiperexpressão de VEGFC esteve significativamente associada ao tamanho dos tumores ($p<0,0001$), à presença de metástases linfonodais ($p<0,0001$) e à envasão do tecido adjacente ($p<0,0001$).
- 5- A hiperexpressão de COX-2 e VEGFC nos carcinomas papilíferos de tireóide está associada aos aspectos de pior prognóstico desses tumores.

8. REFERÊNCIAS

1. Alvarenga M, Cotta AC, Dufloth RM, Schmitt FCL. Contribuição do patologista cirúrgico para o diagnóstico das síndromes do câncer hereditário e avaliação dos tratamentos cirúrgicos profiláticos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina*.
2. American Cancer Society. Cancer facts and figures 2003. Disponível em URL: <http://www.cancer.org/docroot>
3. Bai Ji, Yahui Liu, Ping Zhang, Yingchao Wang, Guangyi Wang. COX-2 Expression and Tumor Angiogenesis in Thyroid Carcinoma Patients among Northeast Chinese Population-Result of a Single-Center Study. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the First Bethune Hospital, Jilin University, Jilin 130021, China. Bai Ji and Yahui Liu contributed equally to this paper. Received: 2012.01.31; Accepted: 2012.04.15; Published: 2012.04.19.
4. Bergelin, Nina, Christoffer Löf, Sonja Balthasar, Veronica Kalhori, e Kid Törnquist. "S1P1 and VEGFR-2 Form a Signaling Complex with Extracellularly Regulated Kinase 1/2 and Protein Kinase C-alpha Regulating ML-1 Thyroid Carcinoma Cell Migration". *Endocrinology* 151, no 7 (julho de 2010): 2994–3005. doi:10.1210/en.2009-1387. *Laboratorial* 2003 abr; 39(2): 167-77.
5. Berne, Levy. *Tratado de Fisiologia*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
6. Bhargav, Panchagan Rama Kant, Anjali Mishra, Gaurav Agarwal, Amit Agarwal, Prasanta Kumar Pradhan, Sanjay Gambhir, Ashok Kumar Verma, e Saroj Kanta Mishra. "Long-term Outcome of Differentiated Thyroid Carcinoma: Experience in a Developing Country". *World Journal of Surgery* 34, no 1 (janeiro de 2010): 40–47. doi:10.1007/s00268-009-0293-y.
7. Bradly, Dawn P, Vijaya Reddy, Richard A Prinz, e Paolo Gattuso. "Incidental Papillary Carcinoma in Patients Treated Surgically for Benign Thyroid Diseases". *Surgery* 146, no 6 (dezembro de 2009): 1099–1104. doi:10.1016/j.surg.2009.09.025.
8. Bodey, B. The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. *Expert Opin Biol Ther* 2002 Apr;2(4):371-93.
9. Bunone, G, P Vigneri, L Mariani, S Butó, P Collini, S Pilotti, M A Pierotti, e I Bongarzone. "Expression of Angiogenesis Stimulators and Inhibitors in Human Thyroid Tumors and Correlation with Clinical Pathological Features". *The American Journal of Pathology* 155, no 6 (dezembro de 1999): 1967–1976. doi:10.1016/S0002-9440(10)65515-0.
10. Cabruzzi, E., Pêgas, K. I., Molinari, A. S., Duarte, M. R., Ferrarii, M. B. A relação entre o tamanho tumoral e fatores prognósticos em 241 casos de carcinoma papilart de tireoide. *Revista de AMRIGS, Porto Alegre*, 55 (1): 58-63, 2011.
11. Cady, B, e R Rossi. "An Expanded View of Risk-group Definition in Differentiated Thyroid Carcinoma". *Surgery* 104, n° 6 (dezembro de 1988): 947–953.
12. Camboim DC, Figueirôa VMSM, Lima DNO, Lima PAB, Lima MCCA. Papillary thyroid carcinoma associated to Hashimoto's thyroiditis: frequency and histopathological aspects. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2009; 45(1).

13. Capp C, Zennig N, Wajner S, Maia AL. The role of vascular endothelial growth factor in tumor. *Clin Breast Cancer*. 2000 Suppl 1:S80-4.
14. Chen, Amy Y, Ahmedin Jemal, e Elizabeth M Ward. "Increasing Incidence of Differentiated Thyroid Cancer in the United States, 1988-2005". *Cancer* 115, no 16 (15 de agosto de 2009): 3801–3807. doi:10.1002/cncr.24416.
15. Dean, Diana S, e Hossein Gharib. "Epidemiology of Thyroid Nodules". *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 22, no 6 (dezembro de 2008): 901–911. doi:10.1016/j.beem.2008.09.019.
16. Delellis RA, Liloyd RV, Heitz PU, Eng C. Pathology & Genetics tumours of endocrine organs. Lyon: IARC; 2004.
17. Du, Bin, Zhen-Yu Yang, Xue-Yun Zhong, Mao Fang, Yong-Rong Yan, Guo-Long Qi, Yun-Long Pan, e Xu-Long Zhou. "Metastasis-associated Protein 1 Induces VEGF-C and Facilitates Lymphangiogenesis in Colorectal Cancer". *World Journal of Gastroenterology: WJG* 17, no 9 (7 de março de 2011): 1219–1226. doi:10.3748/wjg.v17.i9.1219.
18. Erdem H, Gündogdu C, Sipal S. Correlation of E-cadherin, VEGF, COX-2 expression to prognostic parameters in papillary thyroid carcinoma. *Mol Exp Pathol* 2011 Jun ; 90 (3) : 312-7. Doi: 10.1016/j.yexmp.2011.01.008.
19. Facina, Taís. "Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil". *Rev. Bras. Cancerologia*. v. 57, n. 4, p. 557. Rio de Janeiro: INCA, 2011.
20. Folkman, J. "Anti-angiogenesis: New Concept for Therapy of Solid Tumors". *Annals of Surgery* 175, no 3 (março de 1972): 409–416.
21. Folkman, JMD. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N Engl J Med* 1971; 285:1182-1186.
22. Fox, S B. "Tumour Angiogenesis and Prognosis". *Histopathology* 30, n° 3 (março de 1997): 294–301.
23. Frederik A Verburg, Uwe Maöder1, Markus Luster and Christoph Reiners Histology does not influence prognosis in differentiated thyroid carcinoma when accounting for age, tumour diameter, invasive growth and metastases. Department of Nuclear Medicine, Würzburg University, Josef Schneiderstrasse 2, Bau D5, 97080 Würzburg, Germany and 1Tumour Centre, Würzburg University, Würzburg, Germany, 2009
24. Garnis C, Buys TPH, Lam WL. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. *Mol cancer* 2004; 3(9): 3-9
25. Gilliland FD, Hunt WC, Morris DM, Key CR. Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15,698 cases from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973-1991. *Cancer* 1997;79:564-73
26. Giusti, Francesca, Alberto Falchetti, Francesco Franceschelli, Francesca Marini, Annalisa Tanini, e Maria Luisa Brandi. "Thyroid Cancer: Current Molecular Perspectives". *Journal of Oncology* 2010 (2010): 351679. doi:10.1155/2010/351679.
27. Gómez Sáez, José M. "Diagnostic and Prognostic Markers in Differentiated Thyroid Cancer". *Current Genomics* 12, n° 8 (dezembro de 2011): 597–608. doi:10.2174/138920211798120826.

28. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, n. 100, p. 57-100, 2000.
29. Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. *Surgery* 1993;114:1050-8.
30. Horta, Bruno Araújo Cautiero, Ana Carolina Rennó Sodero, e Ricardo Bicca de Alencastro. "Investigating the Differential Activation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptors". *Journal of Molecular Graphics & Modelling* 28, no 3 (outubro de 2009): 287–296. doi:10.1016/j.jmgm.2009.08.007.
31. Hsueh, Chuen, Jen-Der Lin, I-Chin Wu, Tzu-Chieh Chao, Jau-Song Yu, Miaw-Jene Liou, e Chi-Ju Yeh. "Vascular Endothelial Growth Factors and Angiopoietins in Presentations and Prognosis of Papillary Thyroid Carcinoma". *Journal of Surgical Oncology* 103, n° 5 (abril de 2011): 395–399. doi:10.1002/jso.21844.
32. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. *Cancer* 1998;83:2638-48.
33. Hung, Chung J, David G Ginzinger, Raza Zarnegar, Hajime Kanauchi, Mariwil G Wong, Electron Kebebew, Orlo H Clark, e Quan-Yang Duh. "Expression of Vascular Endothelial Growth factor-C in Benign and Malignant Thyroid Tumors". *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88, no 8 (agosto de 2003): 3694–3699
34. Inda, Ana M., Marcela N.i.l.d.a. Garcia, Laura B.e.a.t.r.i.z. Andrini, Adriana L.a.u.r.a. Garcia, Ayelen F.e.r.n.a.n.d.e.z. Blanco, Cecilia C.r.i.s.t.i.n.a. Furnus, Susana M.e.r.c.e.d.e.s. Galletti, et al. "Evaluation of Angiogenesis with the Expression of VEGF-C and CD34 in Human Colon Cancer". *Current Chemical Biology* 3, no 3 (2009): 302–305. doi:10.2174/187231309789054823.
35. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). *Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço*. 3. ed. atual. amp. Rio de Janeiro: INCA, 2008a.
36. Instituto Nacional De Câncer. Sociedade Brasileira De Oncologia Pediátrica (SOBOPE). *Câncer na criança e no adolescente no Brasil dados dos registros de base populacional e de mortalidade*. Rio de Janeiro, RJ, 2008b.
37. Ito Y, Kudo T, Takamura Y, Kobayashi K, Miya A, Miyauchi A. Prognostic factors of papillary thyroid carcinoma vary according to sex and patient age. *World J Surg*. 2011; 35(12):2684-90.
38. Jeltsch M., Karpanen T., Strandin T., Aho K., Lankinen H., Alitalo K. Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) / moléculas mosaico VEGF-C revelam determinantes de especificidade e apresentam novos receptores de padrões de ligação. *J. Biol. Chem.* 2006, 281:12187-12195.
39. Jiang, Han-Guo, Mei Gao, Wei-Ping Tang, Fei-Hong Li, e Qiong-Zhen Cai. "[Expression and significance of VEGF, VEGF-C, and VEGF-D in papillary thyroid carcinoma]". *Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer* 24, n° 9 (setembro de 2005): 1136–1139.
40. Jui-Chieh Chen, Yi-Wen Chang, Chih-Chen Hong, Yang-Hao Yu, and Jen-Liang Su. The Role of the VEGF-C/VEGFRs Axis in Tumor Progression and Therapy *nt J Mol Sci*. 2013; 14(1): 88–107. Published online 2012 December 20. doi: 10.3390/ijms14010088
41. Kajita S, Ruebel KH, Casey MB, Nakamura N, Lloyd RV. Papel da COX-2, a sintase do tromboxano A2 e da prostaglandina E2 sintase em carcinoma papilar crescimento. *Mod Pathol*.

- 2005, 18:221-227. doi: 10.1038/modpathol.3800285.
42. Kent WD, et. al. Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and detection of subclinical disease. *CMAJ*;177(11):1357-61, 2007 Nov 20
 43. Kepal N. Patel, MD, and Bhuvanesh Singh, MD, Genetic Considerations in Thyroid Cancer *Submitted January 24, 2006; accepted March 21, 2006.*
 44. Kim, Tae Yong, Suck Joon Hong, Jung Min Kim, Won Gu Kim, Gyungyub Gong, Jin Sook Ryu, Won Bae Kim, Sung-Cheol Yun, e Young Kee Shong. "Prognostic Parameters for Recurrence of Papillary Thyroid Microcarcinoma". *BMC Cancer* 8 (2008): 296. doi:10.1186/1471-2407-8-296.
 45. Knostman, K A B, S M Jhiang, e C C Capen. "Genetic Alterations in Thyroid Cancer: The Role of Mouse Models". *Veterinary Pathology* 44, n° 1 (janeiro de 2007): 1–14. doi:10.1354/vp.44-1-1.
 46. Krawczyk-Rusiecka, Kinga e Andrzej Lewiński. "Cyclooxygenase-2 Expression and Its Association with Thyroid Lesions". *Archives of Medical Science: AMS* 6, n° 5 (outubro de 2011): 653–657. doi:10.5114/aoms.2010.17076.
 47. Krawczyk-Rusiecka K, Wojciechowska-Durczyńska K, Cyniak-Magierska A, Adamczewski Z, Gałęcka E, Lewiński A. COX-2 expression in papillary thyroid carcinoma (PTC) in cytological material obtained by fine needle aspiration biopsy (FNAB). *Thyroid Res.* 2011 Jan 10; 4(1):3. doi: 10.1186/1756-6614-4-3.
 48. Lee KJ, Jung YS, Kim WH, Yoon TI, Joo HJ, Soh EY. Ciclooxygenase-2 expressão na doença da tireóide humana. *J Endocrinol Invest.* 2008; 31:111-118 *ine Regulations* 39, no 3 (setembro de 2005): 73–83.
 49. Liang, Huasheng, Yuhua Zhong, Zuojie Luo, Yu Huang, Huade Lin, Min Luo, Song Zhan, Kaiqing Xie, Yan Ma, e Qingdi Quentin Li. "Assessment of Biomarkers for Clinical Diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma with Distant Metastasis". *The International Journal of Biological Markers* 25, n° 1 (março de 2010): 38–45.
 50. Liska, J, V Altanerova, S Galbavy, S Stvrtina, e J Brtko. "Thyroid Tumors: Histological Classification and Genetic Factors Involved in the Development of Thyroid Cancer". *Endocrine Regulations* 39, no 3 (setembro de 2005): 73–83.
 51. Lo, Chung-Yau, Kin-Yin Lam, Pauline P Leung, e John M Luk. "High Prevalence of Cyclooxygenase 2 Expression in Papillary Thyroid Carcinoma". *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 152, n° 4 (abril de 2005): 545–550. doi:10.1530/eje.1.01883.
 52. Maciel RMB. Tumorigênese molecular tiroideana: implicações para a prática médica. *Arq Bras EndocrinMetab.* 2002; 46(4):381-90.
 53. Mack, W J, S Preston-Martin, L Bernstein, D Qian, e M Xiang. "Reproductive and Hormonal Risk Factors for Thyroid Cancer in Los Angeles County Females". *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: a Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 8, no 11 (novembro de 1999): 991–997.
 54. Mack, W J, S Preston-Martin, L Bernstein, D Qian, e M Xiang. "Reproductive and Hormonal Risk Factors for Thyroid Cancer in Los Angeles County Females". *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: a Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 8, n° 11 (novembro de 1999): 991–997.

55. Méric, Jean-Baptiste, Sylvie Rottey, Ken Olausson, Jean-Charles Soria, David Khayat, Olivier Rixe, e Jean-Philippe Spano. "Cyclooxygenase-2 as a Target for Anticancer Drug Development". *Critical Reviews in Oncology/hematology* 59, no 1 (julho de 2006): 51–64. doi:10.1016/j.critrevonc.2006.01.003.
56. Miao, Ailin, Meizhen Wan, e Lei Cheng. "[Expression of COX-2 and VEGF-C in papillary thyroid carcinoma and their relationship to cervical lymph metastases]". *Lin chuang er bi yan hou tou jing wai ke za zhi = Journal of clinical otorhinolaryngology, head, and neck surgery* 23, n° 19 (outubro de 2009): 881–883.
57. Nakamoto RH, Uetake H, Iida S, Kolev YV, Soumaoro YT, Yasuno M and Suguhara K 2007. Correlations between Cyclooxygenase-2 Expression and Angiogenic Factors in Primary Tumours and Liver Metastases in Colorectal Cancer. *Jpn J Clin Oncol* 37(9) 679-685.
58. Patel, Kunal N, e Bhuvanesh Singh. "Genetic Considerations in Thyroid Cancer". *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center* 13, no 2 (abril de 2006): 111–118.
59. Pepper, M S. "Lymphangiogenesis and Tumor Metastasis: Myth or Reality?" *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 7, n° 3 (março de 2001): 462–468.
60. Prodosmo, Andrea, Simona Giglio, Sonia Moretti, Francesca Mancini, Flavia Barbi, Nicola Avenia, Giusy Di Conza, et al. "Analysis of Human MDM4 Variants in Papillary Thyroid Carcinomas Reveals New Potential Markers of Cancer Properties". *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 86, n° 5 (maio de 2008): 585–596. doi:10.1007/s00109-008-0322-6.
61. Ramos HVL, Simoes MJ, Pontes PAL, Neves LR, Barbosa LHF, Biase NG, Oshima CTS. Imunohistoquímica como método de estudo das fibras elásticas em prega vocal humana. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 71(4) 2005.
62. Reis, AAS, Silva, DM, Curado, MP, Cruz, AD. Polimorfismo nos carcinomas tiroideanos: Estudo molecular e meta-análise. *Estudos, Goiânia*, 37, n. 11/12, p. 851-867, nov/dez. 2010.
63. Reynolds, Rebecca M, Jennifer Weir, Diane L Stockton, David H Brewster, Thekkepat C Sandeep, e Mark W J Strachan. "Changing Trends in Incidence and Mortality of Thyroid Cancer in Scotland". *Clinical Endocrinology* 62, no 2 (fevereiro de 2005): 156–162. doi:10.1111/j.1365-2265.2004.02187.x.
64. Richardson, David B. "Exposure to Ionizing Radiation in Adulthood and Thyroid Cancer Incidence". *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 20, no 2 (março de 2009): 181–187. doi:10.1097/EDE.0b013e318196ac1c.
65. Rizzo, Maria Teresa. "Cyclooxygenase-2 in Oncogenesis". *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 412, no 9–10 (11 de abril de 2011): 671–687. doi:10.1016/j.cca.2010.12.026.
66. Robbins & Cotran. *Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. 8, 2010.
67. Rocha JCC, Silva SN. Oncogenética. In: Coelho FRG, Kowalski LP. *Bases da Oncologia*. 2. ed. São Paulo: TECMEDD; 2003: p. 423-32.
68. Rocha, JC; Ferreira, CG. *Oncologia Molecular*. Pag, 149 2º ed, [s.d.].

69. Rodrigues, André Afonso Nimtz, Alcadipani, Fernando Antônio Maria Claret, Ântico Filho, Armando, Suehara, Alexandre Babá, Casarim, André Luis Maion, Pinheiro, Thiago Cerizza. Carcinoma medular de tireóide. *Rev. Ciênc. Méd., Campinas*, 19(1-6):91-97, jan./dez., 2010
70. ROSAI, J. Special techniques in surgical pathology. In: Ackerman's. *Surgical Pathology*. 8 ed. Nova York: Mosby-Year Book, 1996.
71. Samaan NA, Schultz PN, Hickey RC, Goepfert H, Haynie TP, Johnston DA & Ordonez NG 1992, os resultados de várias modalidades de tratamento dos bem diferenciados carcinomas de tireóide: uma revisão retrospectiva de 1599 pacientes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 75 714-720.
72. Schlumberger M, Tubiana M, De Vathaire F, Hill C, Gardet P, Travagli JP, et al. Long-term results of treatment of 283 patients with lung and bone metastases from differentiated thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 1986;63:960-7
73. Sciuto, R, L Romano, S Rea, F Marandino, I Sperduti, e C L Maini. "Natural History and Clinical Outcome of Differentiated Thyroid Carcinoma: a Retrospective Analysis of 1503 Patients Treated at a Single Institution". *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 20, no 10 (outubro de 2009): 1728–1735. doi:10.1093/annonc/mdp050.
74. Shushanov, S, M Bronstein, J Adélaïde, L Jussila, T Tchipyshcheva, J Jacquemier, A Stavrovskaya, D Birnbaum, e A Karamysheva. "VEGFc and VEGFR3 Expression in Human Thyroid Pathologies". *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 86, no 1 (1 de abril de 2000): 47–52.
75. Siironen, Päivi, Ari Ristimäki, Kirsi Narko, Stig Nordling, Johanna Louhimo, Sture Andersson, Reijo Haapiainen, e Caj Haglund. "VEGF-C and COX-2 Expression in Papillary Thyroid Cancer". *Endocrine-related Cancer* 13, no 2 (junho de 2006): 465–473. doi:10.1677/erc.1.01114.
76. Slough, Cristian M, e Gregory W Randolph. "Workup of Well-differentiated Thyroid Carcinoma". *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center* 13, n° 2 (abril de 2006): 99–105.
77. Sturgis EM, Li G. "VEGF-C and COX-2 Expression in Papillary Thyroid Cancer". *Endocrine-related Cancer* 13, no 2 (junho de 2006): 465–473. doi:10.1677/erc.1.01114.
78. Sturgis, Erich M, e Guojun Li. "Molecular Epidemiology of Papillary Thyroid Cancer: In Search of Common Genetic Associations". *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association* 19, no 10 (outubro de 2009): 1031–1034. doi:10.1089/thy.2009.1597.
79. Talini C, Kaminski JH, Gama RR. Correlation between thyroid cancer and Hashimoto thyroiditis - retrospective study. *Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço*, 2012; 41(1), p. 12-18.
80. Tanaka, Katsuhiko, Hiroshi Sonoo, Junichi Kurebayashi, Tsunehisa Nomura, Sumiko Ohkubo, Yutaka Yamamoto, e Shigeru Yamamoto. "Inhibition of Infiltration and Angiogenesis by Thrombospondin-1 in Papillary Thyroid Carcinoma". *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 8, no 5 (maio de 2002): 1125–1131.
81. Tomer, Yaron, Yoshiyuki Ban, Erlinda Concepcion, Giuseppe Barbesino, Ronald Villanueva, David A Greenberg, e Terry F Davies. "Common and Unique Susceptibility Loci in Graves and Hashimoto Diseases: Results of Whole-genome Screening in a Data Set of 102 Multiplex Families". *American Journal of Human Genetics* 73, n° 4 (outubro de 2003): 736–747. doi:10.1086/378588.

82. Vartanian, José Guilherme. Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Tireóide. Onco&, março/abril 2013.
83. Verburg, Frederik A, Uwe Mäder, Markus Luster, e Christoph Reiners. "Histology Does Not Influence Prognosis in Differentiated Thyroid Carcinoma When Accounting for Age, Tumour Diameter, Invasive Growth and Metastases". *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 160, no 4 (abril de 2009): 619–624. doi:10.1530/EJE-08-0805.
84. Vianna DM, Curionil OA, França LJL, Paiva DL, Pompeu BF, Dedivitis RA, Rapoport A. A raridade histológica no câncer da tireoide. *Braz. j. otorhinolaryngol.* 2012; 78(4).
85. Wang, Yaqiu, Qingquan Hua. "[Clinical significance of HIF-1 alpha, VEGF and VEGF-C expression in papillary thyroid carcinoma]". *Lin chuang er bi yan hou tou jing wai ke za zhi = Journal of clinical otorhinolaryngology, head, and neck surgery* 21, n° 5 (março de 2007): 204–206, 208.
86. Ward, Laura S., e Lúgia V. M. Assumpção. "Câncer diferenciado da tireóide: fatores prognósticos e tratamento; Thyroid cancer: prognostic factors and treatment". *Arq. bras. endocrinol. metab* 48, n° 1 (fevereiro de 2004): 126–136.
87. Wartofsky, Leonard. "Increasing World Incidence of Thyroid Cancer: Increased Detection or Higher Radiation Exposure?" *Hormones (Athens, Greece)* 9, n° 2 (junho de 2010): 103–108.
88. Wong, Kai-Pun, e Brian Hung-Hin Lang. "New Molecular Targeted Therapy and Redifferentiation Therapy for Radioiodine-refractory Advanced Papillary Thyroid Carcinoma: Literature Review". *Journal of Thyroid Research* 2012 (2012): 818204. doi:10.1155/2012/818204.
89. Werner, M. et al. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*, v. 4, n. 7, p. 1016-9, 2000
90. Xiaoyan Shi, Ling Xi, Danhui Weng, Gang Chen, Xiaohong Song, Peng Wu, Beibei Wang, Juncheng Wei, Shixuan Wang, Jianfeng Zhou, and Ding Ma 3614667. Clinicopathological Significance of VEGF-C, VEGFR-3 and Cyclooxygenase-2 in Early-Stage Cervical Cancer. *Int J Biomed Sci.* 2008 March; 4(1): 58–63.
91. Ying-Chun Zhao, Xiao-Jian Ni, Yong Li, Min Dai, Zhong-Xu Yuan, Yong-Yun Zhu, and Chuan-Yu Luo Peritumoral lymphangiogenesis induced by vascular endothelial growth factor C and D promotes lymph node metastasis in breast cancer patients Published online 2012 August 20. doi: 10.1186/1477-7819-10-165.
92. Yong Li, Ying-Chun Zhao, Xiao-Jian Ni, Min Dai, Zhong-Xu Yuan, Yon-Yun e Chuan-Yu Luo. Peritumoral lymphangiogenesis induced by vascular endothelial growth factor C and D promotes lymph node metastasis in breast cancer patients. *World J Surg Oncol.* 2012; 10: 165. Published online 2012 August 20. doi: 10.1186/1477-7819-10-165.
93. Yu XM, Lo CY, Lam AK, Leung P., Luk JM Serum vascular endothelial growth factor c correlaciona-se com metástases em linfonodos e perfis de tumores de alto risco em carcinoma papilífero da tireóide. *Ann. Surg.* 2008; 247:483-489.
94. Yu, Xiao-Min, Chung-Yau Lo, Wai-Fan Chan, King-Yin Lam, Pauline Leung, e John M Luk. "Increased Expression of Vascular Endothelial Growth Factor C in Papillary Thyroid Carcinoma Correlates with Cervical Lymph Node Metastases". *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11, n° 22 (15 de novembro de 2005): 8063–8069. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0646.

95. Ward LS, Assumpção LVM. Câncer Diferenciado da Tireoide: Fatores Prognósticos e Tratamento. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004; 48(1): 126-136
96. Touzopoulos P, Karanikas M, Zarogoulidis P, Mitrakas A, Porpodis K, Katsikogiannis N, Zervas V, Kouroumichakis I, Constantinidis TC, Mikroulis D, Tsimogiannis KE. Current surgical status of thyroid diseases. *Journal of Multidisciplinary Healthcare.* 2011; 4: 441–449
97. Coeli CM, Brito AS, Barbosa FS, Ribeiro MG, Sieiro APAV, Vaisman M. Incidência e mortalidade por câncer de tireoide no Brasil. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005; 49(4): 503-9.
98. Barra GB, Velasco LFR, Pessanha RP, Campos AM, Moura FN, Dias SMG, Polikarpov I, Ribeiro RCJ, Simeoni LAA, Neves FAR. Mecanismo Molecular da Ação do Hormônio Tireoideano. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004; 48(1): 25-39.

ANEXOS